

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA FARMACEUTICKÉ BOTANIKY A EKOLOGIE



STUDIUM BIOLOGICKÉ AKTIVITY ALKALOIDŮ
IZOLOVANÝCH Z *CORYDALIS CAVA* (FUMARIACEAE)

Doktorská disertační práce

Mgr. Jakub Chlebek

Školitel: Doc. RNDr. Lubomír Opletal, CSc.

Studijní obor: Toxikologie přírodních látek

PODĚKOVÁNÍ

Touto cestou bych rád poděkoval svému školiteli Doc. RNDr. Lubomíru Opletalovi, CSc. za odborné vedení mého doktorského studia, vytvoření výborných pracovních podmínek na katedře farmaceutické botaniky a ekologie a předávání zkušeností, které vedly k mému celkovému růstu. Poděkování patří rovněž mým spolupracovníkům Ing. Kateřině Macákové, Ph.D. za změření vybraných biologických aktivit izolovaných alkaloidů z *Corydalis cava*, Ing. Lucii Cahlíkové, Ph.D. za měření a interpretace hmotnostních spekter izolovaných látek a ostatním pracovníkům katedry farmaceutické botaniky a ekologie, dále Doc. PharmDr. Jiřímu Kunešovi, Ph.D. z katedry anorganické a organické chemie Farmaceutické fakulty UK a Ing. Milanu Kurfürstovi, Ph.D. z Ústavu chemických procesů AV ČR za interpretaci NMR spekter. Za vytvoření skvělých pracovních podmínek a odborné vedení během mé zahraniční stáže na Boloňské univerzitě patří veliké poděkování prof. Dr. Vincenze Andrisano a jejím kolegům z Dipartimento di Scienze Farmaceutiche, Università di Bologna, zejména Francesce Mancini, Ph.D. a Angele De Simone, Ph.D.

Disertační práce vznikla za podpory grantu GA UK 122309 a Specifického vědeckého výzkumu UK v Praze, Farmaceutické fakultě v Hradci Králové (SVV-2012-265002).

PROHLÁŠENÍ

Já, Jakub Chlebek, prohlašuji, že tato práce je mým autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpal, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.

V Hradci Králové 2012

Jakub Chlebek

OBSAH

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A VYSVĚTLIVEK	xi
PŘEHLED SCHÉMÁT A OBRÁZKŮ.....	xiii
PŘEHLED TABULEK	xiv
1. ÚVOD	1
2. CÍL PRÁCE.....	3
3. TEORETICKÁ ČÁST.....	4
3.1 Inhibice acetylcholinesterasy a butyrylcholinesterasy	4
3.1.1 Význam acetylcholinu v organismu	4
3.1.2 Acetylcholinesterasa a butyrylcholinesterasa.....	4
3.1.3 Inhibitory cholinesteras.....	5
3.1.3.1 Mechanismus působení	5
3.1.3.2 Použití.....	5
3.1.4 Detekce cholinesterasové inhibice	6
3.1.4.1 Testy založené na barevné reakci	7
3.1.4.2 Testy využívající fluorescence	9
3.1.4.3 Testy založené na radiometrických metodách	10
3.1.4.4 Testy využívající hmotnostní spektrometrickou detekci.....	11
3.1.4.5 Testy využívající imobilizovaný enzym	11
3.1.5 Inhibitory cholinesteras rostlinného původu	13
3.1.5.1 Alkaloidní inhibitory cholinesteras	14
3.1.5.1.1 Inhibitory cholinesteras z čeledi Amaryllidaceae	14
3.1.5.1.2 Inhibitory z čeledi Buxaceae	14
3.1.5.1.3 Inhibitory z čeledi Papaveraceae.....	16
3.1.5.1.4 Inhibitory z čeledi Fumariaceae	17
3.1.5.1.5 Inhibitory cholinesteras z ostatních čeledí	18
3.1.5.2 Terpeny jako inhibitory cholinesteras	20
3.1.5.2.1 Monoterpenové a seskviterpenové inhibitory cholinesteras	20
3.1.5.2.2 Diterpenové inhibitory cholinesteras	22
3.1.5.2.3 Triterpenové inhibitory cholinesteras.....	23
3.1.5.2.4 Steroidní inhibitory cholinesteras.....	23
3.1.5.3 Fenolové inhibitory cholinesteras	24

3.1.5.3.1	Flavonoidní inhibitory cholinesteras	24
3.1.5.3.2	Kumarinové inhibitory cholinesteras	25
3.1.5.3.3	Xanthonové inhibitory cholinesteras.....	25
3.1.5.3.4	Lignanové inhibitory cholinesteras	26
3.1.5.3.5	Fenolové inhibitory cholinesteras různých strukturních typů	26
3.1.5.4	Ostatní inhibitory cholinesteras různých strukturních typů	27
3.2	Inhibice BACE1	28
3.2.1	Význam BACE1 v organismu.....	28
3.2.2	Inhibitory BACE1	29
3.2.2.1	Mechanismus působení	29
3.2.2.2	Použití.....	29
3.2.3	Detekce inhibice BACE1	29
3.2.3.1	Fluorescenční metody	29
3.2.3.2	Metody využívající imobilizovaný enzym.....	31
3.2.3.3	Spektrofotometrické metody	31
3.2.3.4	Metody využívající biosenzory	31
3.2.3.5	Eliminace zkreslení výsledků testů pro BACE1 inhibici.....	32
3.2.4	Inhibitory BACE1 rostlinného původu	32
3.3	Antioxidační aktivita.....	34
3.4	<i>Corydalis cava</i> (L.) Schweigg. & Koerte (Fumariaceae).....	36
3.4.1	Taxonomické zařazení.....	36
3.4.2	Botanická charakteristika	36
3.4.2.1	Morfologický popis	37
3.4.2.2	Stanoviště a rozšíření	37
3.4.3	Obsahové látky.....	37
3.4.3.1	Isochinolinové alkaloidy dymnivky duté.....	37
3.4.4	Biologická aktivita obsahových látek	39
3.4.4.1	Dymnivka dutá v lidovém léčitelství	39
3.4.4.2	Přehled biologických aktivit alkaloidů dymnivky duté.....	39
3.5	Alzheimerova choroba	47
3.5.1	Charakteristika nemoci.....	47
3.5.2	Léčiva používaná v současnosti	48
3.5.2.1	Inhibitory cholinesteras	49
3.5.2.2	Inhibitory NMDA receptorů.....	49

3.5.3	Perspektivní přírodní látky pro terapii Alzheimerovy choroby	49
3.5.3.1	Inhibitory cholinesteras	49
3.5.3.2	Další farmakoterapeutické postupy	51
4.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	52
4.1	Materiál	52
4.1.1	Chemikálie	52
4.1.2	Rozpouštědla	53
4.1.3	Pufry	53
4.1.3.1	Stanovení cholinesterasové inhibiční aktivity	53
4.1.3.2	Stanovení hrBACE1 inhibiční aktivity	54
4.1.3.2.1	FRET assay	54
4.1.3.2.2	hrBACE1-IMER assay	54
4.1.4	Materiál pro měření BACE1 inhibice	54
4.1.5	Chromatografické adsorbenty	54
4.1.6	Vyvíjecí soustavy pro tenkovrstvou chromatografii (TLC)	54
4.1.7	Pomocné materiály a roztoky	55
4.1.8	Přístroje	55
4.1.9	Rostlinný materiál	56
4.2	Metody	57
4.2.1	Obecné postupy	57
4.2.1.1	Příprava a čištění rozpouštědel	57
4.2.1.2	Odpařování extraktů a frakcí	57
4.2.1.3	Sušení extraktů, frakcí, izolovaných čistých látek a jejich skladování	57
4.2.1.4	Detekce alkaloidů	57
4.2.1.4.1	TLC detekce	57
4.2.1.4.2	Detekce alkaloidů v roztoku	58
4.2.1.5	Příprava sloupcové chromatografie se silikagelem	58
4.2.1.6	Příprava litých vrstev pro preparativní TLC	58
4.2.1.7	Příprava alkaloidních koncentrátů	58
4.3	Izolace alkaloidů	59
4.3.1	Screening cholinesterasové inhibiční aktivity alkaloidů dymnivky duté: bio-guided assay využívající Ellmanovu metodu	59
4.3.1.1	Příprava sumárního alkaloidního extraktu pro screening	59
4.3.1.2	Cholinesterasová aktivita sumárního alkaloidního extraktu	60

4.3.2	Izolace isochinolých alkaloidů pro biologické testy	60
4.3.2.1	Příprava alkaloidních koncentrátů.....	60
4.3.2.2	Separace alkaloidního výtřepku A na chromatografickém sloupci.....	62
4.3.3	Strukturní analýza	64
4.3.3.1	MS analýza.....	64
4.3.3.2	NMR analýza.....	64
4.3.3.3	Optická otáčivost.....	64
4.3.3.4	Teplota tání.....	64
4.4	Testování biologických aktivit izolovaných látek.....	65
4.4.1	Stanovení antiradikálové aktivity DPPH testem	65
4.4.2	Stanovení cholinesterasové aktivity Ellmanovou metodou	66
4.4.2.1	Příprava erythrocytárních pouzder	66
4.4.2.2	Inhibice acetylcholinesterasy a butyrylcholinesterasy	66
4.4.3	Stanovení inhibice hrBACE1	67
4.4.3.1	Stanovení potenciální interference alkaloidů se substrátem M-2420.....	67
4.4.3.2	Testování inhibice hrBACE1	67
4.4.3.2.1	FRET assay	67
4.4.3.2.2	hrBACE1-IMER assay	68
5.	VÝSLEDKY	70
5.1	Strukturní analýza izolovaných alkaloidů	70
5.1.1	(+)-Bulbokapnin (JC-1).....	70
5.1.1.1	MS analýza	70
5.1.1.2	NMR analýza.....	70
5.1.1.3	Optická otáčivost.....	70
5.1.2	(+)-Kanadin (JC-2).....	71
5.1.2.1	MS analýza	71
5.1.2.2	NMR analýza.....	71
5.1.2.3	Optická otáčivost.....	71
5.1.3	(+)-Korydalin (JC-3)	72
5.1.3.1	MS analýza	72
5.1.3.2	NMR analýza.....	72
5.1.3.3	Optická otáčivost.....	72
5.1.4	(-)-Korykavamin (JC-4).....	73
5.1.4.1	MS analýza	73

5.1.4.2	NMR analýza.....	73
5.1.4.3	Optická otáčivost.....	73
5.1.5	(+)-Tetrahydropalmatin (JC-5).....	74
5.1.5.1	MS analýza.....	74
5.1.5.2	NMR analýza.....	74
5.1.5.3	Optická otáčivost.....	74
5.1.6	(+)-Korynolin (JC-6).....	75
5.1.6.1	MS analýza.....	75
5.1.6.2	NMR analýza.....	75
5.1.6.3	Optická otáčivost.....	75
5.1.7	(±)-Korykavidin (JC-7).....	76
5.1.7.1	MS analýza.....	76
5.1.7.2	NMR analýza.....	76
5.1.7.3	Optická otáčivost.....	76
5.1.8	(+)-Kanadalin (JC-8).....	77
5.1.8.1	MS analýza.....	77
5.1.8.2	NMR analýza.....	77
5.1.8.3	Optická otáčivost.....	77
5.1.9	Allokryptopin (JC-9).....	78
5.1.9.1	MS analýza.....	78
5.1.9.2	NMR analýza.....	78
5.1.9.3	Optická otáčivost.....	78
5.1.10	(+)-Korydin (JC-10).....	79
5.1.10.1	MS analýza.....	79
5.1.10.2	NMR analýza.....	79
5.1.10.3	Optická otáčivost.....	79
5.1.11	(-)-Isokorypalmin (JC-11).....	80
5.1.11.1	MS analýza.....	80
5.1.11.2	NMR analýza.....	80
5.1.11.3	Optická otáčivost.....	80
5.1.12	(+)-Korypalmin (JC-12).....	81
5.1.12.1	MS analýza.....	81
5.1.12.2	NMR analýza.....	81
5.1.12.3	Optická otáčivost.....	81

5.1.13	(–)-Skulerin (JC-13)	82
5.1.13.1	MS analýza	82
5.1.13.2	NMR analýza.....	82
5.1.13.3	Optická otáčivost.....	82
5.1.14	(–)-Sinoakutin (JC-14)	83
5.1.14.1	MS analýza	83
5.1.14.2	NMR analýza.....	83
5.1.14.3	Optická otáčivost.....	83
5.1.15	(+)-N-methylaurotetanin (JC-15).....	84
5.1.15.1	MS analýza.....	84
5.1.15.2	NMR analýza.....	84
5.1.15.3	Optická otáčivost.....	84
5.2	Biologické testy izolovaných alkaloidů z hlíz dymnivky duté	85
5.2.1	Inhibiční aktivita vůči AChE a BuChE	85
5.2.2	Antiradikálová aktivita	85
5.2.3	Inhibice hrBACE1	86
5.2.3.1	Stanovení potenciální interference testovaných látek	86
5.2.3.1.1	Fluorescenční spektra JC1-15	86
5.2.3.1.2	UV spektra JC-1 až JC-15	87
5.2.3.2	Inhibiční aktivita izolovaných alkaloidů vůči hrBACE1	88
6.	DISKUSE	89
6.1	Výběr rostlinné drogy pro izolaci sekundárních metabolitů	89
6.2	Izolace alkaloidů	89
6.3	Cholinesterasová inhibiční aktivita izolovaných alkaloidů.....	90
6.4	Antiradikálová aktivita izolovaných alkaloidů	92
6.5	Inhibice hrBACE1	94
6.5.1	Výběr substrátu	94
6.5.2	FRET assay	94
6.5.3	hrBACE1-IMER assay	95
6.6	Shrnutí dosažených výsledků	95
7.	ABSTRAKT	98
8.	ABSTRACT	100
9.	PŘEHLED PUBLIKACÍ.....	102
9.1	Původní práce.....	102

9.2	Přehledy.....	102
9.3	Monografie	102
9.4	Konference	103
9.4.1	Přednášky	103
9.4.2	Plakátová sdělení.....	103
9.4.3	Účelové finanční podpory	104
10.	LITERATURA.....	105

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A VYSVĚTLIVEK

AAPH	2,2'-azobis(2-aminopropan) dihydrochlorid
ABTS	2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonová kyselina)
ACE	angiotensin konvertující enzym
AD	Alzheimerova choroba
Ach	acetylcholin
AChE	acetylcholinesterasa
APP	amyloidní prekurzorový protein
APLP1	APP-like protein 1
APLP2	APP-like protein 2
AST	aspartátaminotransferasa
ATChI	acetylthiocholinjodid
ATCh	acetylthiocholin
ATPasa	adenosin trifosfatasa
A β	β -amyloidní peptid
AUC	plocha pod křivkou
BAPNA	<i>N</i> - α -benzoyl-D,L-arginin- <i>p</i> -nitroanilid
BTChI	butyrylthiocholinjodid
BuChE	butyrylcholinesterasa
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
cGMP	cyklický guanosinmonofosfát
CHAPS	3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonát
CNS	centrální nervová soustava
CYP	cytochrom P
ČsL 4	Československý lékopis 4. vydání
DIOS-TOF MS	desorption/ionization on silicon time-of-flight mass spectrometry
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DPPH	2,2'-difenyl-1-pikrylhydrazyl radikál
DTNA	dithionikotinová kyselina
DTNB	5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina
EDA	ethylendiamin

EDA-CIM disk	ethylendiamine monolithic convective interaction media disk
ESI-MS	hmotnostní spektrometrie s elektrosprejovou ionizací
FRAP	ferric reducing ability of plasma
FRET	fluorescenční rezonanční přenos energie
GABA	γ -aminomáslená kyselina
GIT	trávicí ústrojí
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová kyselina
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie
hrBACE1	lidská rekombinantní β -sekretasa 1
Hup A	huperzin A
IL	interleukin
IMER	imobilizovaný enzymový reaktor
K_m	Michaelisova konstanta
LC	kapalinová chromatografie
MAO	monoaminoxidasa
MS	hmotnostní spektrometrie
NFT	pleteně neurofibril
NF- κ B	transkripční nukleární faktor kappa B
NGF	nervový růstový faktor
NMDA	<i>N</i> -methyl-D-aspartát
NMR	nukleární magnetická rezonance
NO	oxid dusnatý
NT	netestováno
ORAC	oxygen radical absorbance capacity
PKC	proteinkinasa C
QDs	polovodičové nanočástice „quantum dots“
R _f	retenční faktor
RONS	reactive oxygen and nitrogen species
SIA	sekvenční injekční analýza
TLC	tenkovrstvá chromatografie
TNF- α	faktor nádorové nekrózy α
UV-MS	hmotnostní spektrometrie spojená s UV detekcí

PŘEHLED SCHÉMAT A OBRÁZKŮ

Obr. 1	Princip Ellmanovy metody.....	7
Obr. 2	Reakce AChE s α -naftylacetátem a vznik azobarviva purpurové barvy.....	8
Obr. 3	Schéma principu FRET metody pro stanovení aktivity BACE1.....	30
Obr. 4	<i>Corydalis cava</i> (L.) Schweigg. et Koerte	36
Obr. 5	Strukturní typy isochinolinových alkaloidů dymnivky duté	38
Obr. 6	Patogeneze Alzheimerovy choroby.....	48
Obr. 7	(-)-huperzin A	50
Obr. 8	Schéma přípravy alkaloidních koncentrátů	61
Obr. 9	(+)-bulbokapnin.....	70
Obr. 10	(+)-kanadin	71
Obr. 11	(+)-korydalin	72
Obr. 12	(-)-korykavamin.....	73
Obr. 13	(+)-tetrahydropalmin	74
Obr. 14	(+)-korynolin	75
Obr. 15	(\pm)-korykavidin	76
Obr. 16	(+)-kanadalin	77
Obr. 17	allokryptopin	78
Obr. 18	(+)-korydin	79
Obr. 19	(-)-isokorypalmin	80
Obr. 20	(+)-korypalmin	81
Obr. 21	(-)-skulerin.....	82
Obr. 22	(-)-sinoakutin	83
Obr. 23	(+)-N-methylaurotetanin	84
Obr. 24	Porovnání fluorescenčních spekter JC-1 až JC-15 a slepého vzorku se spektrem enzymové aktivity	87
Obr. 25	Porovnání UV spekter JC 1-15, substrátu M-2420 a enzymové aktivity.....	87

PŘEHLED TABULEK

Tab. 1	Inhibitory cholinesteras z čeledi Amaryllidaceae	14
Tab. 2	Inhibitory z čeledi Buxaceae	14
Tab. 3	Inhibitory z čeledi Papaveraceae	16
Tab. 4	Inhibitory z čeledi Fumariaceae	17
Tab. 5	Inhibitory cholinesteras z ostatních čeledí	18
Tab. 6	Monoterpenové a seskviterpenové inhibitory cholinesteras	20
Tab. 7	Silice jako inhibitory cholinesteras	21
Tab. 8	Diterpenové inhibitory cholinesteras	22
Tab. 9	Triterpenové inhibitory cholinesteras.....	23
Tab. 10	Steroidní inhibitory cholinesteras.....	23
Tab. 11	Flavonoidni inhibitory cholinesteras	24
Tab. 12	Kumarinové inhibitory cholinesteras	25
Tab. 13	Xanthonové inhibitory cholinesteras.....	25
Tab. 14	Lignanové inhibitory cholinesteras	26
Tab. 15	Fenolové inhibitory cholinesteras různých strukturních typů	26
Tab. 16	Ostatní inhibitory cholinesteras různých strukturních typů	27
Tab. 17	Inhibitory BACE1 rostlinného původu	32
Tab. 18	Cholinesterasová inhibiční aktivita alkaloidního extraktu dymnivky duté.....	60
Tab. 19	Složení testovaných vzorků v kyvetě při měření fluorescenčních a UV spekter	67
Tab. 20	Hodnoty IC ₅₀ (μM) izolovaných alkaloidů vůči AChE a BuChE	85
Tab. 21	Hodnoty EC ₅₀ (μM) izolovaných alkaloidů.....	85
Tab. 22	Hodnoty IC ₅₀ (μM) izolovaných alkloidů (FRET a hr BACE1-IMER assay)	88

1. ÚVOD

Rostliny produkují nepřehledné množství organických látek vykazujících významnou biologickou aktivitu včetně toxických účinků. Mezi obsahové látky rostlin často patří metabolity vykazující inhibiční aktivitu vůči enzymovým systémům, které se vyvinuly, aby chránily rostlinu před infekcemi a predátory^{1,2}. Zajímavou skupinu látek představují sloučeniny inhibující enzymy v CNS, zejména inhibitory zvyšující hladinu biogenních aminů. K tomuto typu inhibitorů náleží i látky inhibující acetylcholinesterasu a butyrylcholinesterasu. Inhibiční cholinesterasy vykazují látky různých strukturních typů a nacházejí se nejen u vyšších rostlin, ale také u hub, řas a sinic^{3,4,5,6,7}. Jedná se zejména o alkaloidy, dále terpeny a látky odvozené od šikimové kyseliny³. K nejznámějším inhibitorům cholinesteras přírodního původu patří fysostigmin (*Physostigma venenosum*, Fabaceae), terapeuticky používaný galanthamin (vyskytující se hojně v čeledi Amaryllidaceae) a perspektivní terapeutická látka huperzin A (*Huperzia serrata*, Huperziaceae)⁸. Zajímavá cholinesterasová inhibiční aktivita byla rovněž zjištěna u alkaloidních extraktů taxonů čeledi Fumariaceae^{9,10,11}.

Jednou z rostlin, která působí jak toxicky, tak i terapeuticky, je dymnivka dutá (*Corydalis cava* (L.) Schweigg. & Koerte, Fumariaceae), dříve běžně používaná léčivá rostlina^{3,12,13}, obsahující isochinolinové alkaloidy různých strukturních typů^{12,14,15}. Aporfinový alkaloid bulbokapnin, z kvantitativního hlediska nejvíce v rostlině zastoupený, má z toxikologického pohledu unikátní vliv na CNS – indukuje katatonický stav označovaný jako „bulbokapninová ztuhlost“, která se projevuje zpomalením kognitivních schopností a bizarními pohyby končetin^{16,17}. Vysoké dávky bulbokapninu vedou k tremoru a klonickým křečím, velmi vysoké a letální dávky pak k poškození oběhového systému a respirační paralýze¹⁸. Teprve nedávno byla u některých látek, izolovaných z *C. cava*, zjištěná signifikantní inhibiční cholinesterasová aktivita¹³.

Studium rostlin, u nichž je historicky prokázána toxicita v důsledku obsahu sekundárních metabolitů typu malých molekul, přináší v poslední době poznatky nejen toxikologické. Tyto sloučeniny mohou být kandidáty nových léčiv, jak se ukazuje i v případě některých isochinolinových alkaloidů inhibujících cholinestrasy, především acetylcholinesterasu. Tyto látky by se mohly příznivě uplatnit v symptomatické léčbě neurodegenerativních onemocnění (zejména Alzheimerovy choroby), neuromuskulárních onemocnění

(myastenia gravis), léčbě glaukomu a jako antidotum při otravě anticholinergními látkami^{3,19,20,21}.

2. CÍL PRÁCE

Cílem této práce bylo:

- 1) izolace terciárních isochinolinových alkaloidů z diethyleterového výtřepku (pH 9–10), obsahujícího alkaloidy nižší až střední bazicity, který byl připraven ze sumárního extraktu z hlíz *Corydalis cava* (L.) Schweigg. & Koerte (Fumariaceae). Izolace alkaloidů z dymnivky duté byla vybrána na základě výsledku screeningu sumárních rostlinných extraktů, které by mohly obsahovat potenciální inhibitory cholinesteras, uvedených v absolventské práci Lucie Řepové prováděné na katedře farm. botaniky a ekologie, Farm. fakulty v Hradci Králové, Univerzity Karlovy v Praze²².
- 2) stanovení fyzikálně-chemických vlastností izolovaných látek (optická otáčivost) a struktury MS a NMR analýzou.
- 3) provést stanovení vybrané biologické aktivity čistých izolovaných látek (inhibice lidská erytrocytární acetylcholinesterasy a lidské sérové butyrylcholinesterasy a stanovení antiradikálové aktivity DPPH testem, inhibice humánní rekombinantní β -sekretasy).
- 4) po výpočtu hodnot IC_{50} a EC_{50} (statistickým programem GraphPad Prism 5.02 software) navrhnout nejúčinnější látky pro hlubší biologické studium z hlediska vlivu na neurodegenerativní onemocnění.

3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Inhibice acetylcholinesterasy a butyrylcholinesterasy

3.1.1 Význam acetylcholinu v organismu

Acetylcholin (ACh), jeden z hlavních neurotransmiterů v tělech členovců a obratlovců, působí nejen v periferním nervovém systému, ale má významnou úlohu i v CNS. Je odpovědný za přenos elektrických signálů přenášených nervovými buňkami na jinou nervovou buňku, nebo na hladké a příčně pruhované svalstvo. Nervovou stimulací uvolněný ACh vyvolává své účinky interakcí se dvěma hlavními typy receptorů – nikotinovými a muskarinovými²¹.

Nikotinové receptory jsou lokalizované především na nervosvalové ploténce a na postsynaptické membráně ve vegetativních gangliích, ve dřeni nadledvin a v CNS. Stimulace nikotinových receptorů v mozku vlivem ACh je spojována s kognitivními procesy a pamětí, zatímco v kosterních svalech způsobuje kontrakce. Muskarinové receptory se nacházejí v CNS, periferních neuronech, parietálních buňkách žaludku, v srdci, ve žlázách (slinných, bronchiálních, slzných a potních) a v hladké svalovině. Symptomy stimulace muskarinových receptorů jsou snížení tepové frekvence, krevního tlaku, bronchokonstrikce, zvýšení salivace, sekrece žláz, tonu a motility hladkého svalstva v GIT, zvýšení sekrece slzných, slinných a potních žláz a akomodace očí na blízko²¹.

ACh je skladován v parasympatických nervových zakončeních ve vesikulách, pouze malá část se vyskytuje extravesikulárně, v cytoplazmě nervového zakončení²¹.

3.1.2 Acetylcholinesterasa a butyrylcholinesterasa

Při depolarizaci nervového zakončení dochází k vylití obsahu vesikul, ACh vstupuje do synapsí a váže se na receptor. Účinek ACh je velmi rychle ukončen jeho rozkladem na cholin a kyselinu octovou. Enzymy odpovědné za ukončení účinku ACh jsou acetylcholinesterasa (AChE) a butyrylcholinesterasa (BuChE)²¹.

V těle savců se AChE (EC 3.1.1.7) vyskytuje ve třech formách mající stejná katalytická místa, ale liší se v C-terminálních proteinech. Monomerní rozpustná forma (G1) se vyskytuje především během vývoje a v mozku myši byla vyvolána stresem; dimerní forma (G2) se nachází v erytrocytech, kdežto tetramerní forma (G4) v mozku a ve svalech²³. AChE hydrolyzuje především ACh uvolněný do synaptické štěrbině a uvnitř nervových

zakončení odpovídá za rozklad cytoplazmatického ACh^{21,24}. Nedávno bylo zjištěno, že AChE hraje nejen roli v neurotransmisi, ale má i další funkce. Mezi tyto „neklasické role“ AChE patří funkce adhezivního proteinu (účastní se vývoje a životaschopnosti synapse)²⁵; v osteoblastech zprostředkovává interakce mezi buňkou a jejím matrix (mimobuněčným prostorem)²⁶; interaguje se základním membránovým proteinem lamininem²⁷ a účastní se neuritového růstu²⁸. V mozku pacientů s Alzheimerovou chorobou AChE urychluje shlukování A β do amyloidních vláken²⁹; je rovněž spojována s amyloidním plakem³⁰ a komplex AChE/A β vykazuje větší neurotoxicitu než vlákna obsahující pouze A β ³¹.

Druhým hydrolytickým enzymem je substrátově méně specifická BuChE (EC 3.1.1.8). Role BuChE v lidském organismu je dosud obtížně interpretovatelná. Hydrolyzuje butyrylcholin, ale i toxické látky s esterovou vazbou (např. kokain) a je spojována s detoxikační funkcí v organismu²⁴. Nachází se v plazmě, játrech a lidském mozku. V lidském mozku byla BuChE nalezena v neuronech a gliových buňkách. BuChE hraje pravděpodobně určitou minoritní roli v regulaci hladiny mozkového ACh. Aktivita BuChE v mozku se zvyšuje věkem a je zvýšená také u pacientů s Alzheimerovou chorobou (AD), zatímco aktivita AChE zůstává nezměněna, resp. se snižuje³².

3.1.3 Inhibitory cholinestras

3.1.3.1 *Mechanismus působení*

AChE i BuChE patří do skupiny serinových hydrolas. Enzym má dvě důležité oblasti – anionické místo a esterové, aktivní místo. Inhibice enzymu může probíhat jak na anionickém místě, tak i na aktivním centru enzymu. Existují náznaky, že některé inhibitory se váží na obě místa a podle toho se hovoří o duálním účinku. Princip účinků všech inhibitorů cholinestras je podobný, rozdíly mezi působením jednotlivých inhibitorů odráží povahu reakce inhibitoru s enzymem, a tedy rozdílnou rychlost uvolňování (deacetylaci) enzymu. Podle toho rozdělujeme inhibitory na reverzibilní, pseudoreverzibilní a ireverzibilní. Ireverzibilní inhibitory vytvářejí mimořádně pevnou kovaletní vazbu s enzymem a hydrolyzují se buď velmi pomalu, nebo vůbec^{3,21}.

3.1.3.2 *Použití*

Inhibitory AChE našly uplatnění ve dvou hlavních oblastech, jako léčiva a jako pesticidy. Daleko menší oblast užití našly jako chemické bojové látky. Posledně jmenovaná skupina

obsahuje látky syntetického původu. V terapii se inhibitory AChE používají:

- k prevenci a léčbě postoperačních atonií trávicího ústrojí a močových cest,
- k vyvolání miózy a léčbě glaukomu (dříve se užíval fysostigmin),
- jako antidotum periferních kompetitivních myorelaxancií a při otravě nebo předávkování parasymptolytiky (např. atropinem),
- k léčbě myastenia gravis – dnes se používají analoga fysostigminu s kvarterním dusíkem (neostigmin a pyridostigmin), protože distribuce fysostigminu v těle není omezena jen na periferní nervový systém,
- v symptomatické léčbě lehké až střední formy AD se používají selektivní inhibitory AChE (galanthamin, rivastigmin – analog fysostigminu) a dalších demenci^{19,20,21}.

Hlavní uplatnění inhibitorů AChE se nachází v zemědělství, kde se užívají k potlačení hmyzích škůdců a jejich účinek je založen na silné stimulaci cholinergního systému. Původně se používaly látky odvozené od bojových látek – organofosfátů, které se váží na AChE ireverzibilně, dnes se používají méně toxické karbamáty, o kterých se dá říci, že byly odvozené od fysostigminu, neboť karbamátová skupina fysostigminu je nezbytná část pro zachování jeho anticholinesterasové aktivity.

3.1.4 Detekce cholinesterasové inhibice

K nalezení nových inhibitorů cholinesteras a kvantifikaci jejich aktivit je nutné používat vhodné screeningové postupy, které jsou rychlé a testování vzorků má být dosaženo s co nejmenším možným úsilím. Pro testování nových potenciálních inhibitorů byla popsána řada metod. Mezi nejčastěji používané metody patří ty, které můžeme rozdělit podle využívaných principů:

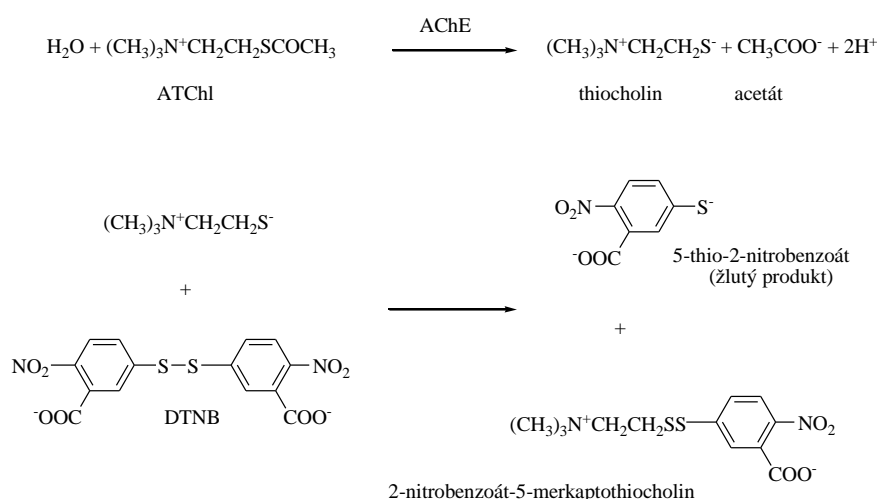
- a) testy založené na barevné reakci (detekce na TLC a spektrofotometrické metody),
- b) testy využívající fluorescenční detekci,
- c) testy založené na radiometrických metodách,
- d) testy využívající hmotnostně-spektrometrickou detekci,
- e) testy využívající imobilizovaného enzymu.

Další, méně používané testy pro stanovování aktivity a inhibice cholinesteras využívají metody s difraktometrickou detekcí, diagnostické proužky a tyčinky, elektrochemické biosenzory (vodivostní, potenciometrické, amperometrické a voltametrické), optické biosenzory, fototermální biosenzory, krystalické křemíkové mikrováhové biosenzory a různé techniky využívající čipy³³.

3.1.4.1 Testy založené na barevné reakci

Největší počet metod je založen na Ellmanově principu, která používá jako substráty estery thiocholinu – acetylthiocholinjodid (ATCI) a butyrylcholinjodid (BTICI), jež jsou esterami štěpeny na thiocholin a příslušnou kyselinu. Thiocholin následně reaguje s 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoovou kyselinou (DTNB) za vzniku žlutého aniontu 5-thio-2-nitrobenzoátu (obr. 1)³⁴.

Tato metoda byla přizpůsobena více modifikacemi pro měření v mikroměřítku, neboť původně se pro stanovení inhibice cholinesteras používalo spektrofotometrické stanovení v kyvetách³⁴. Tak vznikly upravené metody využívající pro stanovení mikrotitrační desičky (snížení množství použitých enzymů, ale i reagensů) lišící se navzájem v měření reakčního času^{35,36,37,38,39}.



Obr. 1 Princip Ellmanovy metody

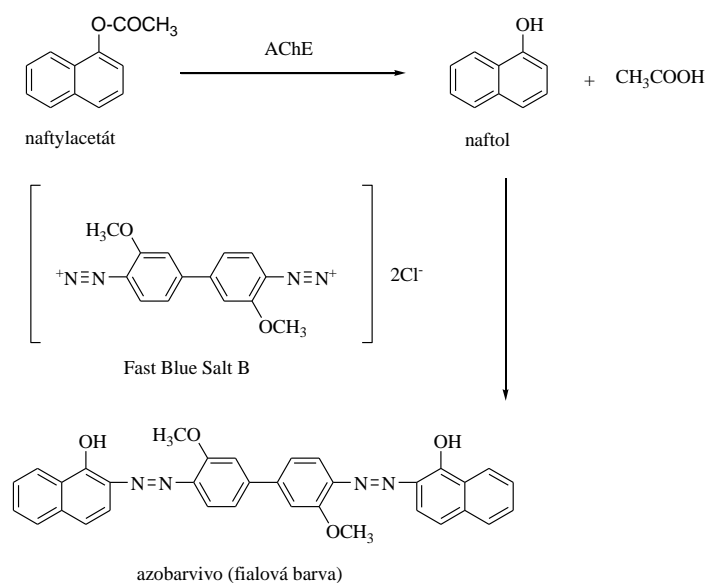
Další úpravy Ellmanova způsobu se týkaly změny v posunu měření absorbance z původních $\lambda = 412 \text{ nm}$ na $\lambda = 436 \text{ nm}$ a 450 nm ^{38,40}. Posun měření absorbance na 436 nm nebo na 450 nm je výhodný při použití lidské erytrocytární AChE a BuChE z plasmy z hlediska interference absorbance hemoglobinu (tzv. Soretův pás) a měřeného reakčního žlutého produktu v $\lambda = 410 \text{ nm}$ ^{38,40}. Alternativní metodou při používání lidské erytrocytární AChE je použití jiného činidla místo DTNB – dithionikotinové kyseliny (DTNA), u které se měří absorbance při $\lambda = 344 \text{ nm}$ ⁴¹.

Pro rychlý screening nových inhibitorů AChE s velkým množstvím vzorků byla Ellmanova metoda modifikována pro tenkovrstvou chromatografii (TLC), při níž se přítomnost inhibitoru ve vzorku projeví po 5 minutách jako bílá skvrna na žlutém pozadí⁴². Nevýho-

dou této metody je častý výskyt falešně pozitivních reakcí, které vznikají nikoliv na základě inhibice enzymu, ale chemickou reakcí DTNB a thiocholinu⁴³.

Jinou techniku detekce inhibitorů cholinesteras vyvinul Ingkaninan a spol., který modifikoval Ellmanovu metodu pro HPLC spojené s UV-MS detekcí. Přítomnost inhibitoru v systému se projevuje jako negativní pík. Tato metoda má omezení v použití určitých organických rozpouštědel, protože některá organická rozpouštědla mají výrazný inhibiční účinek na aktivitu enzymu³⁵.

Jiná metoda pro TLC je založena na enzymovém štěpení AChE α -naftyl-acetátu a následné reakci α -naftolu s Fast Blue Salt B za vzniku fialové barvy (obr. 2). Vyvinutá chromatografická deska s testovanými vzorky se postříká roztokem s enzymem a ponechá se inkubovat 20 minut při teplotě 37 °C. Následně se látky detegují směsí α -naftyl-acetátu a Fast Blue Salt B. Po 1–2 minutách se inhibitory enzymu jeví jako bílé skvrny na fialovém pozadí desky. Barevný kontrast v této metodě je mnohem větší než v případě Ellmanovy metody na TLC⁴⁴.



Obr. 2 Reakce AChE s α -naftylacetátem a vznik azobarviva purpurové barvy

Pro stanovení aktivity cholinesteras v lidské krvi se používá i multienzymová metoda, která využívá jako substrát benzoylcholin, který je štěpen cholinesterasou za vzniku cholinu, následně oxidovaného cholinoxidasou. Vzniklý betain reaguje s fenolem a 4-aminofenazonem za vzniku chinoniminu (růžový produkt), jehož obsah je měřen spektrofotometricky při $\lambda = 500 \text{ nm}$. Při této vlnové délce nedochází k interferenci s hemoglobinem⁴⁵.

Při spektrofotometrické detekci aktivity a inhibice AChE našly uplatnění i nanočástice zlata. Pavlov a spol. publikoval metodu, která je založena na acetylcholinesterasou stimulovaném růstu nanočástic zlata. AChE hydrolyzuje ATCh za vzniku redukujícího thiocholinu, který stimuluje zvětšení nanočástic zlata v přítomnosti chloridu zlatičitého. Redukční zvětšení nanočástic zlata je závislé jak na koncentraci substrátu, tak i na enzymové aktivitě⁴⁶.

Wang a spol. informoval o možném využití metody, ve které AChE hydrolyzuje ATCh za vzniku thiocholinu, který indukuje agregaci nanočástic zlata v důsledku vzniku křížových vazeb mezi nanočásticemi. To má za následek posun absorbance v důsledku mezičásticových interakcí agregátu. Metoda je vhodná nejen pro zjištění aktivity AChE, ale i pro screening AChE inhibitorů⁴⁷.

3.1.4.2 Testy využívající fluorescence

Fluorescenční testy poskytují vyšší citlivost a nižší detekční limity. Všeobecně mají o několik řádů vyšší citlivost než odpovídající chromogenní metody. Fluorescenční činidla jsou stabilní a produkují dlouhotrvající fluorescenční záření s širokým pásem vlnových délek pro excitaci. Pro stanovení inhibiči cholinesteras lze použít testy s nefluorescenčními substráty, které vykazují srovnatelnost citlivost: resorufin-butyrátu a indoxyl-acetátu, které jsou štěpeny cholinesterasou za vzniku vysoce fluorescenčních látek – resorufinu a 3-hydroxyindolu. Hydrolýza indoxyl-acetátu je mnohem rychlejší než resorufin-butyrátu, má větší stabilitu vůči spontánní hydrolýze a větší rozdíl mezi excitační a emisní vlnovou délkou (resorufin: $\lambda_{\text{ex}} = 540\text{--}570$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 580$ nm a 3-hydroxyindol: $\lambda_{\text{ex}} = 395$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 470$ nm). Resorufin vykazuje výraznější fluorescenci, která umožňuje použít menší množství substrátu⁴⁸.

Parvari a spol. monitoroval reakci thiocholinu s fluorogenní látkou *N*-[4-(7-diethylamino-4-methylkumarin-3-yl)]fenylimidem kyseliny jablečné, jejímž produktem je vznik intenzivního fluorescenčního produktu. Tato metoda dovoluje stanovit hladiny thiocholinu v pikomolárních koncentracích⁴⁹.

Dalšími substráty pro fluorescenční detekci v rámci inhibice cholinesteras jsou β -naftyl-acetát, který po hydrolýze uvolňuje vysoce fluoreskující produkt β -naftol⁵⁰ a 10-acetyl-3,7-dihydroxyfenoxazin (Amplex Red činidlo) a který se používá v kitu Amplex Red Acetylcholine/AChE (Molecular Probes, Inc.). Tento kit poskytuje velmi citlivou metodu kontinuálního monitorování aktivity AChE. Amplex Red činidlo je citlivým

činidlem na uvolněný peroxid vodíku. Princip metody je založen na štěpení acetylcholinu AChE, následně je uvolněný cholin oxidován cholinoxidásou za vzniku betainu a peroxidu vodíku. Peroxid vodíku následně reaguje za přítomnosti peroxidasy s Amplex Red činidlem za vzniku vysoce fluoreskujícího resofurinu⁵¹.

Fluorescenční metody pro detekci inhibice cholinesteras byly modifikovány i pro HPLC. Ree a spol. použil jako substrát 7-acetoxy-1-methylchinoliniumjodid, který je hydrolyzován AChE za vzniku vysoce fluoreskujícího produktu 7-hydroxy-1-methylchinoliniumjodidu. Substrát je hydrolyzován AChE, a tudíž existuje menší riziko vzniku falešně pozitivních reakcí, které by mohly nastat interferencí s některými složkami rostlinného extraktu. Podobně jako u spektrofotometrických metod pro stanovení inhibice cholinesteras za použití HPLC, je procentuální zastoupení některých organických rozpouštědel v mobilní fázi limitováno, aby nedošlo k ovlivnění enzymové aktivity mobilní fáze⁵².

U jiné fluorescenční HPLC metody použili Hadd a spol. reakci mezi thiocholinem vzniklým hydrolyzou AChE a kumarinylfenylimidem kyseliny jablečné. Vzniklý thioether je detegován laserem indukovanou fluorescencí. Roztoky inhibitoru, enzymu, substrátu a derivatizačního činidla se míchávají uvnitř kanálů mikročipu užívajícího počítačem kontrolovaný elektrokinetický transport. Inhibitory produkují negativní pík, kompetitivní inhibitory gaussovský pík a široký negativní pík produkují ireverzibilní inhibitory⁵³.

Pro fluorescenční detekci inhibice AChE byla vyvinuta také metoda používající polovodičové nanočástice nazývané „quantum dots“ (QDs) s unikátními fluorescenčními vlastnostmi. Jejich velikostně kontrolované fluorescenční vlastnosti a vysoké fluorescenční kvantové výtěžky z nich vytvářejí skvělé optické markery pro biodetekci. Princip metody je založen na kontrole fotofyzikálních vlastností QDs peroxidem vodíku. AChE hydrolyzuje acetylcholin za vzniku cholinu, který je následně oxidován cholinoxidásou na betain a peroxidu. Peroxid vodíku zhasí luminiscenci nanočástic. Zvýšená koncentrace hladin inhibitoru snižuje obsah enzymaticky produkovaného peroxidu vodíku, a tudíž se snižuje míra zhasení nanočástic⁵⁴.

3.1.4.3 Testy založené na radiometrických metodách

Radiometrické metody testování aktivity cholinesterasy jsou zmiňovány velmi vzácně. Aktivita AChE a účinek inhibitorů může být změřen mírou hydrolyzy ¹⁴C značeného acetylcholinu na ¹⁴C kyselinu octovou, jejíž množství se kvantifikuje z hlediska uvolněného

^{14}C oxid uhličitý, který se získá reakcí ^{14}C kyseliny octové s ^{14}C uhličitánem sodným. Množství uvolněného oxidu uhličitého se měří v ionizovaném komorovém systému. Produkovaný oxid uhličitý je úměrný množství hydrolyzovaného acetylcholinu. Tato metoda je rychlá, jednoduchá, poměrně levná a může být automatizována⁵⁵.

Jiná radiometrická metoda pro detekci aktivity cholinesterasy je založena na separaci ^3H značeného acetylcholinu, který se separuje od svých produktů extrakcí organickými rozpouštědly z vodného prostředí. ^3H značený acetylcholin se enzymaticky hydrolyzuje v malém reakčním objemu ve scintilační nádobce. Extrahovaný ^3H acetát může být účinně zjištěn, ale nehydrolyzované zbytky ^3H značeného acetylcholinu zůstávají neextrahovány ve vodném reakčním objemu. β -částice radioaktivního rozpadu jsou energeticky slabé a nemohou uniknout z reakčního média, aby excitovaly scintilátor. Tato metoda je vysoce reprodukovatelná, citlivá a použitelná pro rychlý screening mnoha vzorků⁵⁶.

Výhody radiometrických metod jsou jednoduchost, reprodukovatelnost, přesnost a jejich extrémní citlivost⁵⁷. Nicméně, tyto metody jsou drahé a mají problém s likvidací radioaktivního odpadu.

3.1.4.4 Testy využívající hmotnostní spektrometrickou detekci

Wall a spol. použil pro kvantifikaci reakce AChE s ACh hmotnostní spektrometrii, resp. změření množství produkovaného cholinu. Pro určení IC_{50} a K_m inhibitoru takrinu porovnával metodu využívající spojení DIOS-TOF MS s HPLC spojenou s tandemovým hmotnostním spektrometrem (LC/MS/MS). LC/MS/MS metoda ukázala široký lineární dynamický rozsah srovnatelný s metodou využívající DIOS-TOF MS detekci a může se užívat pro rychlé a přesné stanovení enzymové inhibice⁵⁸.

Spojení HPLC-MS bylo použito i pro screening inhibitorů AChE z přírodních extraktů. Aktivita AChE je monitorována po průchodu vzorku chromatografickou kolonou, kde následně se postupně smísí AChE a acetylcholin s eluátem z chromatografické kolony. Inhibitory AChE se detegují MS elektrosprejem měřením poklesu množství vznikajících produktů⁵⁹. HPLC/MS/MS metoda byla také použita pro stanovení rivastigminu a jeho hlavního metabolitu NAP 226-90⁶⁰.

3.1.4.5 Testy využívající imobilizovaný enzym

Jiný přístup k testování AChE aktivity představuje imobilizovaný (zakotvený) enzym na povrchu nosiče (stacionární fáze). Hlavní výhodou této metody je omezení ztráty enzy-

mové aktivity na minimum ve vysokých zředěních. AChE může být imobilizována na skleněných kuličkách (balotně), které byly použity jako náplň jednoduchého reaktoru pro stanovení některých organofosfátů a karbamátových insekticidů. Jako detektor byla použita skleněná pH elektroda, změny aktivity enzymu odpovídaly změnám pH, kdy substrát ACh byl přidán před a po průchodu roztoku obsahujícím inhibitor. Po regeneraci mohl být enzymový reaktor používán znovu⁶¹. Podobná metoda byla aplikována pro stanovení organofosfátových pesticidů a jejich vlivu na aktivity BuChE⁶².

Kindervater a spol. publikovali metodu s průtokovým injekčním systémem, při níž byl enzym imobilizován na magnetických částicích. Známé množství enzymu bylo inkubováno s roztokem vzorku a zbývající aktivita enzymu inverzně odpovídala množství inhibitoru ve vzorku. Aktivita byla měřena Ellmanovou metodou nebo s elektrochemickou detekcí s připojeným enzymovým reaktorem obsahující imobilizovanou cholinoxidasu⁶³.

Leon-Gonzalez a spol. publikovali metodu s imobilizovanou AChE pro stanovení pesticidů s reakční detekcí vzorku po průchodu kolonou. Látky byly separovány HPLC na koloně s reverzní fází a isokratickou elucí směsí tetrahydrofuran+voda (1:4). Činidla α -naftyl-acetát, *p*-nitrobenzondiazonium nebo Fast red GG Salt byly přidávány k eluentu a aktivita imobilizované AChE by monitorována spektrofotometricky při $\lambda = 500 \text{ nm}$ ⁶⁴.

Jiná metoda, využívající imobilizovanou AChE na stacionární fázi, byla připravena zakotvením AChE na stacionární fázi chromatografické kolony naplněné epoxidovaným oxidem křemičitým. Jako substrát byl používán ATCh a detekční činidlo DTNB, spektrofotometrická detekce probíhala při $\lambda = 412 \text{ nm}$. Analyzovány byly vzorky o různých koncentracích ATCh. Plochy píků byly porovnávány s plochami píků bez inhibitorů a byla vypočtena procentuální inhibice. Automatizace systému dovoluje kontinuálně analyzovat velké série látek⁶⁵.

Bartolini a spol. popsala metodu pro přípravu monolitického mikroimobilizovaného enzymového reaktoru (IMER). Lidská rekombinantní AChE byla kovalentně imobilizována na ethylendiaminové (EDA) monolitické interakční médium (CIM), které bylo dříve derivatizováno glutaraldehydem. Vzniklé Schiffovy baze byly redukovány kyanoborohydridem a nezreagované aldehydické skupiny byly kondenzovány s monoethanolaminem. Metoda je pak stejná jako předchozí – mobilní fáze obsahuje DTNB, nejprve je injektován samotný acetylthiocholin pro zjištění enzymové aktivity a pak ve směsi s rozdílnými koncentracemi inhibitorů. Tato metoda je vhodná pro kinetické studie a rovněž pro screening potenciálních kandidátů na léčiva⁶⁶.

IMER z předchozí metody byl porovnáván s jinou monolitickou kolonou obsahující reaktivní epoxyskupiny. Schiffovy baze vzniklé reakcí epoxyskupin s enzymem poskytovaly stabilnější reaktor než imobilizace enzymu na stacionární fázi glutaraldehydem. EDA-CIM disky dávají rychlou a opakovatelnou analýzu⁶⁷.

3.1.5 Inhibitory cholinesteras rostlinného původu

Studium účinku přírodních látek na lidské i hmyzí cholinesterasy je v současné době velice živé. Má význam ze dvou hledisek: toxikologického, při němž jsou hlouběji studovány sekundární metabolity některých historicky známých toxických rostlin. Zároveň však poznání toxicity vede k druhému hledisku: využití těchto látek jako potenciálních zdrojů nových léčiv anebo prostředků ovlivňujících mozkový metabolismus hmyzu (nové insekticidy).

Velký důraz při hledání inhibitorů cholinesteras byl kladen na alkaloidy rostlin, teprve před asi 25 roky byly v rostlinách nalezeny inhibitory nealkaloidního charakteru: terpeny, dále látky biosynteticky odvozené od šikimové kyseliny a látky různých struktur. Nedávno byly objeveny inhibitory cholinesteras pocházející z mikroorganismů a živočišného původu^{3,10,68}.

Hodnoty inhibičních aktivit látek v níže uvedených tabulkách jsou uvedeny v mikromolárních koncentracích jako IC_{50} , pokud není uvedeno jinak. Pro stanovení inhibice AChE a BuChE metodou *in vitro* byla zpravidla používána AChE z elektrického úhoře (*Electrophorus electricus*) a koňská sérová BuChE.

Následující přehled inhibitorů izolovaných z rostlin je rozdělen podle čeledí. Názvy čeledí jsou uváděny podle botanického systému Takhtajana⁶⁹.

3.1.5.1 Alkaloidní inhibitory cholinesteras

3.1.5.1.1 Inhibitory cholinesteras z čeledi Amaryllidaceae

Tab. 1 Inhibitory cholinesteras z čeledi Amaryllidaceae

Rostlina	Alkaloidní typ	Sloučenina	Aktivita IC ₅₀ (μM)		Ref.
			AChE	BuChE	
<i>Narcissus spp.</i>	galanthaminový	sangvinin	0,1	24 ^b	70,71
		galanthamin	1,07	14,1 ^b	
		11-hydroxygalanthamin	1,61	– ^d	
	lykorinový	epinorgalanthamin	9,6	– ^d	70
		oxoasoanin	47,21	– ^d	
		asoanin	3,87	– ^d	
<i>Zephyranthes robusta</i> Baker	galanthaminový	pseudolykorin	152,32	– ^d	72
	krininový	galanthamin	6,9 ^c	156 ^b	
		hippeastidin	102,53 ^c	877,54 ^b	
<i>Crinum moorei</i> Hook.f.	krininový	epivittatin	789,92 ^c	>1000 ^b	73
		krinin	461	– ^d	
		krinamidin	300	– ^d	
	epivittatin	239	– ^d		
<i>Crinum bulbispermum</i> (Burm.f.) Milne-Redh. & Schweick.	lykorinový	1- <i>O</i> -acetyllykorin	0,96	– ^d	73
	krininový	6-hydroxykrinamin	490	– ^d	
	tazetinový	<i>N</i> -demethyl-8α-ethoxypretazzetin	234	– ^d	
		<i>N</i> -demethyl-8β-ethoxypretazzetin	419	– ^d	
<i>Crinum macowanii</i> Baker	lykorinový	lykorin	213	– ^d	74
<i>Crinum glaucum</i> A.Chev.	krininový	hamayn	250	– ^d	
	lykorinový	lykorin	450	– ^d	
<i>Narcissus tazetta</i> subsp. <i>tazetta</i> L., <i>Galanthus ikariae</i> L.	lykorinový	lykorin	3,16/43,69 ^a	– ^d	75
	krininový	3-epihydroxybulbispermin	30,18 ^a	– ^d	
	krininový	krinin	26,53 ^a	– ^d	
<i>Galanthus ikariae</i> L.	galanthaminový	galanthamin	32,2/48 ^a	14,1 ^b	75,71
	montaninový	2-demethylmontanin	31,84 ^a	– ^d	
	galanthaminový	<i>N</i> -norgalanthamin	34,09 ^a	– ^d	
<i>Narcissus tazetta</i> subsp. <i>tazetta</i> L.	krininový	hemanthamin	20,8 ^a	– ^d	75
	ungereminový	ungeremin	0,35	– ^d	

^a inhibice v 10 μg/ml (%); ^b lidská sérová BuChE; ^c lidská erytrocytární AChE; ^d netestováno

3.1.5.1.2 Inhibitory z čeledi Buxaceae

Tab. 2 Inhibitory z čeledi Buxaceae

Rostlina	Alkaloidní typ	Sloučenina	Aktivita IC ₅₀ (μM)		Ref.
			AChE	BuChE	
<i>Sarcococca coriacea</i> (Hook.f.) Sweet	steroidní	epoxynepapakistamin A	>200	77,4	77
		funtumaftrin C	45,75	6,5	
		<i>N</i> -methylfuntumin	97,61	12,7	
<i>Sarcococca hookeriana</i> (Baill.) Hook.f.	steroidní (pregnanový)	hookerianamid A	82,7	200	78
		hookerianamid B	26,4	0,7	
		hookerianamid	23,2	0,6	
		hookerianamin A	18,9	0,9	
		phulchowkiamid A	0,5	0,4	

Tab. 2 Inhibitory z čeledi Buxaceae (pokračování)

Rostlina	Alkaloidní typ	Sloučenina	Aktivita IC ₅₀ (μM)		Ref.
			AChE	BuChE	
<i>Sarcococca hookeriana</i> (Baill.) Hook.f.	steroidní (pregnanový)	hookerianamid D	59	100,2	79
		hookerianamid E	15,9	6	
		hookerianamid F	1,6	7,2	
		terminalin	113,1	0,6	
		saligenamid A	50,6	4,6	
		sarkovagenin C	1,5	0,7	
		sarkovagenin D	2,2	2,3	
		<i>N</i> -methylepipachysamin D	10,1	3,2	80
		hookerianamid J	48,5	0,8	
		hookerianamid K	24,2	4	
		chonomorfin	28	0,5	
		<i>N</i> -methypachysamin	22,1	1,6	81
		epipachysamin-5-en-4-on	9,9	0,6	
		sarkovagin C	8,1	0,4	
		hookerianamid H	2,9	1,9	
		hookerianamid I	34,1	0,3	
		diktyoflebin	6,2	3,6	
<i>Sarcococca saligna</i> (D.Don) Müll.Arg.	steroidní (pregnanový)	5,14-dehydro- <i>N</i> -demethylsarakodin	> 200	25	82
		14-dehydro- <i>N</i> -demethylsarakodin	183,1	10,1	
		16-dehydrosarkorin	12,5	3,9	
		2,3-dehydrosarsalignon	7	32,2	
	steroidní	sarkovagenin C	187,8	1,5	83,84
		salignarin C	19,7	1,2	
		salignenamid C	61,3	38,3	
		salignenamid D	185,2	23,7	
		2β-hydroxypachysamin D	78,2	28,9	
		salignenamid E	6,21	3,6	
		salignenamid F	6,35	4,1	
		axilarin C	227,92	18	
		axilarin F	182,4	18,2	
		sarkorin	70	10,3	
		<i>N</i> -demethylsarakodin	204,2	16,5	
		saligcinamid	20	4,8	
		salignenamid A	50,64	4,6	
		vaganin A	8,59	2,3	
		5,6-dehydrosarkonidin	20,29	1,9	
		2-hydroxysalignarin E	16	6,9	
		2-hydroxysalignamin	82,5	20,9	
		salignamin	249	20,9	
		epipachysamin D	28,93	2,8	
		diktyoflebin	6,21	3,6	
		iso- <i>N</i> -formylchonomorfin	6,4	4,07	
		sarkodinin	40,04	12,5	
		axilaridin A	5,21	2,5	
		sarsalignon	7,02	2,2	
		sarsalignon	5,83	4,3	
		sarakocin	8 ^a	– ^b	
sarakodin	20 ^a	– ^b			
sarakorin	27,2 ^a	– ^b			
		alkaloid C	15,2 ^a /48,6	– ^b /10,5	85, 86
<i>Buxus papillosa</i> C.K.Schneid.	triterpenový	buxakashmiramin	25,4	0,74	87
		buxakarachiamin	143	– ^b	
		buxahejramin	162	– ^b	
		cykloprotobuxin C	38,8	2,70	
		cyklovibuxein A	105,7	2,00	
		cyklomikrofylin A	235	2,43	

Tab. 2 Inhibitory z čeledi Buxaceae (pokračování)

Rostlina	Alkaloidní typ	Sloučenina	Aktivita IC ₅₀ (μM)		Ref.
			AChE	BuChE	
<i>Buxus papillosa</i> C.K.Schneid.	triterpenový	buxamin B	7,56	– ^b	88
<i>Buxus hyrcana</i> Pojark.	triterpenový	homomoenjodaramin	19,2	– ^b	89
		moenjodaramin	50,8	– ^b	

^a inhibice (mM); ^b netestováno

3.1.5.1.3 Inhibitory z čeledi Papaveraceae

Tab. 3 Inhibitory z čeledi Papaveraceae

Rostlina	Alkaloidní typ	Sloučenina	Aktivita IC ₅₀ (μM)		Ref.
			AChE	BuChE	
Matečná rostlina neuvede- na (alkaloidy izolovány z více druhů)	protoberberinový	berberin	76 ^a	25 ^{ce}	90
	tetrahydro- protoberberinový	<i>cis-N</i> -methylstylopiniumjodid	69 ^b	15 ^{ce}	
		escholidin	85 ^b	59 ^{ce}	
		cyklanolin	44 ^b	18 ^{ce}	
	benzo- fenanthridinový	sangvinarin	49 ^b	50 ^{ce}	
	benzyl- isochinolinový	escholamin	80 ^b	52 ^{ce}	
	pavinanový	papaverin	56 ^b	8 ^{ce}	
protopinový	kalifornidin	61 ^b	9 ^{de}		
<i>Sanguinaria canadensis</i> L.	protoberberinový	protopin	38 ^b	4 ^{de}	91, 92
		protoberberin	34 ^f	> 100 ^e	
		pseudokoptisin	11 ^f	– ^g	
		13-methylberberin	8 ^f	– ^g	
		koptisin	5,8 ^f	> 100 ^e	
		pseudoepiberberin	5,1 ^f	– ^g	
	benzo- fenanthridinový	koralyn	1,3 ^f	– ^g	
		berberin	0,98 ^f	> 100 ^e	
		chelilutin	20 ^f	– ^g	
<i>Chelidonium majus</i> L.	benzo- fenanthridinový	sangvinarin	0,8 ^h /35 ^f /0,23 ⁱ	3,20 ^{ei}	93
	protoberberinový	berberin	0,5 ^h /0,98 ^f /0,23 ⁱ	26 ^e /4,60 ^{ei}	
		chelidonin	2 ⁱ	76,9 ^{ei}	
		stylopin	114 ^h	>1000 ^e	
		chelidonin	26,8 ^h	31,9 ^e	
protopinový	homochelidonin	350 ^h	62,3 ^e	94	
	protopin	423 ^h	322 ^e		
	allokryptopin	250 ^h	530 ^e		
<i>Eschscholzia californica</i> Cham.	pavinanový	escholtzin	519 ^h	>1000 ^e	95
		karyachin	19,6 ^h	>1000 ^e	
		neokaryachin	570 ^h	>1000 ^e	
		<i>O</i> -methylkaryachin	498 ^h	>1000 ^e	
		7- <i>O</i> -methylether- neokaryachin- <i>N</i> -methiojodid	205 ^h	>1000 ^e	
		kalifornidin	36,7 ^h	>1000 ^e	
	protopinový	protopin	423 ^h	333 ^e	
		allokryptopin	250 ^h	530 ^e	
	aporfinový	<i>N</i> -methylarotetanin	898 ^h	>1000 ^e	
benzyltetrahydro- isochinolinový	retikulin	509 ^h	43,9 ^e		

Tab. 3 Inhibitory z čeledi Papaveraceae (pokračování)

Rostlina	Alkaloidní typ	Sloučenina	Aktivita IC ₅₀ (μM)		Ref.
			AChE	BuChE	
<i>Eschscholzia californica</i> Cham.	benzyltetrahydro- isochinolinový	1-(3-hydroxy-4- methoxybenzyl)-2-methyl- 6,7-methylenedioxy-1,2,3,4- tetrahydroisochinolin	102 ^h	27,8 ^e	95
	protoberberinový	skulerin	245 ^h	903 ^e	

^a inhibice v 0,5 μM (%); ^b inhibice v 10 μM (%); ^c inhibice v 15 μM (%); ^d inhibice v 50 μM (%); ^e lidská sérová BuChE; ^f mozková kryší AChE; ^g netestováno; ^h lidská erytrocytární AChE; ⁱ Ki (μM)

3.1.5.1.4 Inhibitory z čeledi Fumariaceae

Tab. 4 Inhibitory z čeledi Fumariaceae

Rostlina	Alkaloidní typ	Sloučenina	Aktivita IC ₅₀ (μM)		Ref.
			AChE	BuChE	
<i>Corydalis ternata</i> Nakai	protopinový	protopin	50	— ^a	96
<i>Corydalis speciosa</i> Maxim.	protopinový	protopin	16,1	— ^a	38
	protoberberinový	palmatin	5,8	— ^a	
		berberin	3,3	— ^a	
		korynoxidin	89	— ^a	
<i>Corydalis bulbosa</i> DC.	protoberberinový	tetrahydroberberin	78,7 ^b	— ^a	97
		tetrahydrokoptisin	71,8 ^b	— ^a	
		korydalin	68,2 ^b	— ^a	
		tetrahydropalmatin	64,6 ^b	— ^a	
		dehydrokorydalin	61,3 ^b	— ^a	
<i>Corydalis turtschaninovi</i> Bess.	protoberberinový	berberin	0,47/2,7	— ^a /61,9	98,99
		palmatin	0,74	— ^a	98
		jatrorrhizin	2,08	— ^a	
		koptisin	1,01	— ^a	
		dehydrokorydalin	0,62	— ^a	
		korydalin	25,1	108,7	99
		xylopinin	26,5	92,0	
		stylopin	20,8	95,6	
		oxypseudopalmatin	76,1	— ^a	
		korydalinin	20,3	85,5	
		tetrahydropalmatin	52,4	— ^a	
		oxyberberin	10,5	117,5	100
		oxypalmatin	82,1	— ^a	
	korytenchin	48,5	— ^a		
	pseudodehydrokorydalin	85,7	— ^a	99	
	protoberberinový	pseudokoptisin	24,5		— ^a
	pseudoberberin	89,0	— ^a		
	epiberberin	6,5 ^c	— ^a	100	
	protopinový	protopin	10,2	26,8	99
aporfinový	oxoglaucidalin	5,5	47,5		
	oxoglaucin	2,1	29,2		
glaucin	2,5	58,2			
<i>Corydalis incisa</i> (Thunb.) Pers.	benzo- fenanthridinový	korynolin	30,6 ^c	— ^a	101
<i>Corydalis cava</i> (L.) Schweigg. & Koerte	protoberberinový	kanadin	12,4 ^d	483 ^e	102
		isokorypalmin	196 ^d	>1000 ^e	
		korypalmin	321 ^d	>1000 ^e	
		skulerin	245 ^d	903 ^e	
		korydalin	15,3/40,5 ^d	>1000 ^e	13,102
	tetrahydropalmatin	876 ^d	>1000 ^e	102	
sekoberberinový	kanadalin	20,1 ^d	85,2 ^e		

Tab. 4 Inhibitory z čeledi Fumariaceae (pokračování)

Rostlina	Alkaloidní typ	Sloučenina	Aktivita IC ₅₀ (μM)		Ref.
			AChE	BuChE	
<i>Corydalis cava</i> (L.) Schweigg. & Koerte	protopinový	korykavidin	223 ^d	46,2 ^e	102
		korykavamin	428 ^d	218 ^e	
		allokryptopin	250 ^d	530 ^e	
	aporfinový	korydin	>100/208 ^d	52/>1000 ^e	13,102
		bulbokapnin	40/>1000 ^d	83/67,0 ^e	
		<i>N</i> -methyllaurotetanin	898 ^d	>1000 ^e	
<i>Fumaria vaillantii</i> Loisel.	protoberberinový	kanadin	2,6	– ^a	103
	aporfinový	bulbokapnin	2,0	– ^a	
	protopinový	protopin	1,80	– ^a	

^a netestováno; ^b inhibice při koncentraci 1,0 mM (%); ^c myši mozková AChE; ^d erytrocytární lidská AChE; ^e sérová lidská BuChE

3.1.5.1.5 Inhibitory cholinesteras z ostatních čeledí

Tab. 5 Inhibitory cholinesteras z ostatních čeledí

Čeď	Rostlina	Alkaloidní typ	Sloučenina	Aktivita IC ₅₀ (μM)		Ref.
				AChE	BuChE	
Apocynaceae	<i>Haplophyton crooksii</i> L.D.Benson	indolový	β-yohimbin	431	– ^a	104
			kroksidin	175	– ^a	
			dekarbomethoxy-tetrahydrosekodin	203	– ^a	
			10-methoxy- <i>N</i> ₁ -methylpericycivin	135	– ^a	
			akuamicin	221	– ^a	
			tubotaivin	108	– ^a	
			lanceomagin	383	– ^a	
			16-dekarbo-methoxyvinervin	57	– ^a	
			halofytin	225	– ^a	
			cimicin	241	– ^a	
			cimicidin	197	– ^a	
	akuamidin	188	– ^a			
	<i>Himatanthus lancifolius</i> Müll.Arg.	indolový	ulein	0,45	– ^a	105
	<i>Ervatamia hainanensis</i> Tsiang	indolový	koronaridin	8,6	– ^a	106
			10-hydroxy-koronaridin	29	– ^a	
voakangin			4,4	– ^a		
19(<i>S</i>)-heyneanin			420	– ^a		
19(<i>R</i>)-heyneanin			730	– ^a		
<i>Tabernanthe iboga</i> L.Nutt.	indolový	ibogain	520	– ^a	107	
<i>Tabernaemontana divaricata</i> (L.) R.Br. ex Roem. & Schult.	bisindolový	19,20-dihydro-tabernamin	0,227	– ^a	108	
		19,20-dihydro-ervahanin A	0,071	– ^a		
<i>Catharanthus roseus</i> (L.) G.Don	monoterpenový indolový	serpentin	0,775	– ^a	109	
Fabaceae	<i>Trigonella foenum-graecum</i> L.	pyridinový	trigonelin	233 ^c	– ^a	110
	<i>Physostigma venenosum</i> Balf.	indolový	fysostigmin	0,25 ^c	1,26 ^d	111

Tab. 5 Inhibitory cholinesteras z ostatních čeledí (pokračování)

Čeď	Rostlina	Alkaloidní typ	Sloučenina	Aktivita IC ₅₀ (μM)		Ref.
				AChE	BuChE	
Huperziaceae	<i>Huperzia serrata</i> (Thunb. ex Murray) Trevis.	chinolizidinový	huperzin A	0,072 ^c	70 ^d	112
			huperzin B	0,0193	0,228	
			<i>N</i> -methylhuperzin B huperzinin	NS, ale aktivní		113
Chenopodiaceae	<i>Haloxylon salicornicum</i> Moq.	piperidinový	haloxylin A	25,3	19,0	114
haloxylin B	20,2	14,7				
Liliaceae	<i>Fritillaria imperialis</i> L.	steroidní	impericin	68	1,6	115
			delavin	105,5	1,7	
			persikanidin	352,2	4,245	
			forticin	>500	100,5	
			imperialin	>500	121,5	
Lycopodiaceae	<i>Lycopodium sieboldii</i> Miq.	tetracyklický alkaloid	sieboldin A	2,0	– ^a	116
	<i>Lycopodium carinatum</i> Desv.	chinolizidinový	karinatumin A	4,6	– ^a	117
			karinatumin B	7,0	– ^a	
	<i>Lycopodium annotinum</i> subsp. <i>alpestre</i> (Hartman) Å & D.Löve	chinolizidinový	anotin	860	>2000	118
			anotin- <i>N</i> -oxid	404	>2000	
			anhydrolykodolin	191	>2000	
			lykofolin	600	>2000	
	<i>Lycopodium serratum</i> Thunb.	chinolizidinový	2α,11α-dihydroxy- favcetin	27,9	– ^a	119
			lykoseramin	16,7	– ^a	
	<i>Lycopodium hamiltonii</i> Spring	pentacyklický	lykoperin A	60,9 ^e	– ^a	120
<i>Lycopodium cryptomerianum</i> Maxim.	pentacyklický	kryptadin A	106,3 ^e	– ^a	121	
		kryptadin B	18,5 ^e	– ^a		
Magnoliaceae	<i>Magnolia</i> × <i>soulangiana</i> Thiéb.-Bern.	–	taspin	0,33	– ^a	122
Menispermaceae	<i>Stephania tetrandra</i> S.Moore	bisisochinolinový	fangchinolin	3,2	– ^a	123
			atherospermolin	4,0	– ^a	
			2'- <i>N</i> -nor- fangchinolin	3,9	– ^a	
	<i>Stephania venosa</i> (Blume) Spreng.	protoberberinový	stefaranin	14,1	– ^a	124
			cyklanolin	9,23	– ^a	
			<i>N</i> -methylstefolidin	31,3	– ^a	
	<i>Triclisia sacleuxii</i> (Pierre) Diels	bisisochinolinový	lindoldhamin	3,52	– ^a	125
			feanthin	72,5 ^g	– ^a	
			<i>N</i> -methylapatelin	30,7 ^g	– ^a	
			1,2-dehydro- apatelin	15,9 ^g	– ^a	
gasabiimin	13,4 ^g	– ^a				
Ranunculaceae	<i>Aconitum falconeri</i> Stapf	norditerpenový	faleokonitin	293	– ^a	126
		steroidní	pseudoakonitin	278	– ^a	
	<i>Coptis chinensis</i> Franch.	protoberberinový	berberin	0,44	3,44	127
			palmatin	0,51	6,84	
			jatrorhizin	0,57	6,34	
			koptisin	0,80	5,81	
			groenlandicin	0,54	3,32	
			epiberberin	1,07	6,03	
	aporfinový	magnoflorin	>100	18,14		
	<i>Coptis japonica</i> Makino	protoberberinový	berberin	inhibice srovnatelná s fysostigminem ^b		128
palmatin						
koptisin						
Rubiaceae	<i>Chimarrhis turbinata</i> DC.	indolový alkaloid. glykosid	Turbinatin	1,86	– ^a	129
deoxykordifolin	0,1	– ^a				

Tab. 5 Inhibitory cholinesteras z ostatních čeledí (pokračování)

Čeď	Rostlina	Alkaloidní typ	Sloučenina	Aktivita IC ₅₀ (μM)		Ref.
				AChE	BuChE	
Rutaceae	<i>Evodia rutaecarpa</i> Benth.	chinazolinový	dehydroevodiamin	37,8/6,3	– ^a /8,4	130, 131
	<i>Esenbeckia leiocarpa</i> Engl.	chinolinový	leiokinin A	210	– ^a	132
			leptomerin	2,5	– ^a	
			kokusaginin	46	– ^a	
	<i>Skimmia laureola</i> Hook.	chinolinový	ribalinin	30 ^f	70	133
methylisoplatydesmin			30 ^f	19		
Solanaceae	<i>Solanum tuberosum</i> L.	steroidní alkaloidní glykosid	α-chakonin	17 ^h	0,066 ⁱ	134
			α-solanin	14 ^h	0,17 ⁱ	

^a netestováno; ^b hodnoty neuvedeny; ^c mozková krysí AChE; ^d krysí sérová BuChE; ^e bovinní erytrocytární AChE; ^f Ki (μM); ^g inhibice při koncentraci 100μg/ml (%); ^h rekombinantní lidská AChE; ⁱ lidská sérová BuChE; NS: přesné hodnoty inhibice neuvedeny

3.1.5.2 Terpeny jako inhibitory cholinesteras

Většina nealkaloidních inhibitorů cholinesteras objevené v rostlinách patří mezi terpeny. Monoterpeny byly jako první, u kterých byla nalezena na základě studií zkoumajících chemickou interakci mezi hmyzem a silicemi inhibiční cholinesterasová aktivita¹³⁵ a částečně díky výzkumům založených na etnofarmakologii¹³⁶. V oblasti výzkumu inhibitorů cholinesteras terpenového typu jsou rovněž intenzivně zkoumány seskviterpeny, diterpeny a triterpeny. Následující přehled nealkaloidních inhibitorů cholinesteráz je členěn do tabulek podle chemických struktur.

3.1.5.2.1 Monoterpenové a seskviterpenové inhibitory cholinesteras

Tab. 6 Monoterpenové a seskviterpenové inhibitory cholinesteras

Čeď	Rostlina	Sloučenina	Aktivita IC ₅₀ (mM)		Ref.
			AChE	BuChE	
Acoraceae	<i>Acorus calamus</i> L.	α-asaron	46,38 ^e	– ^b	137
		β-asaron	3,33 ^e	– ^b	
Lamiaceae	<i>Salvia lavandulaefolia</i> Vahl	α-pinen	0,63 ^a	– ^b	138
		β-pinen	0,2 ^{ac}	– ^b	
		linalool	>5 ^a	– ^b	
		geraniol	>5 ^a	– ^b	
		kafr	>4,7 ^a	– ^b	
		1,8-cineol	0,67 ^a	– ^b	
	<i>Mentha</i> spp.	piperitenon	110 ^d	– ^b	139
		piperitenonoxid	64 ^d	– ^b	
		elemol	34 ^d	– ^b	
		viridiflorol	25 ^d	– ^b	
<i>Thymus vulgaris</i> L.	thymol	0,212 ^c	– ^b	140	
	karvakrol	0,092 ^c	– ^b		
	borneol	0,132 ^c	– ^b		

Tab. 6 Monoterpenové a seskviterpenové inhibitory cholinesteras (pokračování)

Čeď	Rostlina	Sloučenina	Aktivita IC ₅₀ (mM)		Ref.
			AChE	BuChE	
Lamiaceae	<i>Salvia fruticosa</i> Mill., <i>Salvia lavandulaefolia</i> Vahl, <i>Salvia officinalis</i> L., <i>S. officinalis</i> L. var. <i>purpurea</i>	α-pinen	0,1 ^a (0,7 mM)	NA	141
		β-pinen	0,2 ^a (1,5 mM)	NA	
		1,8-cineol	0,06 ^a (0,4 mM)	NA	
		β-karyofylen	0,03 ^a (0,13 mM)	NA	
		3-karen	0,03 ^a (0,2 mM)	0,3 (2 mM)	
Myrtaceae	<i>Melaleuca alternifolia</i> (Maiden & Betche) Cheel	terpinen-4-ol	32 ^{fg}	– ^b	142
		γ-terpinin	31,7 ^{fg}	– ^b	
		α-terpinen	34 ^{fg}	– ^b	
		<i>p</i> -cymen	38,3 ^{fg}	– ^b	
		1,8-cineol	49 ^{df}	– ^b	
Zdroj neznámý		(–)-bornylacetát	4,7	– ^b	143
		(+)-pulegon	0,89	– ^b	143, 144
		(–)-karvon	1,38	– ^b	144
		citral	0,33	– ^b	
		γ-terpinen	22,6% (1,2 mM)	– ^b	
		α-terpinen	1,0	– ^b	
		<i>p</i> -cymen	39,8% (1,2 mM)	– ^b	
		(–)-isopulegol	2,0	– ^b	
		(–)-limonen	25% (1,2 mM)	– ^b	
		(–)-menthol	38,5% (1,2 mM)	– ^b	
		(–)-menthon	1,42	– ^b	
		(+)-karvon	1,85	– ^b	
		(+)-isomenthon	1,57	– ^b	
		(+)-limonen	22% (1,2 mM)	– ^b	
		(+)-menthol	2,0	– ^b	
		(+)- <i>p</i> -menth-1-en	1,64	– ^b	
(–)-terpinen-4-ol	21,4% (1,2 mM)	– ^b			

^a lidská erythrocytární AChE; ^b netestováno; ^c inhibice vyjádřená v mg/ml; ^d inhibice vyjádřená v µg/mL; ^e IC₅₀ (µM); ^f boviní erythrocytární AChE; ^g inhibice při 50 µg/mL (%); NA = neaktivní

Tab. 7 Silice jako inhibitory cholinesteras

Čeď	Rostlina	Aktivita (IC ₅₀)		Ref.
		AChE	BuChE	
Myrtaceae	<i>Melaleuca alternifolia</i> (Maiden & Betche) Cheel	0,05–0,11 (µl/ml)	– ^b	145
Lamiaceae	<i>Mentha</i> spp.	26–164 (µg/ml)	– ^b	139
	<i>Melissa officinalis</i> L.	76–100% (0,1 µl/ml) ^{ac}	– ^b	146
	<i>Salvia lavandulaefolia</i> Vahl	0,03 (µg/ml) ^c	– ^b	
	<i>Salvia officinalis</i> L.	34–47% (0,03 µg/ml) ^{ac}	– ^b	
Rutaceae	<i>Citrus aurantifolia</i> (Christm.) Swingle	65,8% (µl/ml) ^{ac}	– ^b	

^a procentuální inhibice; ^b netestováno; ^c homogenát lidské mozkové tkáň

3.1.5.2.2 Diterpenové inhibitory cholinesteras

Tab. 8 Diterpenové inhibitory cholinesteras

Čeleď	Rostlina	Sloučenina	Aktivita IC ₅₀ (μM)		Ref.
			AChE	BuChE	
Acanthaceae	<i>Hypoestes serpens</i> (Vahl) R.Br.	7β-hydroxyisopimara-8,15-dien-14-on	0,5 ^d	– ^b	147
		14α-hydroxyisopimara-7,15-dien-1-on	0,2 ^d	– ^b	
		7β-hydroxyisopimara-8,15-dien-14-on	0,5 ^d	– ^b	
		14α-hydroxyisopimara-7,15-dien-1-on	0,2 ^d	– ^b	
Fabaceae	<i>Detarium microcarpum</i> Guill. & Perr.	5α,8α-(2-oxokolavenová kyselina)	0,1 ^d	– ^b	148
		2-oxokolavenová kyselina	1 ^d	– ^b	
		3,4-epoxyklerodan-13(E)-en-15-ová kyselina	10 ^d	– ^b	
		3,4-epoxyklerodan-13(Z)-en-15-ová kyselina	10 ^d	– ^b	
	<i>Acacia nilotica</i> subsp. <i>kraussiana</i> Benth.	nilotikan	4	– ^b	149
Lamiaceae	<i>Salvia miltiorrhiza</i> Bunge	dihydotanshinon	1 ^a	– ^b	150
		tanshinon II A	>150 ^a	– ^b	
		tanshinon I	>50 ^a	– ^b	
		kryptotanshinon	7 ^a	– ^b	
	<i>Isodon wightii</i> (Benth.) H.Hara	melissoidesin	215 ^c	– ^b	151
	<i>Ajuga bracteosa</i> Wall ex Benth.	dihydroklerodin-1	35,2	19	152
		klerodinin A	26,5	17	
		lupulin A	19,2	12	
		dihydroajugapitin	14	10	
	<i>Sideritis congesta</i> P.H.Davis & Hub-Mor.	<i>ent</i> -7α-acetoxy-16β,18-dihydroxykauran	1,89 ^e	1,19 ^e	153
		epoxyisolinearol	0,87 ^e	0,43 ^e	
		sideroxol	1,27 ^e	0,024 ^e	
		sideridiol	8,04 ^e	3,67 ^e	
		siderol	0,69 ^e	0,65 ^e	
		7-epikandikandiol	0,23 ^c	0,022 ^c	
		linearol	2,66 ^e	0,15 ^e	
	sidol	0,92 ^e	0,05 ^e		
	<i>Sideritis arguta</i> Boiss. & Heldr.	diacetyldistanol	NA ^f	175,8	154
		eubol	NA ^f	23,2	
		eubotriol	NA ^f	98,1	
		sideroxol	14,5	25	
		7-epikandikandiol	22,8	21,1	
	<i>Leonurus heterophyllus</i> Sweet	leoheteronin F	16,1 ^g	– ^b	155
leoheterin		41,4 ^g	– ^b		
hispanon		38,5 ^g	– ^b		
galeopsin		42,7 ^g	– ^b		
leoheteronin A		11,6 ^g	– ^b		
leoheteronin D		18,4 ^g	– ^b		
leopersin G		12,9 ^g	– ^b		
<i>Otostegia limbata</i> Hook.f.	limbatolid A	38,5	22,3	156	
	limbatolid B	47,2	17,5		
	limbatolid C	103,7	14,2		

^a bovinní erytrocytární AChE; ^b netestováno; ^c inhibice uvedena v μg/mL; ^d TLC bioautografická metoda (inhibice vyjádřena v μg); ^e IC50 (mM); ^f NA = neaktivní; ^g kryší mozková AChE

3.1.5.2.3 Triterpenové inhibitory cholinesteras

Tab. 9 Triterpenové inhibitory cholinesteras

Čeď	Rostlina	Sloučenina	AktivitaIC ₅₀ (μM)		Ref.
			AChE	BuChE	
Asteraceae	<i>Amberboa ramosa</i> Roxb.	22 <i>R</i> -cykloart-20,25-dien-2α,3β,22α-triol	– ^b	39,9	157
		22 <i>R</i> -cykloart-23-en-3β,22α,25-triol	– ^b	299,1	
	<i>Parthenium argentatum</i> L.	argentatin A	42,8 ^c	– ^b	150
Combretaceae	<i>Combretum leprosum</i> Mart.	arjunolová kyselina	0,01 ^d	0,01 ^d	158
Ericaceae	<i>Vaccinium oldhami</i> Miq.	taraxerol	33,6 ^e	– ^c	159
Lamiaceae	<i>Salvia santolinifolia</i> Boiss.	slavin A	NA ^a	12,5	160
		slavin B	NA ^a	65,5	
	<i>Origanum majorana</i> L.	ursolová kyselina	0,0075	– ^b	161
Lycopodiaceae	<i>Lycopodium clavatum</i> L.	α-onocerin	5,2	– ^c	162

^a NA = neaktivní; ^b netestováno; ^c bovinní erytrocyt. AChE; ^d TLC bioautograf. metoda (0,01 mM/L); ^e (μg/mL)

3.1.5.2.4 Steroidní inhibitory cholinesteras

Tab. 10 Steroidní inhibitory cholinesteras

Čeď	Rostlina	Sloučenina	AktivitaIC ₅₀ (μM)		Ref.
			AChE	BuChE	
Chenopodiaceae	<i>Haloxylon recurvum</i> (Moq.) Bunge ex Boiss	haloxysterol A	8,3	4,7	163
		haloxysterol B	0,89	2,3	
		haloxysterol C	1,0	17,8	
		haloxysterol D	17,2	2,5	
		5α,8α-epidioxy-(24 <i>S</i>)-ethylcholesta-6,9(11),22(<i>E</i>)-trien-3β-ol	26,4	6,9	
		(24 <i>S</i>)-ethylcholesta-7,9(11),22(<i>E</i>)-trien-3β-ol	19,2	4,5	
		lawsaritol	15,2	3,9	
		24-ethylcholest-7-en-3,5,6-triol	13,7	2,0	
	24-ethylcholest-6-en-3,5-diol	3,5	3,5		
Lamiaceae	<i>Ajuga bracteosa</i> Wall ex Benth.	brakteosin A	25,2	38,9	164
		brakteosin B	35,2	29,4	
		brakteosin C	49,2	39,1	
Liliaceae	<i>Anemarrhena asphodeloides</i> Bunge	timosaponin A III	35,4	– ^b	165
Solanaceae	<i>Withania somnifera</i> (L.) Dunal	5β,6β-epoxy-4β,17α,27-trihydroxy-1-oxowitha-2,24-dienolid	161,5	NA ^a	166
		withaferin A	84	125	
		2,3-dihydrowithaferin A	NA ^a	500	
		6α,7α-epoxy-5α,20β-dihydroxy-1-oxowitha-2,24-dienolid	50	NA ^a	
	5β,6β-epoxy-4β-hydroxy-1-oxowitha-2,14,24-trienolid	124	62,5		

^a NA= neaktivní; ^b netestováno

3.1.5.3 Fenolové inhibitory cholinesteras

3.1.5.3.1 Flavonoidní inhibitory cholinesteras

Tab. 11 Flavonoidni inhibitory cholinesteras

Čeleď	Rostlina	Sloučenina	Aktivita IC ₅₀ (μM)		Ref.
			AChE	BuChE	
Asteraceae	<i>Phagnalon saxatile</i> (L.) Cass.	luteolin	25,2	37,2	167
	<i>Psiadia trinervia</i> Willd.	4',5,7-trihydroxy-3,3'-dimethoxyflavon	20,6 ^e	– ^c	37
Boraginaceae	<i>Onosma hispida</i> Wall.	hispidon	11,6	15,7	168
		(2S)-5,2-dihydroxy-7,5-dimethoxyflavanon	28	7,9	
Buddlejaceae	<i>Buddleja davidii</i> Franch.	linarin	10 ^d	– ^c	169
		tilianin	40 ^d	– ^c	
Iridaceae	<i>Iris suaveolens</i> Boiss. & Reut.	tektorigenin	– ^{bg}	47,3 ^g	170
		irilon	– ^{bg}	71,3 ^g	
		nigricin	– ^{bg}	80,1 ^g	
		iriskumaoninmethylether	13,64 ^g	35,1 ^g	
Lamiaceae	<i>Mentha arvensis</i> L.	linarin	0,01 ^a	– ^b	171
	<i>Leucas urticifolia</i> (Vahl) R.Br.	leufofin A	74,5	1,6	172
		leufofin B	72,3	3,6	
	<i>Salvia pocolata</i> Nabiev	cirsimaritin	12,35 ^h	50,31 ^h	173
eupatilin		11,0 ^h	45,27 ^h		
Moraceae	<i>Maclura pomifera</i> (Raf.) Schneid.	pomiferin	96	– ^b	174
	<i>Morus lhou</i> Koidz.	5'-geranyl-4'-methoxy-5,7,2'-trihydroxyflavon	10,95	3,43	175
		5'-geranyl-5,7,2',4'-tetrahydroxyflavon	16,21	7,91	
		kuwanon U	19,69	10,11	
		kuwanon E	23,79	16,21	
		morusin	36,4	24,08	
		morusinol	173,49	76,32	
		cyklomorusin	31,69	21,48	
		neocyklomorusin	26,69	15,35	
kuwanon C	25,06	14,86			
Myrtaceae	<i>Cleistocalyx operculatus</i> (Roxb.) Merr. & Perry	myricetin-3'-methylether 3-O-β-D-galaktopyranosid	19,9	152,5	176
		myricetin-3',5'-dimethylether 3-O-β-D-galaktopyranosid	37,8	>800	
		kvercetin	25,9	177,8	
		kempferol	30,4	62,5	
		tamarixetin	22,3	160,6	
Rosaceae	<i>Agrimonia pilosa</i> Ledeb.	kvercetin	353,9	420,8	177
		kvercetin	19,8	– ^c	178
		tilirosid	23,5	– ^d	
Rutaceae	<i>Citrus junos</i> Siebold ex. Tanaka	naringenin	66 ^f	– ^c	179
Scrophulariaceae	<i>Linaria reflexa</i> Desf.	linariin	0,27	– ^c	180
		isolinariin A	0,28	– ^c	
		isolinariin B	0,30	– ^c	
Zygophyllaceae	<i>Zygophyllum eurypterum</i> Boiss.	atrikarpan A	– ^b	12,5	181
		atrikarpan B	– ^b	65,5	
		atrikarpan C	– ^b	19,5	
		atrikarpan D	20,5	30,5	
Zdroj neznámý		kvercetin	76,2 ⁱ	46,8 ⁱ	182
		genistein	– ^{bi}	65,7 ⁱ	
		luteolin-7-O-rutinosid	24,7 ⁱ	54,9 ⁱ	

Tab. 11 Flavonoidní inhibitory cholinesteras (pokračování)

Čeď	Rostlina	Sloučenina	Aktivita IC ₅₀ (μM)		Ref.
			AChE	BuChE	
Zdroj neznámý		naringinin	– ^{bi}	13,7 ⁱ	182
		silibinin	– ^{bi}	51,4 ⁱ	
		silymarin	– ^{bi}	43,2 ⁱ	
		galangin	85,6 ^{ej}	6,9 ^{ek}	183
		apigenin	121,6 ^{ej}	37,4 ^{ek}	
		myricetin	37,8 ^{ej}	71 ^{ek}	
		fisetin	100,2 ^{ej}	90 ^{ek}	
rutin	65,8 ^{ej}	166,1 ^{ek}			

^a TLC bioautografická metoda (μg); ^b neaktivní; ^c netestováno; ^d detekční limit inhibice AChE na TLC desce (ng); ^e Ki (μM); ^f procentuální inhibice při konc. 210 μg/mL; ^g procentuální inhibice při konc. 200 μg/mL; ^h procentuální inhibice při konc. 200 μM; ⁱ procentuální inhibice při konc. 1 mg/mL; ^j rekombinantní lidská AChE; ^k lidská sérová BuChE

3.1.5.3.2 Kumarinové inhibitory cholinesteras

Tab. 12 Kumarinové inhibitory cholinesteras

Čeď	Rostlina	Sloučenina	Aktivita IC ₅₀ (μM)		Ref.
			AChE	BuChE	
Apiaceae	<i>Angelica gigas</i> Nakai	dekursinol	28	– ^a	184
		marmesin	67	– ^a	
		nodakenin	68	– ^a	
	<i>Angelica gigas</i> Nakai, <i>Angelica dahurica</i> Maxim.	isoimperatorin	69	– ^a	185
	<i>Angelica acutiloba</i> (Siebold & Zucc.) Kitag., <i>Angelica gigas</i> Nakai	xanthotoxin	54	– ^a	
			0,58 ^b	– ^a	
	<i>Angelica acutiloba</i> (Siebold & Zucc.) Kitag.	isopimpinellin	0,32 ^b	– ^a	
<i>Angelica dahurica</i> Maxim.	oxypeucedanin	89,1 ^c	– ^a	186	
	imperatorin	63,7 ^c	– ^a		
	isoimperatorin	74,6 ^c	– ^a		
<i>Angelica officinalis</i> L.	bergapten	37,7 ^d	84,8 ^d	187	
Rutaceae	<i>Murraya paniculata</i> (L.) Jack	murranganon	79,1	74,3	188
		panikulatin	31,6	>100	
Solanaceae	<i>Scopolia carniolica</i> Jacq.	skopoletin	168,6	– ^a	189
Ulmaceae	<i>Celtis chinensis</i> Perss.	<i>N-p</i> -kumaryltyramin	122	– ^a	190

^a netestováno; ^b IC₅₀ (μM/mL); ^c myši mozková AChE; ^d procentuální inhibice při konc. 12,5 μg/mL

3.1.5.3.3 Xanthonové inhibitory cholinesteras

Tab. 13 Xanthonové inhibitory cholinesteras

Čeď	Rostlina	Látka	Aktivita IC ₅₀ (μM)		Ref.
			AChE	BuChE	
Clusiaceae	<i>Garcinia livingstonei</i> T.Anderson	3 <i>H</i> ,7 <i>H</i> -pyrano[2,3- <i>c</i>]xanthen-7-on	1,9 ^a	– ^b	37
		4-(3',7'-dimethylokta-2',6'-dienyl)-1,3,5-trihydroxy-9 <i>H</i> -xanthen-9-on	26,8 ^a	– ^b	
	<i>Garcinia polyantha</i> Oliv.	polyanxanthon A	41,8 ^d	7 ^d	191
		polyanxanthon B	46,3 ^d	25,5 ^d	
		1,3,5-trihydroxyxanthon	NA	93	

Tab. 13 Xanthonové inhibitory cholinesteras (pokračování)

Čeleď	Rostlina	Látka	Aktivita IC ₅₀ (μM)		Ref.
			AChE	BuChE	
Clusiaceae	<i>Garcinia polyantha</i> Oliv.	1,5-dihydroxyxanthon	NA	2,54	191
		1,6-dihydroxy-5-methoxyxanthon	NA	74,4	
	<i>Allanblackia monticola</i> Staner L.C.	allanxanthon A	95	19,1	192
Gentianaceae	<i>Chironia krebssii</i> Griseb.	mesuaxanthon A	53 ^a	– ^b	37
		1-hydroxy-3,5-dimethoxyxanthon	15,4	– ^b	
		dekussatin	28,7 ^a	– ^b	
	<i>Gentiana campestris</i> L.	bellidin	0,15 ^c	– ^b	193
		bellidifolin	0,03 ^c	– ^b	
		norswertianolin	1,20 ^c	– ^b	
	swertianolin	0,18 ^c	– ^b		
Moraceae	<i>Maclura pomifera</i> (Raf.) Schneid.	makluraxanthon	8,47	29,8	177
Polygalaceae	<i>Polygala nyikensis</i> Exell	1,7-dihydroxy-4-methoxyxanthon	44 ^a	– ^b	37

^a K_i pro kompetitivní inhibiči (μM); ^b netestováno; ^c minimální inhibiční koncentrace na TLC; ^d procentuální inhibice při konc. 200 μM; NA = neaktivní

3.1.5.3.4 Lignanové inhibitory cholinesteras

Tab. 14 Lignanové inhibitory cholinesteras

Čeleď	Rostlina	Látka	Aktivita IC ₅₀ (μM)		Ref.
			AChE	BuChE	
Apocynaceae	<i>Leptadenia arborea</i> (Forssk.) Schweinf.	syringaresinol	200 ^b	– ^c	194
Magnoliaceae	<i>Magnolia officinalis</i> Rehder & Wilson	4- <i>O</i> -methylhonokiol	12 ^{de}	– ^c	195
Schisandraceae	<i>Schisandra chinensis</i> (Turcz.) Baill.	gomisin A	15,5 ^d	– ^c	197
		gomisin C	6,71 ^d	– ^c	
		gomisin G	6,55 ^d	– ^c	
		gomisin D	7,84 ^d	– ^c	
		schisandrol B	12,57 ^d	– ^c	
Verbenaceae	<i>Vitex negundo</i> L.	negundin A	>300	85	198
		negundin B	254	194	
		diasyringaresinol	NA ^a	300	
		lyoniresinol	263,3	NA ^a	
		vitrofolal E	106,5	35	

^a neaktivní; ^b IC₅₀ (μg/mL); ^c netestováno; ^d myší mozková AChE; ^e IC₅₀ (nM). NA = neaktivní

3.1.5.3.5 Fenolové inhibitory cholinesteras různých strukturních typů

Tab. 15 Fenolové inhibitory cholinesteras různých strukturních typů

Čeleď	Rostlina	Strukturní typ	Látka	Aktivita IC ₅₀ (μM)		Ref.
				AChE	BuChE	
Apiaceae	<i>Ferula asafoetida</i> L.	fenolová kyselina	ferulová kyselina	30 ^{ab}	– ^c	199
Dipterocarpaceae	<i>Hopea hainanensis</i> Merr. & Chun	stilbenový oligomer	hopeahainol A	4,33	– ^c	200
Fabaceae	<i>Caragana chamlague</i> Lam.	stilbenový oligomer	(+)- <i>α</i> -viniferin	2	NA ^d	201
			kobofenol A	115,8	NA ^d	
Theaceae	<i>Camellia sinensis</i> (L.) O.Kuntze	fenolové sloučeniny	polyfenoly	0,03 ^{ef}	0,05 ^{df}	202

^a procentuální inhibice (0,3 μg); ^b AChE z homogenátu nervové tkáně plže *Lymnaea acuminata*; ^c netestováno; ^d sérová lidská BuChE; ^e lidská AChE; ^f IC₅₀ (mg/mL); NA = neaktivní

3.1.5.4 Ostatní inhibitory cholinesteras různých strukturních typů

Tab. 16 Ostatní inhibitory cholinesteras různých strukturních typů

Čeleď	Rostlina	Strukturní typ	Sloučenina	Aktivita IC ₅₀ (μM)		Ref.
				AChE	BuChE	
Apocynaceae	<i>Cynanchum atratum</i> Bunge	pregnanový glykosid	cynatrosid A	6,4	— ^a	203
			cynatrosid B	3,6	— ^a	
			cynatrosid C	52,3	— ^a	
			cynascyrosid D	152,9	— ^a	
Asteraceae	<i>Tanacetum artemisioides</i> Schultz.	ceramid	tanacetamid A	67,1	— ^a	204
			tanacetamid B	74,1	— ^a	
Moraceae	<i>Fatoua villosa</i> Nakai	purin	zeatin	109 ^b	— ^a	205

^a netestováno; ^b AChE z homogenátu buněčných kultur PC12

3.2 Inhibice BACE1

3.2.1 Význam BACE1 v organismu

BACE1 (EC 3.4.23.46) patří do rodiny transmembránových aspartátových proteas. Je příbuzná pepsinovým a retrovirovým aspartátovým proteásam. Tento enzym se nachází především v kyselých vnitrobuněčných kompartmentech (např. endosomech, Golgiho aparátu) s aktivním místem uvnitř vesikulů, ve kterých se nalézá kyselé prostředí (pH ~ 4–4,5) nutné pro optimální aktivitu tohoto enzymu²⁰⁶. Nejvyšší hladiny BACE1 se nalézají v neuronech. BACE1 je zřejmě jediný enzym fyziologicky štěpící APP v mozku – u myši s vyřazeným genem pro BACE1 byla prokazatelně zrušena tvorba A β ²²². Kromě APP a jeho homologů (APLP1 a APLP2)²⁰⁷ byly identifikovány jiné substráty BACE1: neuregulin^{218,221}, β 2 a β 4 podjednotka napětově řízených sodíkových kanálů^{208,209}. Tyto proteiny jsou štěpeny podobně jako APP a hrají důležitou roli pro normální vývoj a funkci mozku. U dalších domnělých substrátů není přímá fyziologická role BACE1 jednoznačně prokázána^{210,211,212,213}. Nedávno po objevení BACE1, byl identifikován strukturně podobný enzym – BACE2, který má 64% aminokyselinovou sekvenční podobnost. Na rozdíl od BACE1 se nachází v neuronech v nízkých koncentracích a nemá stejnou štěpící aktivitu vůči APP jako BACE1²⁰⁶.

Z patofyziologického hlediska, u AD je BACE1 zodpovědná za tvorbu A β ₄₂ – vláknitou formu A β o délce 42 aminokyselin. V amyloidní cestě, BACE1 štěpí transmembránový APP za vzniku transmembranového fragmentu (C99). Tento fragment je dále štěpen dalším enzymem – γ -sekretasou za uvolnění zralého A β . V neamyloidní cestě je APP štěpen třetí proteasou – α -sekretasou, která štěpí APP v rámci A β domény a zabraňuje tak vzniku A β . A β agregáty v extracelulárních placích představují jeden z histopatologických znaků AD^{214,215}.

Z důvodu klíčových rolí uvedených enzymů v patogenezi AD se inhibitory γ -sekretasy a BACE1 staly terapeutickými cíly ve vývoji nových léčiv pro nesymptomatickou léčbu AD. Terapeuticky je význam inhibitorů γ -sekretasy vnímán negativně, protože γ -sekretasa je esenciální součástí Notch signální cesty, a tudíž jsou tyto inhibitory při chronickém podávání nepříjemně toxické²¹⁶. Co se týká toxikologického hlediska u BACE1, vypnutí genu pro BACE1 nebylo u myši letální, docházelo k zablokování produkce A β ²¹⁷, nicméně bylo shledáno, že myelinová pochva periferních nervů u takto poškozených myši byla mnohem tenčí – BACE1 hraje důležitou roli ve štěpení neuregeli-

nu-1²¹⁸, dále docházelo k nárůstu spontánních a indukovaných záchvatů^{219,220,221} a byla zvýšena neonatální letalita²²².

3.2.2 Inhibitory BACE1

3.2.2.1 Mechanismus působení

Enzymová aktivita BACE1 může být ovlivněna navázáním inhibitoru na aktivní místo enzymu²²³ nebo vazbou na „vnější místo“ enzymu^{224,225}.

3.2.2.2 Použití

Zdá se (alespoň v této době), že by se inhibitory enzymu mohly stát významným terapeutickým příspěvkem při ovlivňování průběhu AD nesymptomatickou léčbou, jak bylo uvedeno výše. Výsledky uvedené v literatuře ukazují, že řada přírodních látek, které se běžně vyskytují v potravinách (např. stilbeny ve víně, katechinové deriváty v čaji, nebo látky podobné flavonoidům např. v lékořici) mohou mít určitý význam v prevenci neurodegenerace, který by neměl být opomíjen. Je nesporné, že některé přírodní látky se v průběhu následující doby stanou leading structure pro vývoj kandidátů nových léčiv, inhibujících BACE1. Výzkum v oblasti přírodních látek inhibujících sekretasu, není dosud tak široký jako je tomu v případě cholinesteras, nicméně jedná se o téma velmi nosné a není pochyb, že se bude v nejbližší době velmi intenzívně rozvíjet.

3.2.3 Detekce inhibice BACE1

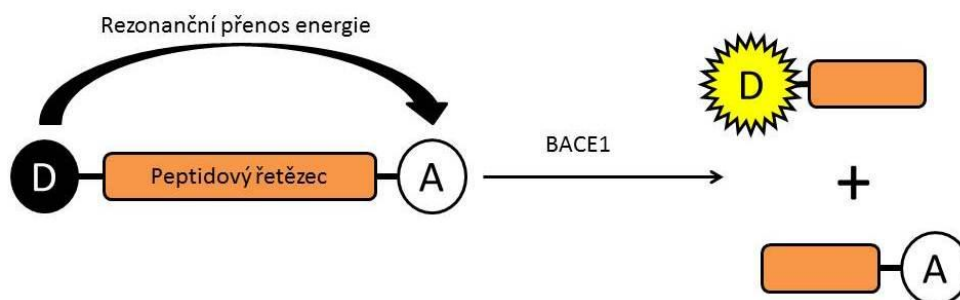
Pro testování nových potenciálních inhibitorů BACE1 byla popsána řada metod. Mezi nejčastěji používané metody patří ty, které můžeme rozdělit podle využívaných principů na:

- fluorescenční metody
- metody využívající imobilizovaný enzym
- spektrofotometrické metody
- metody používající biosenzory

3.2.3.1 Fluorescenční metody

Pro měření inhibice hrBACE1 jsou nejčastěji používány fluorimetrické metody založené na principu fluorescenčního rezonančního přenosu energie (FRET princip)²²⁶. FRET sub-

strát se skládá ze dvou flouoroforů: fluorescenčního donoru a zhášecího akceptoru, které jsou navzájem spojené peptidovým řetězcem. Po rozštěpení peptidového řetězce BACE1 dochází k opětovnému uvolnění energie donoru, aktivita enzymu je lineárně úměrná nárůstu fluorescence.



Obr. 3 Schéma principu FRET metody pro stanovení aktivity BACE1

Pro FRET metody bylo navrženo několik substrátů, které obsahují ve struktuře odlišné fluorescenční donory, zhášecí akceptory ale i rozdílnou délku a složení spojovacího peptidového řetězce. Se strukturně rozdílnými substráty používaných v jednotlivých testech souvisí i potřeba nastavení rozdílných vlnových délek pro excitaci a emisi, použití rozdílných koncentrací substrátu a koncentrací BACE1²²⁷.

FRET metody poskytují homogenní výsledky, jsou citlivé, ale mají několik nevýhod jako je dlouhý čas analýzy, vysoká spotřeba enzymu, nemožnost automatizace a znovupoužití enzymu a tvorba falešně pozitivních/negativních reakcí (některé ligandy mohou díky své omezené rozpustnosti za testovaných podmínek tvořit agregáty, které se mohou adsorbovat na enzymy nebo inkorporovat do enzymů; jiné mohou obsahovat ve své struktuře fluorescenční aromatické systémy, které mohou produkovat interferenční fluorescence)²²⁷.

Jako alternativnou ke studiu BACE1 inhibice vzhledem k nevýhodám klasických FRET metodám může být použita metoda využívající TRF-Q („time-resolved fluorescence quenching“) technologii, kterou publikovali Porcari et al²²⁸. V této metodě je fluorescence vzorku monitorována funkcí času po excitaci světlem nebo zábleskem. Tato metoda používá peptid s navázaným chelátem Eu^{3+} na N-konci a organický flouoroforový zhášeč navázaný na C-konci peptidu. Po excitaci při $\lambda = 330 \text{ nm}$, poskytuje produkt štěpení nárůst fluorescence při $\lambda = 615 \text{ nm}$, která je lineární vzhledem k enzymové aktivitě.

Metoda poskytuje menší riziko falešně pozitivních/negativních reakcí. Nevýhodou této techniky je vysoká cena použitého substrátu a přístroje.

3.2.3.2 Metody využívající imobilizovaný enzym

Použití IMER zapojeného do HPLC systému může být vhodným řešením pro uvedené nevýhody FRET metod²²⁹. Použití chromatografického systému umožňuje separovat produkty enzymového štěpení a testovaných látek od substrátu, a tak eliminovat interference. Navíc, použitím průtokového systému existuje menší riziko vzniku precipitace testované látky, substrátu a/nebo tvorby agregátů. Andrisano a spol. používala IMER, který byl připraven chemickým navázáním hrBACE1 na EDA monolitického disku, jako fluorigenní peptidový substrát byl používán M-2420 s $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 320/420$ nm, který obsahuje v peptidovém řetězci β -sekretasový štěpicí segment švédské mutace APP s navázaným fluorescenčním donorem – (7-methoxykumarin-4-yl)acetylová skupina a akceptorem – di-nitrofenolová skupina. Výhodou této metody je možnost používat takto připravený stabilní imobilizovaný enzym po delší dobu, cena a požadovaný čas na analýzu.

3.2.3.3 Spektrofotometrické metody

Andrisano a spol. vyvinula pro screening BACE1 inhibitorů na mikrotitračních destičkách spektrofotometrickou metodu, ve které se jako substrát používá BAPNA²³⁰. BAPNA je štěpena enzymem na *N*- α -benzoyl-D,L-arginin a žlutý produkt *p*-nitroanilin, jehož absorbance je monitorována při $\lambda = 405$ nm. Pomocí této metody byly stanoveny IC₅₀ známých inhibitorů cholinesteras (galanthaminu, donepezilu, rivastigminu a takrinu) vůči BACE1 a tyto výsledky byly porovnávány s fluorescenční metodou využívající jako substrát kasein-FITC (kasein značený fluorescenčním isothiokyanátem). Metoda využívající BAPNA poskytla dostatečnou přesnost a opakovatelnost, zjištěné hodnoty IC₅₀ se řádově nelišily ve srovnání s použitou fluorescenční metodou.

3.2.3.4 Metody využívající biosenzory

Pro rychlý screening inhibitorů lze použít metodu využívající technologii povrchové plasmonové rezonance (SPR)²³¹. Tato technologie patří mezi velmi citlivé bioanalytické metody, která umožňuje objasnit vazebný mechanismus, kinetiku nových potenciálních inhibitorů BACE1 a poskytuje informaci o afinitě inhibitorů, ale ne inhibiční data. Metoda se jeví jako doplňková k inhibičním studiím.

3.2.3.5 Eliminace zkreslení výsledků testů pro BACE1 inhibici

Pro stanovení inhibice BACE1 je vhodné vzhledem k různorodosti užívaných testů použít nejméně 2 různé metody k eliminaci falešně pozitivních nebo negativních reakcí²²⁷. Příkladem falešně pozitivní reakce je (-)-epigallokatechin-gallát, který vykazoval v publikované práci Jeona a spol. signifikantní inhibici enzymu ($IC_{50} = 1,6 \mu M$)²⁴¹. Naopak, ve studii Chenga a spol. bylo shledáno, že (-)-epigallokatechin-gallát není inhibitorem BACE1, ale díky jeho fyzikálně-chemickým vlastnostem se může jevit jako inhibitor – byla u něj prokázána fluorescenční zhášecí schopnost za testovaných podmínek, která snižovala fluorescenční intenzitu štěpeného produktu substrátu, což se pak jevilo jako inhibice enzymu²⁴⁰.

3.2.4 Inhibitory BACE1 rostlinného původu

Z důvodu klíčové role BACE1 v patogenezi AD začaly být inhibitory tohoto enzymu intenzivně zkoumány. Zajímavé inhibiční aktivity vůči BACE1 byly objeveny i u látek rostlinného původu různých strukturních typů. Přehled, který je zde uveden, nezahrnuje všechny přírodní látky, o kterých se zmiňuje literatura, ale vybrány pouze příklady, které pokládám za reprezentativní a důležité.

Tab. 17 Inhibitory BACE1 rostlinného původu

Čeleď	Rostlina	Strukturní typ	Sloučenina	IC ₅₀ (μM)	Ref.
				BACE1	
Apiaceae	<i>Angelica dahurica</i> (Fisch.) Benth. & Hooker	furanokumarin	isoimperatorin	244,2 ± 8,2	232
			imperatorin	91,8 ± 7,5	
			(+)-oxypeucedanin	359,2 ± 9,6	
			(+)-bakangelikol	104,9 ± 2,4	
			(+)-byakangelicin	219,7 ± 7,6	
Fabaceae	<i>Psoralea corylifolia</i> L.	isoflavon	neokorylin	0,7 ± 0,1	233
			bakuchiol	21,3 ± 0,3	
			bavachromen	7,2 ± 0,2	
			isobavachromen	9,8 ± 0,3	
			bavachalkon	10,2 ± 0,3	
			7,8-dihydro-8-(4-hydrofenyl)-2,2-dimethyl-2-H,6-H-[1,2-B:5,4-B']-dipyran-6-on	1,6 ± 0,1	
<i>Glycyrrhiza glabra</i> L.	chalkon	2,2',4'-trihydroxychalkon	2,45	234	
Lamiaceae	<i>Perilla frutescens</i> var. <i>acuta</i>	flavon	luteolin	0,5	235
		fenolová kyselina	rosmarinová kyselina	21	
Moraceae	<i>Morus lhou</i> Koidz.	flavon	norartokarpetin	60,6 ± 2,7	236
			kuwanon C	3,4 ± 1,3	
			morusin	59,4 ± 12,7	
			kuwanon A	5,3 ± 0,2	
			cyklomorusin	101,2 ± 5,3	
			morusinol	135,9 ± 22,8	
neocyklomorusin	146,1 ± 7,1				

Tab. 17 Inhibitory BACE1 rostlinného původu (pokračování)

Čeleď	Rostlina	Strukturní typ	Sloučenina	IC ₅₀ (μM)	Ref.
				BACE1	
Moraceae	<i>Morus lhou</i> Koidz.	flavon	mormin	103,5 ± 17,4	236
Polygalaceae	<i>Polygala tenuifolia</i> Wild.	triterpenový saponin	tenuifolin	76,1 ^a	237
			tenuigenin	0,25 ^b	238
Ranunculaceae	<i>Coptis chinensis</i> Franch.	protoberberinový alkaloid	epiberberin	8,55 ± 1,29	127
			groenlandicin	19,68 ± 1,42	
Smilacaceae	<i>Smilax china</i> L.	stilben	<i>trans/cis</i> -resveratrol	15	239
			oxyresveratrol	7,6	
			verafenol	4,2	
			<i>cis</i> -scirpusin A	10	
Theaceae	<i>Camellia sinensis</i> (L.) O.Kuntze	katechin	(-)-epigallokatechin-gallát	NA	241
				1,6	
			(-)-epikatechin-gallát	2,5	
			(-)-gallokatechin-gallát	1,8	
			(-)-katechin-gallát	6	
			(-)-gallokatechin	2,5	
			(-)-epigallokatechin	2,4	
			(+)-katechin	35	
			(-)-katechin	30	
(+)-epikatechin	28				
	(-)-epikatechin	23			
Vitaceae	<i>Vitis vinifera</i> L.	stilben	(+)-vitisinol E	14,4 ± 0,3	242
			(+)-ε-viniferin	10,6 ± 0,2	
			(+)-ampelopsin A	26,6 ± 0,2	
			(+)-vitisin A	0,8 ± 0,1	
			(-)-vitisin B	0,4 ± 0,1	

^a procento inhibice při koncentraci 100 μg/ml; ^b koncentrace v μg/m; NA neaktivní

3.3 Antioxidační aktivita

Je známo, že RONS hrají zásadní roli ve fyziologii člověka (vznikají při metabolismu živin, fyzické námaze, stresu), podílejí se na patofyziologických procesech, vedoucích k vývoji obecně rozšířených chorob (onemocnění kardiovaskulárního systému, zánětlivé a autoimunitní procesy v pohybovém systému, tvorba zhoubných nádorů) a hrají také významnou roli v rozvoji a progresi AD^{243,244}.

Ačkoliv jsou živočišné organismy fylogeneticky vybaveny do určité míry ochranou před oxidačním poškozením významných biomolekul vlastními endogenními látkami (glutathion, kyselina močová, koenzym Q10), není často tento způsob ochrany zcela dostačující, a proto existuje snaha o zvýšení antioxidační kapacity tkání přísunem netoxických látek, především z potravy (vitamín C, tokoferoly, karotenoidy). S přijímaným ovocem a zeleninou se uplatňují v lidském organismu také některé sekundární metabolity rostlin, především fenolového charakteru (flavonoidy, katechiny, stilbeny aj.), které mohou přispět ke snížení rizika AD^{245,246}.

Aby bylo možné vhodně využít vlastností antioxidantů, je nutné mít k dispozici validní testy pro zjištění antioxidační aktivity. Zde však nastává problém: studované látky se většinou chovají jinak v prostředí *in vitro*, než v prostředí *in vivo*, ve kterém dochází k různým interakcím a mnohé látky, které se jeví jako nadějně *in vitro*, lze jen velmi těžko uplatnit. Oxidačního stresu je velmi rozmanitý a složitý proces ať už místem, kde RONS vznikají, anebo povahou těchto nežádoucích látek. V současné době existuje několik desítek testů v oblasti poznání anti- a prooxidační aktivity látek, které lze použít pro sledování antioxidační aktivity. Tento proces je však časově a finanční náročný a v primárním screeningu není vůbec potřebný. Pro stanovení antioxidačních účinků je vhodné nejprve zjistit celkovou antioxidační kapacitu (TAC – total antioxidant capacity), která uvádí schopnost látky (nebo směsi látek) eliminovat radikály²⁴⁷. Paulová a spol. uvádí základní metody stanovení antioxidační aktivity²⁴⁸, které lze rozdělit na metody založené na eliminaci radikálů a metody založené na hodnocení redoxních vlastností látek. Při stanovení TAA jsou nejběžněji používány metody založené na eliminaci radikálů (ABTS, DPPH, ORAC), z metod založených na hodnocení redoxních vlastností látek pak metoda ORAC. Teprve po zjištění významné antioxidační aktivity výše uvedenými metodami jsou používány metody, které mohou detailněji objasnit antioxidační aktivitu často s ohledem na biologické prostředí, v němž má být tato antioxidační aktivita realizována (mozková tkáň).

Při použití řady léčiv je antioxidační aktivita pouze aktivitou doplňkovou, zvláště pokud je zřejmé, že léčivo bude podáváno v nízkých dávkách a může tak doplňovat aktivitu přirozených a netoxických antioxidantů, které se v případě AD podávají (tokoferoly)²⁴⁹.

3.4 *Corydalis cava* (L.) Schweigg. & Koerte (Fumariaceae)

Synonyma: *Borkhausenia cava* Gaertn. Mey. Scherb., *Bulbocapnus cavus* Bernh., *Capnoides cava* Moench, *Corydalis bulbosa* (L.) DC., *Corydalis bulbosa* Pers., *Corydalis tuberosa* DC., *Fumaria bulbosa* var. *cava* L., *Fumaria cava* Mill., *Pseudofumaria maior* Borkh²⁵⁰.

3.4.1 Taxonomické zařazení

Oddělení: Magnoliophyta

Třída: Magnoliopsida

Podtřída: Ranunculidae

Řád: Papaverales

Čeleď: Fumariaceae

Rod: *Corydalis* DC.

Druh: *Corydalis cava* (L.) Schweigg. et Koerte – dymnivka dutá²⁵¹

3.4.2 Botanická charakteristika

Rod *Corydalis* DC. obsahuje asi 80 druhů rostoucích v mírném pásmu Eurasie, s těžištěm rozšíření ve střední a východní Asii. Na území České republiky roste několik druhů dymnivek: *Corydalis cava* (L.) Schweigg. et Koerte – dymnivka dutá (obr. 4), *Corydalis intermedia* (L.) Mérat – dymnivka bobovitá, *Corydalis pumila* (Host) Rchb. – dymnivka nízká a *Corydalis solida* (L.) Clairv. – dymnivka plná. Vyskytují se i kříženci uvedených druhů²⁵¹.



Obr. 4 *Corydalis cava* (L.) Schweigg. et Koerte²⁵²

3.4.2.1 *Morfologický popis*

Dymnivka dutá je vytrvalá bylina s velkou, dutou podzemní hlízou, s kořínky na celém povrchu. Přímá, lysá lodyha je 10–35, vzácně až 50 cm vysoká, jednoduchá, zelená až červenohnědá s 2(–3) dlouze řapíkatými lodyžními listy. Tyto listy jsou široce trojúhelníkovité s 2krát trojčetně dělenou modrozelenou čepelí. Květenstvím je přímý hrozen s 8–20 květy. Listeny jsou vejčité nebo skoro eliptické, celokrajné, většinou sivomodře zbarvené. Květy jsou nachové, bílé či řidčeji růžové s ostruhou na konci pravoúhle dolů ohnutou. Tobolky v obrysu podlouhle kopinaté, 20–25 mm dlouhé. Kveté od března do května²⁵¹.

3.4.2.2 *Stanoviště a rozšíření*

Dymnivka dutá roste většinou ve světlých humózních hájích, lužních lesích a smíšených listnatých lesích, na humózních půdách, a to jak v nížinách, tak i v podhůří. Obvykle můžeme vidět červeně i bíle kvetoucí rostliny pohromadě. Roste v celé střední a jižní Evropě. V ČR se vyskytuje hojně²⁵¹.

3.4.3 *Obsahové látky*

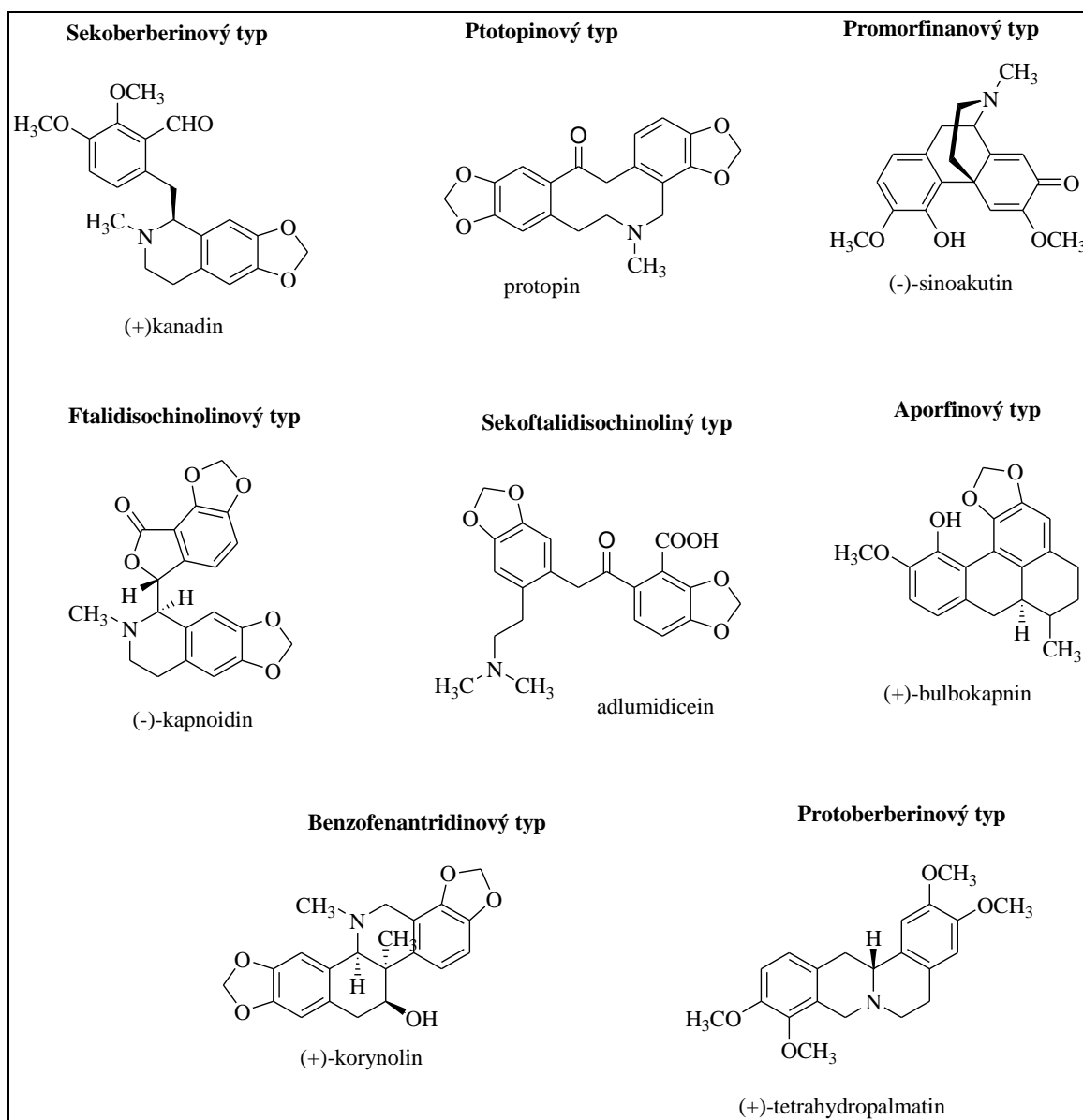
Rod *Corydalis* DC. obsahuje jako hlavní sekundární metabolity isochinolinové alkaloidy patřící do různých strukturních typů. Nejčastěji jsou zastoupeny alkaloidy protoberberinového, protopinového, ftalidisochinolinového typu, často také aporfinového a benzo-fenanthridinového typu. Dále jsou přítomny alkaloidy kularinové a spiroisochinolinové, jednoduché isochinoliny, ojediněle baze dibenzazoninového, indanobenzazepinového, promorfinanového, nebo sekoberberinového skeletu^{15,253}.

Kromě alkaloidů byly v dymnivkách identifikovány anthocyanidiny²⁵⁴, flavonoidní glykosidy^{255,256}, anthrachinony, triterpeny, steroidy²⁵⁷, kumariny²⁵⁸, silice^{259,260} a fumarová kyselina¹².

3.4.3.1 *Isochinolinové alkaloidy dymnivky duté*

Dosud bylo izolováno a identifikováno v dymnivce duté přibližně 40 alkaloidů patřících k různým strukturním typům, z kvantitativního hlediska je hlavním alkaloidem bulbo-kapnin^{12,14,15,102,261,262,263}. Obsah alkaloidů se v jednotlivých morfologických částech rostliny velmi liší. Nadzemní části rostliny obsahují 0,84%, semena 0,45% a hlízy dokonce

4–6% alkaloidů^{14, 264}. Z dymnivky duté byly izolovány alkaloidy různých strukturních typů:



Obr. 5 Strukturní typy isoquinolinových alkaloidů dymnivky duté

- **protoberberinový:** berberin, dehydrokorydalin, isoapokavidin, (±)-isokorypalmin, (+)-isokorypalmin, (-)-isokorypalmin, jatrorrhizin, (+)-kanadin, kolumbamin, koptisin, (+)-korydalin, (-)-korydalin, (+)-korypalmin, korysamin, 13-methylberberin, palmatin, (-)-skulerin, (-)-stylopin, (+)-tetrahydrokorysamin, (+)-tetrahydropalmatin, (-)-tetrahydropalmatin, (±)-tetrahydropalmatin, (+)-thaliktrikavin a (±)-thaliktrikavin.
- **sekoerberinový:** (+)-kanadalin a (-)-kanadalin.

- **protopinový:** allokryptopin, (±)-korykavamin, (+)-korykavamin, (+)-korykavidin, (±)-korykavidin a protopin.
- **benzofenanthridinový:** (+)-korynolin.
- **promorfinanový:** (-)-sinoakutin.
- **ftalidisochinolinový:** (-)-kapnoidin.
- **sekoftalidisochinolinový:** adlumidicein.
- **aporfinový:** (+)-bulbokapnin, (+)-bulbokapninmethohydroxid, dehydronantein, (+)-domestin, (+)-glaucin, (+)-isoboldin, (+)-korydin, (+)-korytuberin, (+)-magnoflorin, (+)-*N*-methyllaurotetanin a (+)-predicentrin.

3.4.4 Biologická aktivita obsahových látek

3.4.4.1 *Dymnivka dutá v lidovém léčitelství*

Ve středověku byly hlízy dymnivky duté používány při ochrnutí končetin, bolestech, bolestech hlavy a neurózách¹². V lidovém léčitelství našly uplatnění v terapii paměťové dysfunkce³, nálevy a tinktury při onemocněním tasemnicemi, menstruačních obtížích²⁶⁵, parkinsonismu a Ménièrově chorobě²⁶⁶. Vodné extrakty se používaly zevně jako obklady na špatně se hojící rány a vředy²⁶⁷. Daleko větší uplatnění v lidovém léčitelství našly některé druhy dymnivek používané po staletích v tradiční asijské medicíně: *C. amabilis* Migo, *C. ambigua* Kuntze, *C. decumbens* (Thunb.) Pers. a *C. turtschaninovii* Bess.²⁶⁸. Hlízy těchto druhů dymnivek hrají důležitou roli jako analgetika, zvláště v terapii křečových, břišních a menstruačních bolestí²⁶⁹.

3.4.4.2 *Přehled biologických aktivit alkaloidů dymnivky duté*

U isochinolinových alkaloidů obsažených v dymnivce duté byly prokázány tyto biologické aktivity (v přehledu jsou uvedené jen alkaloidy vykazující biologickou aktivitu):

- **allokryptopin:** inhibice cytochromu CYP 2D6⁴¹⁰, aminotransferasy (AST)⁴⁰³, NADH dehydrogenasy³⁹⁹, aldosareduktasy⁴⁰⁰ a efluxu K⁺ iontů v myocytech z králičího srdce²⁷⁰; aktivita nematocidní (*Strongyloides ratti*, *Strongyloides venezuelensis*, *Toxocara canis*) a cytotoxická^{300,348}, antibakteriální (*S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. agalactiae*)³⁹¹, insekticidní (larvy *Culex pipiens pallens*)³⁹³, antifungální (*Microsporium gypseum*, *Epidermophyton floccosum*)³⁹⁵ a antiprotozoální (*Plasmodium falciparum*)³⁹⁵.

rum)³⁹⁷; zvýšení vazby γ -aminomáslené kyseliny (GABA) na membránové synaptické receptory²⁷¹,

- **berberin**: inhibice cytochromu CYP 2D6²⁷², AChE a BuChE⁹⁹, alkoholdehydrogenasy³⁵⁸, xantinoxidasy a superoxidového aniontu³¹⁹, uvolňování katecholaminů a zvýšení koncentrace Ca^{2+} iontů vyvolané acetylcholinem³²⁰, topoisomerasy I²⁷³, monoaminoxidasy (MAO-A)³²², aldosareduktasy³⁸², biosyntézy dopaminu v buněčné linii PC12 (inhibice tyrosinhydroxylasy)³⁷⁹, Na^+/K^+ ATPasy²⁷⁴ a proliferace buněk hladkého svalstva cév²⁷⁵; aktivita hepatoprotektivní, antiflogistická³²⁴, antibakteriální (*Staphylococcus aureus*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Escherichia coli*, *Helicobacter pylori*)^{373,276,327,329}, cytoprotektivní (protektivní efekt proti zastavení G0/G1 fáze buněčného cyklu)³³⁰, antihyperglykemická³⁴⁰, neurotropní (potenciace účinku NGF na vývoj neuritu v buněčné linii PC12)²⁷⁷, antifungální (*Candida albicans*)²⁷⁸, insekticidní (larvy *Hyphantria cunea*, dospělí jedinci *Agelastica coerulea*)^{127,376}, antihyperlipidemická (snížení hladiny sérového cholesterolu a LDL-cholesterolu)²⁷⁹, vasorelaxační (působení na endotel hladkého svalstva, inhibice ACE, uvolnění NO/cGMP, antagonist α_1 -receptorů, aktivace K^+ kanálů, blokace uvolňování intracelulárních Ca^{2+} iontů a antagonist vápníkových kanálů), antiaterosklerotická²⁸⁰, imunomodulační²⁸¹, antifotooxidační³³², nematocidní (*Strongyloides ratti*, *Strongyloides venezuelensis*) a cytotoxická³⁴⁸, antiprotozoální (*Plasmodium falciparum*, *Babesia gibsoni*)^{359,326}; aktivační účinek na myší mikrogliu (linie N9 buněk)²⁸²; indukce apoptózy v promyelotických buňkách (linie HL-60)²⁸³; snížení hladin $\text{A}\beta$ v humáních nádorových buňkách neuroglie (linie H4)²⁸⁴; snížení inzulínové rezistence (zvýšení citlivosti na buněk inzulín, zvýšení exprese mRNA inzulínových receptorů, zvýšení sekrece inzulínu, stimulace glykolýzy, potlačení tvorby adipocytů); snížení produkce NO, snížení exprese TNF- α , pokles hladiny IL-1 α ²⁸⁵; zvýšení produkce reaktivních forem kyslíku po excitaci UVA zářením³³³; tvorba nekovalentního komplexu s DNA³³⁴; zhášení hydroxylového radikálu a chelatace Fe^{2+} iontů³⁸³; snížení koncentrací adrenalinu a noradrenalinu v plazmě²⁸⁶; relaxační účinek na izolovanou prasečí tracheu²⁸⁷,
- **(+)-bulbokapnin**: inhibice cytochromu CYP 3A4⁴¹⁰, AChE¹³ a BuChE^{92,102}, koňské alkoholdehydrogenasy²⁸⁸; aktivita antioxidační (inhibice mikrosomální lipidové peroxidace)²⁸⁹, neuroleptická, antikonvulzivní, analgetická²⁹⁰; induktor chromozomální aberace)²⁹¹; antagonist D_1 , D_2 receptorů^{292,293}; snížení hladiny dopaminu v buněčné linii PC12 (inhibice biosyntézy dopaminu – inhibice tyrosinhydroxylasy) a hladiny in-

tracelulárních Ca^{2+} iontů²⁹⁴; zvýšení transportu sodných iontů přes žabí kůži²⁹⁵ a vyvolání katatonie^{17,296},

- **dehydroapokavidin**: účinek cytotoxický (buněčné linie Saos-2, A375 a HeLa)³⁶⁰ a antivirotický (inhibice aktivity viru hepatitidy B)²⁹⁷,
- **dehydrokorydalin**: inhibice mozkové GABA transaminasy³⁵⁰ a aldosareduktasy²⁹⁸; účinek chemoprotektivní³¹⁷, antiflogistický²⁹⁹, nematocidní (*Strongyloides ratti*, *Strongyloides venezuelensis*, *Toxocara canis*) a cytotoxický^{300,348}; tlumení alergických reakcí³⁰¹,
- **(+)-domestín**: inhibice koňské alkoholdehydrogenasy²⁸⁸,
- **(+)-glaucin**: inhibice mozkové GABA transaminasy³⁵⁰, AChE⁹⁹, trombocytární agregace³¹⁸, adenylátcyklasy v CNS³⁰² a koňské alkoholdehydrogenasy²⁸⁸; působení antifungální (*Microsporum canis*, *Microsporum gypseum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Ceratocystis coerulescens*, *Fusarium oxysporum*, *Phialophora melinii*, *Pleurotus ostreatus*, *Polyporus sulphureus*)^{303,395}, antihyperglykemické (stimulace uvolnění inzulínu)³⁸⁶, antivirotické (poliovirus, kmen Sabin II)³¹², cytotoxické (HeLa nádorové buňky, leukemie P388 a L1210, melanom B16, karcinom močového měchýře MBC2, karcinom tlustého střeva Colon 26, indukce chromozomální aberace)^{304,305,291}, neuroleptické, antikonvulzivní a analgetické²⁹⁰, bronchospasmolytické (selektivní inhibice fosfodiesterasy-4, inhibice vápníkových kanálů)³⁰⁶, imunosupresivní (inhibice lipopolysacharidy vyvolané proliferace splenocytárních buněk *in vitro*)³⁰⁷, antioxidační (inhibice lipidové peroxidace)^{289,308}, antiprotozoální (*Trypanosoma cruzi*)³⁸⁵, vasorelaxační (inhibice vápníkových kanálů)³⁰⁹, chemoprotektivní³¹⁷, antiflogistické²⁹⁹; antagonisty D_1 , D_2 dopaminových³¹⁰, serotoninových³¹¹ a α_1 -adrenergních receptorů³⁸⁷,
- **isoapokavidin**: agonista GABA_A receptorů²⁶¹,
- **(+)-isoboldin**: aktivita antivirotická (poliovirus, kmen Sabin II)³¹², antifungální (*Alternaria alternata*, *Colletotrichum nicotianae*, *Saccharomyces cerevisiae*)³¹³, spasmolytická (relaxace hladké svalstva na izolované morčecí trachey)³¹⁴; suprese splenocytární proliferace vyvolané lipopolysacharidy³¹⁵ a syntézy protilátek proti ovčím erytrocytům³¹⁶; inhibice fagocytární aktivity myších peritoneálních makrofágů,
- **(-)-isokorypalmin**: agonista GABA_A receptorů²⁶¹, chemoprotektivní³¹⁷ efekt a inhibice trombocytární agregace³¹⁸,
- **jatrorrhizin**: inhibice alkoholdehydrogenasy³⁵⁸, xanthinoxidasy a superoxidového aniontu³¹⁹, uvolňování katecholaminů a zvýšení koncentrace Ca^{2+} iontů vyvolané ace-

tylcholinem v bovinních buňkách dření nadledvinek³²⁰, trombocytární agregace³²¹, inhibice monoaminoxidasy (MAO-A, MAO-B)³²² a inhibice AChE a BuChE^{92,124}; aktivita neuroprotektivní (snížení poškození buňky peroxidem vodíku)³²³, antioxidační (zhášení peroxynitritových radikálů)¹²⁷, hepatoprotektivní, antiflogistická³²⁴, antiprotozoální (*Plasmodium falciparum*, *Babesia gibsoni*) a antifungální (*Candida albicans*)^{325,326}, antibakteriální (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris*, *Escherichia coli*)^{327,328,329}, antihyperglykemická a cytoprotektivní (snížení produkce peroxynitritového radikálu v buňce, snížení fragmentace DNA, zvýšení životnosti buněk)³³⁰, antitumorová (buněčná linie rakoviny prsu MCF-7/6)³³¹ a antifotooxidační³³²; zvýšení produkce reaktivních forem kyslíku po excitaci UVA zářením³³³, tvorba nekovalentního komplexu s DNA³³⁴, indukce kontrakcí hladkého svalstva (aktivace M₃-muskarinových receptorů a ovlivnění influxu Ca²⁺ iontů vápníkovými kanály)³³⁵; snížení exprese TNF-α²⁸⁵,

- **(+)-kanadalín:** inhibice AChE a BuChE¹⁰²; působení antibakteriální (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus sanguis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*)³³⁶ a adrenolytické (blokování účinku adrenalinu na králičí aortu)³³⁷; relaxační účinek na izolovanou prasečí tracheu (působení na adrenergní a adenosinové receptory)²⁸⁷; induktor kontrakcí hladkého svalstva morčecího izolovaného ilea (uvolnění acetylcholinu z nervového zakončení)³³⁸,
- **(+)-kanadin:** inhibice AChE¹⁰² a mozkové GABA transaminasy³⁵⁰,
- **kapnoidin:** inhibice cytochromu CYP 2D6, CYP 2C19 a CYP 3A4)⁴¹⁰,
- **kolumbamin:** inhibice AChE a BuChE⁹²; účinek antiflogistický (inhibice tvorby NO a aktivace NF-κB v buňkách makrofágů buněčné linie RAW264.7)³³⁹ a antihyperglykemický³⁴⁰,
- **koptisin:** inhibice alkoholdehydrogenasy³⁵⁸, MAO³⁴¹, aldosareduktasy³⁴², AChE a BuChE^{92,127} a proliferace buněk hladkého svalstva cév²⁷⁵; aktivita nematocidní (*Strongyloides ratti*, *Strongyloides venezuelensis*) a cytotoxická³⁴⁸, antivirotická (inhibiční aktivita vůči viru hepatitidy B)³⁷², antifotooxidační³³² a spasmolytická (izolované morčecí ileum)³⁴³, cytotoxická (buněčné linie Saos-2, A375 and Hela, interkalační působení na DNA, cytoprotektivní (snížení produkce peroxynitritového radikálu v buňce, snížení fragmentace DNA, protektivní efekt proti zastavení G0/G1 fáze buněčného cyklu)³³⁰, antihyperglykemická³⁴⁰, antibakteriální (*Bifidobacterium adolescentis*, *Escherichia coli*)^{329,373}, insekticidní (dospělí jedinci *Agelastica coerulea*)³⁷⁶,

antifungální (inhibice růstu *Candida albicans*)³⁴⁴; tvorba nekovalentního komplexu s DNA)^{334,345,360}; zhášení hydroxylového radikálu a chelatace Fe²⁺ iontů³⁸³; protektivní efekt na membránu buněk mukózy žaludku proti poškození vyvolané ethanolom³⁴⁶, zvýšení exprese genu pro P-glykoprotein v hladkém cévním svalstvu (buněčná linie A10) a stimulace efluxu rhodaminu³⁴⁷,

- **(+)-korydalin**: účinek antifungální (*Cladosporium herbarum*)⁴³⁶, chemoprotektivní³¹⁷, nematocidní (*Strongyloides ratti*, *Strongyloides venezuelensis*)³⁴⁸ a antihyperlipidemický³⁵⁷; inhibice cytochromu CYP 3A4⁴¹⁰, migrace a proliferace nádorových buněk tlustého střeva (buněčná linie 26-L5)³⁴⁹, trombocytární agregace³¹⁸ a AChE^{97,102},
- **(-)-korydalin**: agonista GABA_A receptorů²⁶¹ a inhibice mozkové GABA transaminasy³⁵⁰,
- **(+)-korydin**: inhibice CYP3A4⁴¹⁰; působení antiprotozoální (*Plasmodium falciparum*)³⁵¹, cytotoxické (poškození aktivity DNA, leukemie P388 a L1210, melanom B16, karcinom močového měchýře MBC2, karcinom tlustého střeva Colon 26, mitogenem vyvolané proliferace lymfocytů)^{305,352},
- **(+)-korykavamin**: selektivní inhibice CYP 2D6⁴¹⁰,
- **(±)-korykavidin**: inhibice BuChE¹⁰²,
- **(+)-korykavidin**: inhibice cytochromu CYP 2D6 a CYP 3A4⁴¹⁰,
- **(+)-korynolin**: aktivita antifungální (inhibice růstu rostlinného patogenu *Cladosporium herbarum*)⁴³⁶, cytotoxická (nádorové buňky A549, SK-OV-3, SK-MEL-2 a HCT15)³⁵³, antiflogistická³⁵⁴ a hepatoprotektivní (inhibice tetrachlormethanem vyvolané mikrosomální lipidové peroxidace)³⁵⁵; inhibice cytochromu CYP 3A4, CYP 2C9)³⁵⁶ a inhibice AChE¹⁰¹,
- **(+)-korypalmin**: působení hypolipidemické³⁵⁷; inhibice AChE¹⁰²,
- **korysamin**: inhibice alkoholdehydrogenasy³⁵⁸; aktivita antiprotozoální (*Plasmodium falciparum*)³⁵⁹ a cytotoxická (buněčné linie Saos-2, A375 a Hela)³⁶⁰,
- **(+)-korytuberin**: účinek neuroleptický, antikonvulzivní a analgetický (inhibice aktivity zádových končetin krys, zvýšení poklesu víček, katalepsie, hypotermie, prodloužení anestézie thiopentalem, redukce bolestivosti, antikonvulzivní aktivita, v nízkých dávkách antagonizování analgetického účinku morfinu)²⁹⁰.
- **(+)-magnoflorin**: aktivita antivirotická aktivita (inhibiční aktivita vůči viru hepatitidy B)³⁷², cytoprotektivní (snížení produkce peroxyinitritového radikálu v buňce, snížení

fragmentace DNA, zvýšení buněčné životnosti)³³⁰, antioxidační (zhášení DPPH a peroxynitritového radikálu)³⁶¹, antiflogistická (inhibice serotoninem vyvolaného edému)³⁶², antihyperglykemická³⁴⁰, cytotoxická (hepatocelulární nádorová buněčná linie HEPG2 a mozková nádorová buněčná linie U251)³⁶³ a imunosupresivní (potlačení vyvolané zpožděné hypersenzitivní reakce)³⁶⁴; inhibice AChE a BuChE^{99,127},

- **13-methylberberin**: inhibice alkoholdehydrogenasy³⁵⁸ a AChE⁹¹; účinek cytotoxický (různé linie buněk)³⁶⁵, antiprotozoální (*Plasmodium falciparum*)³⁶⁶ a antibakteriální (*Staphylococcus aureus*)³⁶⁷,
- **(+)-N-methylaurotetanin**: agonista 5-HT_{1A} receptorů³⁶⁸; působení antifungální (*Ceratomyces coerulescens*, *Fusarium oxysporum*, *Phialophora melinii*, *Pleurotus ostreatus*, *Polyporus sulphureus*)³⁰³, antivirotické (poliovirus, kmen Sabin II)³¹² a antioxidační (zhášení DPPH radikálu; inhibice lipidové peroxidace³⁶⁹ a trombocytární agregace³⁷⁰,
- **palmatin**: aktivita cytotoxická⁴⁰⁸, antivirotická (HSV-1, virus hepatitidy B)^{371,372}, antiprotozoální (*Plasmodium falciparum*, *Babesia gibsoni*) a antifungální (*Candida albicans*)^{325,326}, hepatoprotektivní, antiflogistická^{324,339}, antibakteriální (inhibice růstu *Staphylococcus aureus*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Pasteurella multocida*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Escherichia coli*)^{327,329,373,374}, cytoprotektivní (snížení produkce peroxynitritového radikálu v buňce, protektivní efekt proti zastavení G0/G1 fáze buněčného cyklu)³³⁰, antihyperglykemická³⁴⁰, sedativní (snížení koncentrace dopaminu a kyseliny homovanilové v mozkové kůře, serotoninu v mozkovém kmeni krys; zvýšení serotoninu v mozkové kůře a kys. 5-hydroxyindolactové v mozkovém kmeni)³⁷⁵ a insekticidní (larvy *Hyphantria cunea*, dospělí jedinci *Agelastica coerulea*)³⁷⁶; inhibice AChE, BuChE^{127,377}, alkoholdehydrogenasy³⁵⁸, uvolňování katecholaminů a zvýšení koncentrace Ca²⁺ iontů vyvolané acetylcholinem v bovinních buňkách dření nadledvinek³²⁰, sekrece Cl⁻ iontů aktivovaných Ca²⁺ ionty a cAMP ve střevní mukóze krys³⁷⁸, biosyntézy dopaminu v buněčné linii PC12 (inhibice tyrosinhydroxylasy)³⁷⁹, monoaminoxidasy (MAO)³⁸⁰, kontrakcí hladkého arteriálního svalstva (pokles intracelulární koncentrace vápenatých iontů a influxu Ca²⁺ iontů vápníkovými kanály)³⁸¹ a aldosareduktasy³⁸²; zvýšení produkce reaktivních forem kyslíku po excitaci UVA zářením³³³; tvorba nekovalentního komplexu s DNA³³⁴; zhášení hydroxylového radikálu a chelatace Fe²⁺ iontů³⁸³, pokles hladiny IL-1 α ²⁸⁵,

- **predicentrin**: inhibice trombocytární agregace³⁸⁴; aktivita antiprotozoální (*Trypanosoma cruzi*)³⁸⁵ a antihyperglykemická (stimulace uvolnění inzulínu)³⁸⁶; selektivní antagonist α_1 -adrenergických receptorů³⁸⁷,
- **protopin**: aktivita antiagregační (inhibice fosfolipasy a tromboxansynthasy)^{318,407,388}, cytotoxická⁴⁰⁸, nematocidní (*Strongyloides ratti*, *Strongyloides venezuelensis*)³⁴⁸, antivirotická (inhibiční aktivita vůči viru hepatitidy B)³⁷², cytoprotektivní (hepatoprotektivní)³⁸⁹, spasmolytická³⁹⁰, antibakteriální (*S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. agalactiae*, *H. pylori*)^{276,391}, neuroprotektivní (snížení intracelulární koncentrace Ca^{2+} iontů a inhibice apoptózy, exprese kaspasy-3 a oxidativního stresu vyvolaný H_2O_2 v buněčné linii PC12)³⁹², insekticidní (larvy *Culex pipiens pallens*)³⁹³, vasodilatační (zvýšení koncentrace cAMP a cGMP, snížení hladin Ca^{2+} iontů, přemístění proteinkinasy C (PKC) z cytosolu k buněčné membráně)³⁹⁴, antifungální (*Microsporium canis*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Cladosporium herburnum*)^{395,396}, antiprotozoální (*Plasmodium falciparum*)³⁹⁷, antihypertenzivní, antiarytmická a negativně inotropní (inhibice vápníkových kanálů)³⁹⁸; inhibice cytochromu CYP 2D6⁴¹⁰, inhibice NADH dehydrogenasy³⁹⁹, aldosareduktasy⁴⁰⁰, inhibice mozkové GABA transaminasy³⁵⁰, inhibice AChE a BuChE⁹⁹; alosterická modulace GABA_A receptorů⁴⁰¹; regulace hladin glutamátu v mozku (stimulační efekt na glutamátdehydrogenasu)⁴⁰²; zvýšení aktivity aminotransferasy (AST)⁴⁰³; antagonist opiodních δ -receptorů⁴⁰⁴; indukce apoptózy v promyelotických buňkách (linie HL-60)²⁸³,
- **(-)-sinoakutin**: účinek antivirotický (inhibiční aktivita vůči viru hepatitidy B)³⁷², vasorelaxační⁴⁰⁵, cytoprotektivní (protektce před poškozením buňky H_2O_2)⁴⁰⁶ a antiprotozoální (*Plasmodium falciparum*, *Entamoeba histolytica*)³⁹⁷,
- **(-)-skulerin**: aktivita antiagregační⁴⁰⁷, cytotoxická⁴⁰⁸ a sedativní⁴⁰⁹; inhibice AChE¹⁰², cytochromu CYP 2D6⁴¹⁰, lipidové peroxidace a zhášení volných hydroxylových radikálů⁴¹¹; agonista GABA_A²⁶¹ a D₁-dopaminových receptorů⁴¹²,
- **(-)-stylopin**: inhibice cytochromu CYP 2D6, CYP 2C19 a CYP 3A4⁴¹⁰; účinek chemoprotektivní³¹⁷, nematocidní (*Strongyloides ratti*, *Strongyloides venezuelensis*)³⁴⁸, insekticidní (inhibice AChE u *Drosophila melanogaster*)⁹⁷, cytotoxický (buněčné linie karcinomu prsu MCF a prostaty DU-145)⁴¹³ a antiflogistický⁴¹⁴,
- **(+)-tetrahydropalmatin**: inhibice cytochromu CYP 2C⁴¹⁵, mozkové GABA transaminasy³⁵⁰, P-glykoproteinu⁴¹⁶; aktivita hypolipidemická³⁵⁷ a snížení hladiny dopaminu ve striatu potkana⁴¹⁷,

- **(-)-tetrahydropalmatin:** antagonist D₁-, D₂- a α₁-, α₂-adrenergních receptorů; agonista GABA_A receptorů²⁶¹; působení na D₃-dopaminové a serotoninové receptory⁴¹⁸, aktivita analgetická⁴¹⁹, cytotoxická⁴⁰⁸, sedativní, hypnotická⁴²⁰ a spasmolytická⁴²¹; inhibice P-glykoproteinu⁴²², lipidové peroxidace⁴¹¹ a vápníkových kanálů⁴²³,
- **(±)-tetrahydropalmatin:** účinek chemoprotektivní³¹⁷, nematocidní (*Strongyloides venezuelensis*), cytotoxický (HL60)³⁴⁸, antiflogistický⁴²⁴, cytoprotektivní (pozitivní účinek proti oxidačnímu stresu a poškození buňky γ-zářením)⁴²⁵, analgetický⁴²⁶, cytotoxický (buněčné linie LS174T a HepG2)⁴²⁷, antikonvulzivní a antiepileptický^{428,429}, antihypertenzní^{430,431,432}, sedativní⁴⁰⁹ a anxiolytický⁴³³; inhibice cytochromu P450 (CYP2D6)⁴¹⁰, klíčení spór vybraných saprofytických a patogenních druhů hub⁴³⁴ a AChE⁹⁷; snížení pohybové aktivity, snížení koncentrace noradrenalinu, dopaminu v mozkové kůře a kmeni krys, ve vyšších dávkách i serotoninu, zvýšení koncentrace kyselin homovanilové a 5-hydroxyindoloctové⁴³⁵,
- **(+)-thaliktrikavin:** aktivita antifungální (inhibice růstu *Cladosporium herbarum*)⁴³⁶, inhibice cytochromu CYP 1A2 a CYP 2B6⁴¹⁰.

3.5 Alzheimerova choroba

3.5.1 Charakteristika nemoci

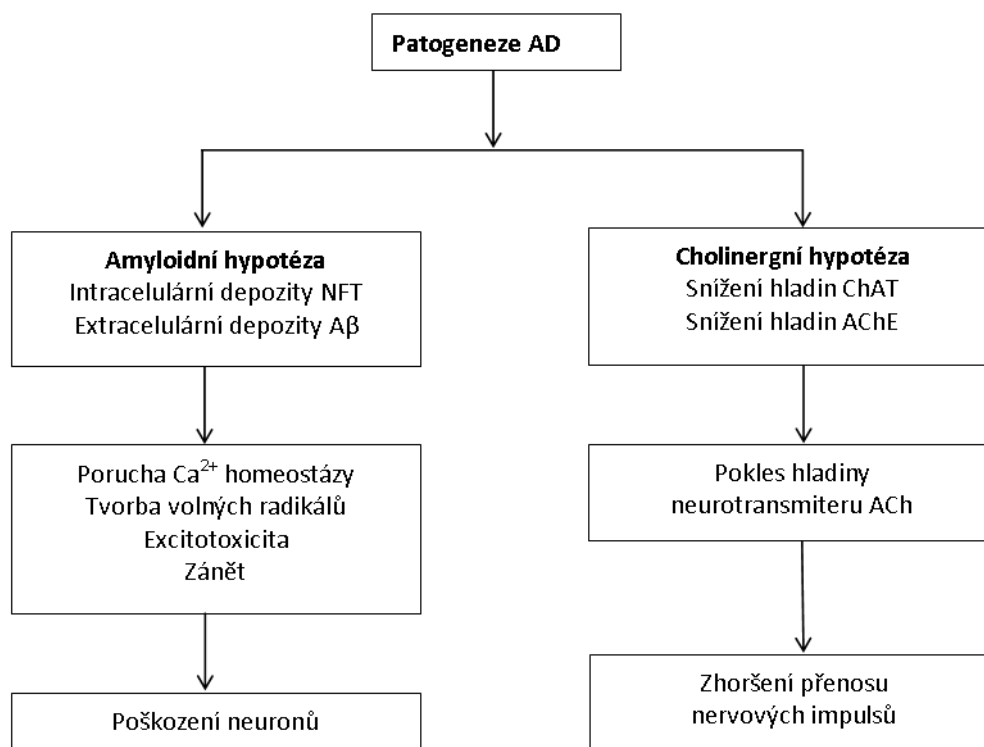
Alzheimerova nemoc (AD) je progresivní neurodegenerativní onemocnění, z hlediska četnosti se jedná vůbec o nejrozšířenější formu demence – je zodpovědná za 50-60 % všech demenci⁴³⁷ a postihuje až 5 % populace starší 65 let. Počet pacientů trpících AD však neustále roste⁴³⁸. AD je charakterizována silným poklesem funkcí centrálního cholinergního systému, což vyvolává závažné kognitivní poruchy (postupná ztráta paměti, úvahy, orientace a úsudku)⁴³⁹ a vývojem čtených behaviorálních funkcí zahrnujících zmatenost, depresi a agresi. Má se za to, že, kognitivní a behaviorální stránky nemoci jsou důsledkem změn neuronálních funkcí a ztrátou neuronů prvotně se vyskytujících v hippocampu. Při dalším rozvoji AD dochází k postižení dalších oblastí mozku, včetně mozkové kůry⁴⁴⁰.

Z etiologického hlediska patří AD mezi multifaktoriální onemocnění – příčiny AD mohou být genetické, zánětlivé, často poúrazové a také v důsledku cerebrální ischemie (iktu)⁴⁴¹. Z patofyziologického hlediska je AD charakterizována primárně dvěma nálezy: degenerací centrálních cholinergních funkcí (cholinerní teorie) a tvorbou významných amyloidních plak v mozku (A β peptidová teorie)⁴⁴², celá situace je však složitější a především terapeutický zásah do průběhu patofyziologických procesů je svízelnější, jak o tom hovoří sdělení z nedávné doby⁴⁴³.

Podle amyloidní teorie je akumulace A β (extracelulární ukládání A β v neuritických placích) primární příčinou patogeneze AD. A β je hlavní amyloidní protein skládající se z 39–43 aminokyselin. Další proces, tvorba neurofibrilárních klubek (NFT), obsahujících hyperfosforylovaný τ -protein, je pokládán za následek nerovnováhy mezi produkcí a odstraňování A β ⁴⁴⁴.

Podle cholinerní teorie AD, vyplývá ztráta cholinerních funkcí v centrálním nervovém systému z poklesu hladin neurotransmiteru ACh a přispívá ke snížení kognitivních funkcí. Cholinerní systém, zodpovědný za cholinerní inervaci v mozkové kůře a dalších oblastech mozku, je u AD významně poškozen⁴⁴⁵. U choroby dochází k snížení aktivity enzymu cholinacetyltransferasy (ChAT)⁴⁴⁶, syntetizující ACh z cholinu a acetylkoenzymu A. V pozdní fázi dochází k poklesu hladin AChE až o 85% a BuChE se stává převažující cholinesterasu v mozku⁴⁴⁷. BuChE, primárně spojována s gliovými buňkami,

ale rovněž se specifickými neuronovými dráhami⁴⁴⁸, štěpí ACh podobným způsobem jako AChE a ukončuje jeho fyziologické působení⁴⁴⁹.



Obr. 6 Patogeneze Alzheimerovy choroby⁴⁵⁰

3.5.2 Léčiva používaná v současnosti

Protože etiologie AD není ještě plně objasněna, vychází se ve farmakoterapii ze známých etiologických řetězců. Nejrozšířenějším typem biologické terapie je farmakoterapie, zaměřená především na ovlivnění poznávacích a výkonných funkcí. V současné době jsou používány 2 hlavní farmakoterapeutické postupy:

- 1) kognitiva (inhibitory cholinesteras)
- 2) inhibitory NMDA receptorů.

V terapii AD existuje další farmakoterapeutické přístupy, které nejsou tak jednoznačně účinné jako inhibitory cholinesteras a NMDA receptorů. Jejich použití již není jednoznačně založeno na důkazech, jsou brány jako doplňková léčba, nebo se podávají u lehkých forem demence AD. Tyto přístupy mohou farmakologicky ovlivnit vlastní neurodegenerativní procesy na různých úrovních (např. nootropika, antioxidanty, nesteroidní anti-flogistika)^{21,249}.

3.5.2.1 Inhibitory cholinesteras

Užití inhibitorů mozkových cholinesteras je nejužívanější postup v terapii AD, především u lehkých až středních forem. Tyto látky náležejí do skupiny kognitiv, ovlivňujících příznivě centrální acetylcholinergní transmisi. Předpokládá se, že acetylcholinergní neurony tvoří substrát pro reverberační okruhy, které zprostředkují krátkodobou paměť a paměťovou konsolidaci.

Inhibitory acetylcholinesteras představují chemicky nejednotnou skupinu, jednotlivé látky se liší také v typu inhibice a v tom, zda inhibují nebo neinhibují BuChE. V současnosti je spektrum klinicky využitelných anticholinesterasových látek relativně úzké^{451,452}. V ČR jsou *de facto* používány 3 inhibitory AChE: rivastigmin, donepezil a galanthamin²⁴⁹. Dovedávna používaný takrin se stal v terapii nepoužívaným pro svůj hepatotoxický účinek^{453,454}.

3.5.2.2 Inhibitory NMDA receptorů

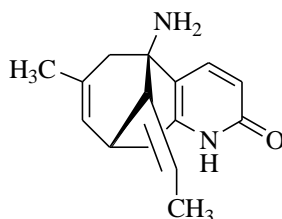
U AD a dalších neurodegenerativních poruch dochází k nadměrnému uvolnění excitačních aminokyselin (glutamát, aspartát aj.) a nadměrné excitaci NMDA receptorů (excitotoxicita). Následně dochází k nadměrnému influxu kalcia do neuronů, které způsobí aktivaci řady enzymů – především proteinkinas a fosfatas, což má za následek změnu neuronálních proteinů včetně jejich prostorového uspořádání. Nakonec dochází k aktivaci genu pro apoptózu a neurony ve zvýšené míře zanikají. Nadměrnou excitací NMDA receptorů také dochází ke zvýšení přenosových šumů, které pak brání přenosu žádoucích potenciálů. Nekompetitivní a parciální inhibitory NMDA receptorů pak zabraňují těmto jevům. V ČR je registrovaný jediný inhibitor NMDA receptorů pro terapii střední až těžké formy AD – memantin²⁴⁹.

3.5.3 Perspektivní přírodní látky pro terapii Alzheimerovy choroby

3.5.3.1 Inhibitory cholinesteras

Zásah do aktivity (resp. inhibice) obou cholinesteras lidského mozku z hlediska zlepšení kognitivních funkcí je stále významným krokem k ovlivnění průběhu tohoto nevyлéčitelného onemocnění, ačkoliv jsou hledána (a jsou používána nebo jsou perspektivní) i léčiva jiných farmakoterapeutických skupin⁴⁴³. Mnoho látek přírodního původu vykazuje signifikantní inhibici cholinesteras, ale v současnosti se jedná *de facto* jen o jednu látku, která

se jeví jako perspektivní pro terapii mírné až střední formy AD a nachází se v 2. fázi klinického zkoušení – huperzin A⁴⁵⁵.



Obr. 7 (-)-huperzin A

Huperzin A (Hup A) je alkaloid chinolizidinového typu, který byl prvně izolován z *Huperzia serrata* (Thunb. ex Murray) Trevis. (Huperziaceae) a rovněž byl nalezen v *Huperzia selago* (L.) Bernh. ex Schrank & Mart. (Huperziaceae) a *Lycopodium varium* R.Br. (Lycopodiaceae)⁴⁵⁶. Hup A je reverzibilní inhibitor AChE, který inhibuje mnohem výrazněji AChE než BuChe ($IC_{50} = 0,082 \mu\text{M}$ a $IC_{50} = 74,43 \mu\text{M}$)⁴⁵⁷. Hup A je opticky aktivní látka, v přírodě se vyskytuje jen (-)-enantiomer. Syntetická racemická směs je *in vitro* 3krát méně účinná než přírodní látka ($IC_{50} = 0,3 \mu\text{M}$ oproti $IC_{50} \sim 0,1 \mu\text{M}$), přesto je racemická směs *in vitro* mnohem účinnějším inhibitorem AChE než fysostigmin ($IC_{50} = 0,6 \mu\text{M}$)⁴⁵⁸. Hup A se stal předlohou pro syntézu nových látek potenciálně využitelných v terapii AD. Huperzin-takrinové deriváty (hupriny) vykazovaly velmi výraznou inhibici AChE v subnanomolekulárních koncentracích⁴⁵⁹.

U opic zlepšoval Hup A *in vivo* parametry paměti, která byla experimentálně narušena reserpinem a yohimbinem⁴⁶⁰. K zlepšení paměťového deficitu u krys, vyvolaného skopolaminem, bylo potřeba v případě p. o. podání Hup A nižších dávek než u syntetického, komerčně dostupného inhibitoru takrinu. Hup A navíc vykazoval vyšší biologickou dostupnost a lepší průchodnost přes hematoencefalickou bariéru⁸.

V Číně byl Hup A testován v několika klinických studiích a byla prokázána jeho účinnost u 447 pacientů trpících demencí, nebo stařeckou paměťovou dysfunkcí. Nejčastěji vyskytující nežádoucí účinky (závratě, nevolnost a průjem) souvisely s jeho cholinergními vlastnostmi. Nebyla prokázána žádná jaterní, ani ledvinová toxicita^{111,461}.

Hup A vykazuje další farmakologické vlastnosti. Studie používající buněčné kultury ukázaly, že Hup A snižuje neurální buněčnou smrt vyvolanou toxickými hladinami glutamátu⁴⁶², chrání neurony před apoptózou vyvolanou $A\beta$ ⁴⁶³, zvyšuje sekreci sAPP (sekrečního amyloidního prekurzorového proteinu α)⁴⁶⁴. Hup A je rovněž znám jako silný

antioxidant – zvyšuje aktivitu antioxidantních enzymů glutathionperoxidreduktasy, superoxidodismutasy, katalasy a potlačuje lipidovou peroxidaci⁴⁶⁵.

3.5.3.2 Další farmakoterapeutické postupy

V současné době jsou přírodní látky, které by mohly farmakologicky ovlivnit neurodegenerativní procesy AD, intenzivně studovány. Jsou zkoumány zejména sloučeniny, které ovlivňující aktivitu sekretas (enhancery α -sekretasy, inhibitory BACE1 a γ -sekretasy, které nezasahují do Notch systému), inhibující tvorbu a agregaci A β i jím vyvolanou neurotoxicitu a zánět⁴⁶⁶.

V různých fázích klinického testování se nachází několik přírodních látek. Mezi intenzivně studované látky patří např. kurkumin – nachází se ve 2. fázi klinických zkoušek, který vykazuje široké spektrum aktivit potenciálně přínosných pro terapeutické použití u AD – protizánětlivé, chemoprotektivní, antioxidantní účinky. Navíc vykazuje i další terapeuticky využitelné vlastnosti (destabilizace A β agregátů a zmírňuje neurotoxicitu vyvolanou A β). Další zajímavá látka – resveratrol se nachází v 3. fázi klinických zkoušek, vykazuje široké spektrum biologických aktivit, u AD redukuje oxidativní stres a snižuje zánětlivé procesy v mozku. Intenzivně jsou zkoumány i aktivity epigallokatechin-galátu (EGCG), v současné době je testován ve 2. fázi klinických zkoušek. EGCG vykazuje neuroprotektivní účinky, které jsou způsobeny nejen antioxidantní aktivitou, down regulací genů pro programovanou buněčnou smrt ale i ovlivňuje mitochondriální funkce. Navíc, reguluje toxické hladiny A β aktivací α -sekretasy a chrání před agregací A β ⁴⁶⁶.

Navzdory vykazujícím slibným potenciálně terapeutickým aktivitám některých zkoumaných přírodních látek, zejména v *in vitro* testech, nejsou zatím tyto látky využitelné pro klinickou terapii AD a budou muset být dále testovány v dalších studiích (*in vivo* testech) pro ověření jejich biologických aktivit využitelných farmakologicky u AD.

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Materiál

4.1.1 Chemikálie

- acetylthiocholin jodid p. a. (Sigma-Adrich, CZ) (použit 10mM roztok)
- butyrylthiocholin jodid p. a. (Sigma-Adrich, CZ) (použit 10mM roztok)
- dimethylsulfoxid p. a. (Sigma-Adrich, CZ) (DMSO)
- 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina $\geq 98\%$ (Sigma-Aldrich, CZ) (použit 5mM roztok)
- galanthamin hydrobromid 95% (Changsha Organic Herb Inc., China)
- huperzin A 95% (TAZHONGHUI – Tai'an Zhonghui Plant Biochemical Co., Ltd., China)
- L-askorbová kyselina $\geq 99\%$ (Sigma-Adrich, CZ)
- 2,2'-difenyl-1-pikrylhydrazyl radikál (DPPH) 95% (Sigma-Aldrich, CZ)
- fysostigmin 99% (Sigma-Adrich, CZ)
- 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylová kyselina (Trolox) $\geq 97\%$ (Sigma-Aldrich, CZ)
- kvercetin č. (Sigma-Adrich, CZ)
- L-vinná kyselina p. a. (Penta a.s., ing. Švec, CZ)
- jodid draselný p. a. (Penta a.s., ing. Švec, CZ)
- zásaditý dusičnan bizmutitý č. (LachNer, CZ)
- chlorid rtuťnatý p. a. (Fisher Scientific, CZ)
- bezvodý octan sodný p. a. (Sigma-Adrich, Italy)
- HEPES $\geq 99,5\%$ (Sigma-Adrich, Italy)
- CHAPS $\geq 98\%$ (Sigma-Adrich, Italy)
- substrát M-2420 (Bachem, Germany)
- inhibitor IV (Merck, Darmstadt, Germany)
- Panvera peptid (Invitrogen, Milan, Italy)
- triethanolamin p. a. (Sigma-Adrich, Italy) (TEA)
- diethylamin p. a. (LachNer, CZ) (Et₂NH)
- azid sodný p. a. (Sigma-Adrich, Italy)

- triethanolamin 99% (Sigma-Adrich, Italy)
- chlorid amoný p. a. (Sigma-Adrich, Italy)

4.1.2 Rozpouštědla

- chloroform p. a. (Penta a.s., ing. Švec, CZ) (CHCl_3)
- ethyl-acetát p. a. (Penta a.s., ing. Švec, CZ) (EtOAc)
- deuterizovaný chloroform pro NMR (Sigma-Adrich, CZ) (CDCl_3)
- diethylether č. (LachNer, CZ) (Et_2O)
- ethanol 95% (liho var Chrudim, CZ) (EtOH)
- methanol p. a. (Sigma-Adrich, CZ) (MeOH)
- toluen p. a. (Penta a.s., ing. Švec, CZ) ($\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_3$)
- hexan p. a. (Penta a.s., ing. Švec, CZ) (C_6H_{14})
- cyklohexan p. a. (Penta a.s., ing. Švec, CZ) (C_6H_{12})
- kyselina octová 99% (Sigma-Aldrich, Italy) (AcOH)
- kyselina fosforečná 85% (Sigma-Aldrich, Italy) (H_3PO_4)
- kyselina sírová 99% (Penta a.s., ing. Švec, CZ) (H_2SO_4)
- lékařský benzin lékopisné kvality ČL 2009 (Penta a.s., ing. Švec, CZ) (benzin)
- superčistá (Millipore, Milford, MA, USA) (H_2O)

4.1.3 Pufry

4.1.3.1 Stanovení cholinesterasové inhibiční aktivity

- 100mM fosfátový pufř, pH 7,4
(600 ml obsahuje: 57 ml roztoku A (200 mM roztok NaH_2PO_4) a 243 ml roztoku B (200 mM roztok Na_2HPO_4) a 300 ml vody);
- 5mM fosfátový roztok, pH 7,4
(600 ml obsahuje: 57 ml roztoku A (10 mM roztok NaH_2PO_4) a 283 ml roztoku B (10 mM roztok Na_2HPO_4) a 300 ml vody.

4.1.3.2 Stanovení hrBACE1 inhibiční aktivity

4.1.3.2.1 FRET assay

- 10mM HEPES pufr, pH 7,50 (ředění skladovacích roztoků substrátů v DMSO na požadovanou koncentraci před vlastním testováním inhibice BACE1)
- 20mM octan sodný obsahující 0,1 % (m/v) azidu sodného, pH 4,5

4.1.3.2.2 hrBACE1-IMER assay

- 50mM chlorid amonný obsahující CHAPS 0,1 % (m/v), 25mM TEA+DMSO 95:5, pH 4,0 (pufrovaná mobilní fáze pro BACE1-IMER metodu). Mobilní fáze byla před použitím na HPLC přelitována přes membránový filtr (0,45 μ m) a odplyněna.
- 50mM octan sodný obsahující 0,1 % (m/v) azidu sodného, pH 6 (skladovací pufr pro hrBACE1-IMER)

4.1.4 Materiál pro měření BACE1 inhibice

- černé mikrotitrační destičky Corning (96 jamkové, Sigma-Aldrich, Italy)
- EDA-CIM disk (3mm \times 12mm vnitřní průměr, 0,34 ml vnitřní objem, BIA Separations, Ljubljana, Slovenia).

4.1.5 Chromatografické adsorbenty

- *sloupcová chromatografie*: silikagel (Sigma-Aldrich, CZ)

Silikagel Fluka 0,063-0,20 mm byl před použitím nejprve přečištěn (promyt) chloroformem a ethanolem a následně vysušen. Přečištěný silikagel byl aktivován v sušárně po dobu 4 hodin při teplotě 160 °C (tloušťka vrstvy silikagelu nepřesáhla 20 mm). Vychladlý aktivovaný silikagel byl následně deaktivován mícháním s přidavkem vody po dobu 1 hodiny. Silikagel pro sloupcovou chromatografii obsahoval 10 % vody (w/w).

- *analytická TLC*: Kieselgel 60 F₂₅₄ fuer TLC desky 20 \times 20 cm (Merck, CZ)
- *preparativní TLC* (nalévané desky se silikagelem): Kieselgel 60 GF₂₅₄ (Merck, CZ)

4.1.6 Vytvářecí soustavy pro tenkovrstvou chromatografii (TLC)

S1: C₆H₅CH₃ + CHCl₃ + EtOH + Et₂NH (70:20:10:3)

S2: C₆H₁₂ + Et₂NH (97:3)

S3: C₆H₅CH₃ + Et₂NH (95:5)

S4: C₆H₁₂ + Et₂NH (95:5)

S5: C₆H₅CH₃ + Et₂NH (9:1)

4.1.7 Pomocné materiály a roztoky

- křemelina Celite C 535 John's Manville (Sigma-Aldrich, CZ)
- kyselina sírová 2% (w/w)
- silikagel sušící perly (Penta a.s., ing. Švec, CZ)
- síran sodný bezvodý č.
- uhličitan sodný 10% roztok (w/w)

4.1.8 Přístroje

- HPLC systém: pumpa Jasco PU-1580 spojená s autosamplrem Jasco AS-2055 a detektorem Jasco FP-2020 (Jasco, Cremella, Italy)
- mikrovýhřevný stolek BOETIUS (Miw Wägetechnik Rapido, Dresden, Germany)
- odstředivka Avanti J-30I s rotorem JA-30.50 (Beckman Coulter, Brea, California, USA)
- odstředivka Boeco U-32R (Boeco, Hamburg, Germany) s rotorem Hettich 1611 (Hettich, Tuttlingen, Germany)
- pH metr PHM 220 (Radiometer, Copenhagen, Denmark)
- PC řízený analyzátor FIALab 3000 (FIALab Instruments Inc., WA, USA) vybavený 2,5 ml pístovou pumpou, 6cestným selekčním ventilem, spektrofotometrem USB2000-UV/VIS se světelným zdrojem (Ocean Optics, USA) a průtokovou celou SMA-Z (délka 1cm); objem misíci cívky byl 0,6 ml a spojené PTFE hadičkami s vnitřím průměrem 0,72 mm (Watrex, Prague, CZ)
- polarimetr ADP 220 BS polarimeter (Bellingham + Stanley Ltd., Kent, UK)
- spektrofluorometr Jasco FP-6200 (Jasco, Cremella, Italy)
- spektrofluorometr Fluoroskan Ascent (FL, LabSystems, Finland)
- spektrofotometr Shimadzu UV-1601 (Shimadzu, Columbia, Maryland, USA)
- spektrofotometr Perkin Elmer UV/VIS Lambda Bio 20 (Perkin Elmer, Massachusetts, USA)

- spektrometr ESI-MS Thermo Finnigan LCQDuo (GenTech Scientific, Inc., New York, USA)
- spektrometry Varian VNMR500 a Varian VNMR500 (Varian, Palo Alto, California, USA)
- ultrazvuková lázeň Sonorex Super 10P (Bandelin, Berlin, Germany)
- vakuová odparka Büchi Rotavapor R-114 (Büchi, Flawil, Switzerland)
- vakuová odparka pro poloprovozní použití Laborota 20 Heidolph (Heidolph, Germany)
- statistický program GraphPad Prism 5.0 2006 (Graph PaD Software, San Diego, CA, USA)

4.1.9 Rostlinný materiál

Sušené hlízy *Corydalis cava* (Fumariaceae) byly dodány firmou Megafyt s. r. o., (Vrané nad Vltavou, 04/2006). Droga pochází ze sběru firmy Jugodrvo (Chorvatsko), verifikace doc. RNDr. Lubomír Opletal, CSc.

4.2 Metody

4.2.1 Obecné postupy

4.2.1.1 Příprava a čištění rozpouštědel

Všechna komerčně používaná rozpouštědla byla před použitím čištěna destilací. Destilace probíhala podle standardních postupů⁴⁶⁷ a hlavní frakce byly jímány podle tabulárních hodnot teploty varu⁴⁶⁸.

4.2.1.2 Odpařování extraktů a frakcí

Sumární ethanolvý extrakt z hlíz dymnivky odpařen na poloprovodní vakuové Laborota 20 Heidolph na vodní lázni při 50 °C a tlaku ca 1,33 kPa, frakce získané z chromatografických sloupců a preparativní TLC byly odpařeny na vakuové odparce Büchi Rotavapor R-114 na vodní lázni do 40 °C.

4.2.1.3 Sušení extraktů, frakcí, izolovaných čistých látek a jejich skladování

Alkaloidní extrakty, jednotlivé frakce získané z chromatografických sloupců a chemicky čisté izolované látky byly vysoušeny v exikátoru (vakuum ca 1,33 kPa) nad silikagelem po dobu minimálně 24 hodin: alkaloidní extrakty a čisté chemická individua byly následně uskladněny v chladničce při 2–8 °C.

4.2.1.4 Detekce alkaloidů

4.2.1.4.1 TLC detekce

Pro zjištění přítomnosti alkaloidů ve frakcích získaných sloupcovou chromatografií, nebo čistoty izolovaných alkaloidů se používala detekce v oblasti UV světla (chromatogram byl pozorován pod UV lampou při vlnové délce $\lambda = 254$ a 366 nm), následovaná postříkem detekčním činidlem (Dragendorffovo činidlo dle Muniera).

Dragendorffovo činidlo: nejprve byl připraven zásobní roztok, který vznikl smísením roztoků A (1,7 g bazického dusičnanu vizmutitého a 20 g kyseliny vinné se rozpustí v 80 ml vody) a B (16 g jodidu draselného se rozpustí ve 40 ml vody); oba roztoky byly smíchány v poměru 1:1 (v/v). Postřík pro detekci byl připraven smísením 5 ml zásobního

roztoku s 50 ml vody obsahující 10 g kyseliny vinné. Pozitivní reakce na alkaloidy se projeví oranžovým zabarvením⁴⁶⁹.

4.2.1.4.2 Detekce alkaloidů v roztoku

Pro přípravu alkaloidních koncentrátů získaných vytřepáváním z vodné fáze o určitém pH do organického rozpouštědla bylo použito pro monitorování přítomnosti alkaloidů ve vodné fázi Mayerovo činidlo.

Mayerovo činidlo: bylo připraveno rozpuštěním 1,36 g chloridu rtuťnatého a 5 g jodidu draselného ve 100 ml vody za vzniku tetrajodortuťnatanu draselného, který v neutrálním nebo slabě kyselém prostředí reaguje s alkaloidy za tvorby nažloutlé sraženiny (ČsL 4).

4.2.1.5 **Příprava sloupcové chromatografie se silikagelem**

Chromatografický sloupec byl připraven postupným naléváním suspenze silikagelu v mobilní fázi při částečně otevřeném kohoutu. Chromatografovaná směs látek byla nanesena na kolonu na sedimentovaný adsorbent ve formě roztěru, který byl připraven rozpuštěním extraktu v chloroformu a přidáním malého množství adsorbentu (poměr směs: adsorbent 1:3). Ze vzniklé suspenze bylo rozpouštědlo odpařeno na vodní lázni a roztěr byl následně dosušen v exikátoru za sníženého tlaku po dobu 24 hodin před aplikací na kolonu.

4.2.1.6 **Příprava litých vrstev pro preparativní TLC**

Preparativní TLC lité vrstvy se připravily nalitím suspenze, obsahující komerční silikagel (6,5 g) Kieselgel 60 GF₂₅₄ (Merck, CZ) a destilovanou vodu (~ 20 ml), na skleněné desky (15x15 cm) se zdrsňeným povrchem, které se nechaly schnout 24 hodin před použitím.

4.2.1.7 **Příprava alkaloidních koncentrátů**

Alkaloidní koncentráty byly připraveny z rostlinného materiálu vytřepáváním alkaloidů organickými rozpouštědly z vodných roztoků o rozdílném pH (nebazické alkaloidy; terciární baze střední bazicity (pH ~ 9); silně bazické alkaloidy (pH > 12) vytřepatelné diethyletherem a chloroformem; jodidy kvartérních bazí ze slabě kyselého prostředí, jodidy kvartérních bazí ze slabě alkalického prostředí) podle Slavíka¹⁴.

4.3 Izolace alkaloidů

4.3.1 Screening cholinesterasové inhibiční aktivity alkaloidů dymnivky duté: bio-guided assay využívající Ellmanovu metodu

Obsahové látky dymnivky duté byly vybrány pro bližší studium cholinesterasové inhibiční aktivity na základě rešerše a výsledků diplomové práce Lucie Řepové²², která pro screening taxonů obsahující potenciální inhibitory používala bioautografickou metodu na TLC dle Hostettmanna⁴⁴. Podle dosažených výsledků této kvalifikační práce alkaloidní výtřepky z hlíz dymnivky duté vykazovaly signifikantní cholinesterasovou inhibiční aktivitu. Je známo, že TLC metody pro screening cholinesterasové inhibiční aktivity vykazují falešně pozitivní reakce⁴³, a proto byla pro verifikaci cholinesterasové inhibiční aktivity obsahových látek z hlíz dymnivky duté použita bioguided assay využívající modifikovanou spektrofotometrickou Ellmanovou metodu, která eliminuje tvorbu falešně pozitivních reakcí.

4.3.1.1 Příprava sumárního alkaloidního extraktu pro screening

Sumární alkaloidní extrakt ze sušených hlíz dymnivky duté byl připraven podle následujícího postupu: suché, rozdrobněné hlízy (velikost částic 1–2 mm o celkové hmotnosti 4,30 g) byly vsypány do Erlemayerovy baňky a přelity 95% EtOH v poměru 1:7 (m/v) a droga byla extrahována 3x varem pod zpětným chladičem po dobu 15 min. Jednotlivé ethanolové podíly byly po zchladnutí zfiltrvány přes vliselin, matolina v baňce překryta vrstvou ethanolu a sonikována 10 minut při stupni 10 na ultrazvukové lázni. Směs byla opět zfiltrována přes vliselin, spojené ethanolové filtráty znovu zfiltrvány přes vrstvu křemeliny ve filtračním tubusu. Filtrát byl zahuštěn do řídkého extraktu, přidáno 10 ml vody a na vakuové odparce byl odpařen zbytek ethanolu. Odparek extraktu byl zředěn s 10 ml 2% H₂SO₄ a baňka s touto suspenzí sonikována na ultrazvukové lázni po dobu 5 minut při stupni sonikace 10. Kalná tekutina byla následně zfiltrována přes vrstvu křemeliny, která byla následně promyta 10 ml vody. Čiré kyselé filtráty byly spojeny, objem doplněn vodou a vytřepán 2×Et₂O. Diethyletherová vrstva byla odložena, vodná fáze byla zalkalizována 10% Na₂CO₃ na pH ~9–10 a vytřepána 3×EtOAc. K spojenému ethylacetátovému výtřepku bylo přidáno ~ 5 g Na₂SO₄, po vyčeření (30 minutách) byla tato organická fáze zfiltrována přes vatou a odpařena dosucha na vakuové odparce při 40 °C a odparek byl dosušen v exikátoru po dobu 24 hodin. Celkové množství alkaloidního ex-

traktu bylo 180,3 mg, což může teoreticky představovat ~ 4,19 % obsahu alkaloidů v sušině.

4.3.1.2 *Cholinesterasová aktivita sumárního alkaloidního extraktu*

Ze sumárního alkaloidního extraktu bylo odebráno potřebné množství extraktu, které bylo naředěno DMSO na roztoky o požadované koncentraci (20,0; 10,0; 2,0; 1,0; 0,2 mg/ml) pro zjištění hodnoty IC_{50} sumárního alkaloidního extraktu modifikovanou Ellmanovou metodou. Hodnoty IC_{50} byly vypočítány z naměřených hodnot poklesu aktivity AChE a BuChE nelineární regresí v programu GraphPaD Prism. Výsledné hodnoty IC_{50} byly porovnány s hodnotami známých inhibitorů cholinesteras galanthaminem, huperzinem A a fysostigminem.

Tab. 18 Cholinesterasová inhibiční aktivita alkaloidního extraktu dymnivky duté

Testovaný vzorek	IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	
	AChE	BuChE
alkaloidní extrakt	$91,47 \pm 4,57$	$26,50 \pm 1,35$
galanthamin	$1,98 \pm 0,10$	$44,83 \pm 2,24$
huperzin A	$0,06 \pm 0,003$	$> 242,32$
fysostigmin	$0,60 \pm 0,03$	$0,45 \pm 0,02$

Sumární alkaloidní extrakt z hlíz dymnivky duté potvrdil při použití spektrofotometrické Ellmanovy metody signifikantní cholinesterasovou inhibiční aktivitu vůči lidským cholinesterasám. Alkaloidní extrakt vykazoval výraznější inhibici BuChE než AChE.

4.3.2 Izolace isochinolých alkaloidů pro biologické testy

4.3.2.1 *Příprava alkaloidních koncentrátů*

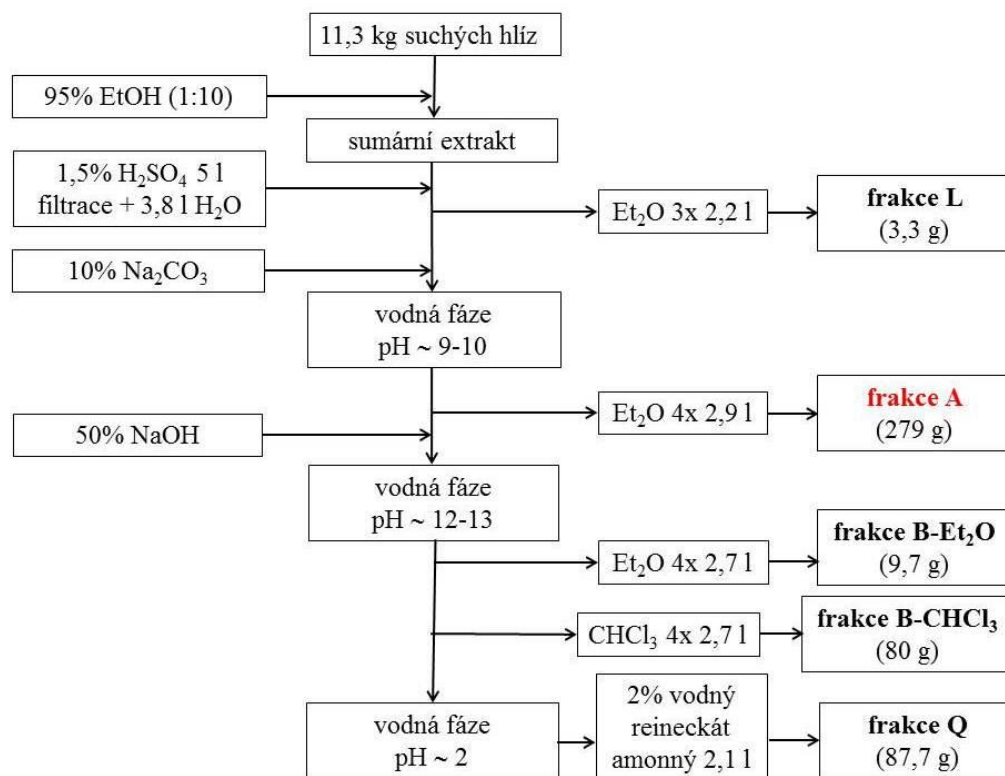
Alkaloidy z hlíz dymnivky duté byly rozděleny na alkaloidní koncentráty obsahující alkaloidy o rozdílné bazicitě, které byly získané vytřepáváním alkaloidů organickými rozpouštědly z vodných roztoků o rozdílném pH dle Slavíka¹⁴ podle následujícího postupu (obr. 8):

11,3 kg suchých hlíz dymnivky duté bylo perkolováno 95% ethanolem (1:10), extrakt byl zahuštěn do řídkého sirupu, bylo přidáno 5 litrů 1,5% H_2SO_4 , suspenze byla promíchána a zfiltrována přes křemelinu (Celite 535) a po promytí vodou byl roztok doplněn na 8,8 litru (pH ~ 1,5). Roztok byl po částech vytřepán 3×2,2 litry Et_2O (**výtřeppek L**, 3,3 g černý, velmi viskózní, nealkaloidní), následně byl zalkalizován 10% Na_2CO_3 na pH ~9-10 a vytřepán 4×2,9 litry Et_2O (**alkaloidní výtřeppek A**, 279 g, hrubě krystalický hnědo-

zelený). Vodná fáze byla dekantována od nerozpustného pryskyřičného podílu, zalkalizována 50% NaOH na pH ~ 12 a roztok a vytřepán 4×2,7 litry Et₂O (**alkaloidní výtřeppek B-Et₂O**, 9,7 g, žlutohnědý) a následně 4×2,7 litry CHCl₃ (**alkaloidní výtřeppek B-CHCl₃**, 80 g, hnědý, velmi viskózní). Louhový zbytek byl zneutralizován HCl na pH ~ 2, zfiltrován (14 litrů) a bylo přidáno 2,1 litru 2% vodného roztoku reineckátu amonného. Po 15 hodinách stání byla provedena dekantace, okrová sraženina oddělena na papírovém filtru, promyta vodou a vysušena (**alkaloidní koncentrát Q**, 87,7 g, okrový prášek).

Pro bližší studium vybraných biologických aktivit byl vybrán pro izolaci alkaloidů výtřeppek s obsahem terciárních bazí získaných při pH ~ 9–10 (**alkaloidní výtřeppek A**), jenž vykazoval v předpokuse signifikantní inhibiční cholinesterasovou aktivitu.

Před separací terciárních alkaloidů na chromatografickém sloupci byl alkaloidní výtřeppek A přečištěn. Odparek byl rozpuštěn při ~ 40 °C ve 2,5 litrech 1,5% H₂SO₄, zfiltrován přes Celite 535 a doplněn vodou na 3 litry, zalkalizován 10% Na₂CO₃ na pH ~9–10 a následně byl vytřepán 7×900 ml Et₂O a organická fáze byla zahuštěna na ~1 litr. Po zchladnutí byly odfiltrovány šedavé pískovité krystaly, byly promyty Et₂O a vysušeny v exikátoru (sloučenina **JC-1**, 46,5 g), matečný louh byl odpařen dosucha, celkově bylo získáno 200 g přečištěného, velmi viskózního, tmavého odparku alkaloidního výtřepku A.



Obr. 8 Schéma přípravy alkaloidních koncentrátů

4.3.2.2 *Separace alkaloidního výtřepku A na chromatografickém sloupci*

Přečištěný diethyletherový výtřepak A (200 g) byl separován preparativní sloupcovou chromatografií obvyklým způsobem, jako stacionární fáze byl použit silikagel (silikagel Fluka, zrnitost 0,063–0,20 mm, 4,5 kg adsorbentu desaktivovaného 10 % vody, dělicí vrstva sloupce: $\varnothing \times$ výška = 10×115 cm), se stupňovitým způsobem eluce. Eluce byla provedena v následující řadě směsí rozpouštědel: C₆H₁₄+CHCl₃ (90:10, 40:60, 50:50) a pokračovala směsí CHCl₃+EtOH (99:1, 97:3, 95:5, 90:10, 85:15, 75:25, 70:30, 65:35, 60:40, 50:50). Každá frakce (po počátečním odstranění rozpouštědla z mrtvého objemu sloupce) měla objem 500 ml; celkem bylo získáno 142 frakcí, které byly kontrolní TLC (vyvíjecí soustava S1) spojeny do 7 souhrnných frakcí (A-G).

Z **frakce A** (150 mg) byly vyizolovány preparativní TLC na 15 analytických deskách o rozměrech 20×10 cm (vyvíjecí dráha 8,5 cm, vyvíjecí soustava S2, počet vyvíjení 3×) ze zóny 1 (Rf 0,65) sloučenina **JC-2** (10 mg) a ze zóny 2 (Rf 0,55) sloučenina **JC-3** (30 mg).

Frakce B (65 g) byla dále chromatografována na sloupci se silikagelem (adsorbent 1,95 kg, dělicí vrstva sloupce: $\varnothing \times$ výška = 8×78 cm) postupnou stupňovitou elucí směsí C₆H₁₂ + CHCl₃ (1:1, 2:3, 1:4, 1:9). Každá frakce měla objem 250 ml; celkem bylo získáno 94 frakcí, které byly kontrolní TLC (vyvíjecí soustava S3) spojeny na 3 podfrakce (B/1-B/3). Sloučenina **JC-4** (2,55 g) byla izolována z podfrakce B/1 (4,3 g) sloupcovou chromatografií na silikagelu (adsorbent 130 g, dělicí vrstva sloupce: $\varnothing \times$ výška = 3×37 cm) za použití eluční směsi C₆H₁₄-CHCl₃ (3:2) a přečištěna krystalizací ze směsi CHCl₃-EtOH. Podfrakce B/2 (38 g) poskytla opakovanou krystalizací ze směsi CHCl₃-EtOH sloučeninu **JC-5** (29,3 g). Podfrakce B/3 (1,5 g) byla podrobena opakované preparativní TLC na litých vrstvách 15×15 cm (adsorbent Kieselgel 60 GF₂₅₄), vyvíjecí soustava S4, počet vyvíjení 3×, dráha 12 cm, 2 hlavní zóny (Rf 0,55 a 0,30). Opakovaná preparativní TLC vedla k izolaci sloučenin **JC-6** (136 mg, zóna 1) a **JC-7** (55 mg, zóna 2).

Z **frakcí C** (250 mg) a **D** (480 mg) byly opakovanými krystalizacemi ze směsi CHCl₃-EtOH získány sloučeniny **JC-8** (115 mg) a **JC-9** (179 mg).

Frakce E (5,5 g) byla separována na chromatografickém sloupci se silikagelem (adsorbent 330 g, dělicí vrstva sloupce: $\varnothing \times$ výška = 4×52 cm) za použití mobilní fáze C₆H₁₄+CHCl₃ (1:4). Každá frakce měla objem 100 ml; celkem bylo získáno 42 frakcí, které byly kontrolní TLC (vyvíjecí soustava S5) spojeny do 2 souhrnných frakcí E/1 (2,5

g) a E/2 (2,2 g). Obě podfrakce byly dále podrobeny preparativní TLC na litých vrstvách 15×15 cm (Kieselgel 60 GF₂₅₄), vyvíjecí soustava S3 (počet vyvíjení 3×), které vedly k izolaci sloučeniny **JC-10** ze zóny 1 (Rf 0,67; 1,4 g, krystaliace z EtOH) a sloučeniny **JC-1** ze zóny 2 (Rf 0,43; 1,06 g, krystalizace EtOH).

Frakce F (3,2 g) byla dále chromatografována na silikagelovém sloupci (200 g adsorbentu, dělicí vrstva sloupce: Ø×výška = 2×32 cm) za použití stupňovité eluce směsí CHCl₃ + EtOH (9:1, 4:1 a 3:2), každá frakce měla objem 100 ml, celkový počet frakcí 25, které byly monitorovány kontrolní TLC (vyvíjecí soustava S5). Z frakce č. 13 (1,5 g) byly preparativní TLC na litých deskách 15×15 cm (vyvíjecí soustava S5, dráha 12 cm, počet vyvíjení 3×) a následnou krystalizací získány ze zóny 1 (Rf 0,73) sloučenina **JC-11** (85 mg) a ze zóny 2 (Rf 0,45) sloučenina **JC-12** (451 mg).

Frakce G (4,2 g) byla separována na silikagelovém chromatografickém sloupci (250 g adsorbentu, dělicí vrstva sloupce: Ø×výška = 2×40 cm) stupňovitou elucí směsí CHCl₃ + EtOH (4:1, 3:2, 1:1 a 1:4). Každá frakce měla objem 100 ml, celkový počet frakcí 33, která byly kontrolní TLC (vyvíjecí soustava S1) spojeny do 3 podfrakcí G/1 (2,6 g), G/2 (0,83 g) a G/3 (0,57 g). Každá z nich byla podrobena preparativní TLC na litých deskách na silikagelu. Vyvíjecí soustava byla použita S1, počet vyvíjení 2×), která vedla po následných krystalizacích z EtOH k získání sloučenin **JC-13** (1,63 g), **JC-14** (476 mg) a **JC-15** (265 mg).

4.3.3 Strukturní analýza

4.3.3.1 *MS analýza*

ESI-MS spektra byla měřena na spektrometru LC/MS Thermo Finnigan LCQDuo s inotovou pastí, elektrosprejovou ionizací v kladném módu (ESI+). LC/MS spektra byla prováděna při kolizní energii 40 eV. Alkaloidy byly rozpuštěny v MeOH.

4.3.3.2 *NMR analýza*

NMR spektra byla měřena na spektrometrech Varian Inova 500 a Varian VNMRS500 s pracovní frekvencí 500 MHz pro ^1H a 125 MHz pro ^{13}C jádra. ^{13}C NMR spektra byla měřena v 5 mm SW širokopásmové sondě, ^1H v inverzní 5 mm ID PFG sondě s využitím standardních pulsních sekvencí. Experimenty byly měřeny v CDCl_3 při 25°C. Hodnoty chemických posunů jsou v ppm a jsou vztaženy k internímu standardu (hexamethyldisilan nebo TMS, 0,04 ppm, v ^1H spektrech) nebo signálu solventu (76.99 ppm, v ^{13}C spektrech).

4.3.3.3 *Optická otáčivost*

Optická otáčivost byla měřena na polarimetru ADP 220 BS a látky byly rozpuštěny v příslušném rozpouštědle (CHCl_3 , MeOH a EtOH).

4.3.3.4 *Teplota tání*

Teploty tání byly stanoveny na mikrovýhřevném stolku BOETIUS. Výhřevnost byla nastavena tak, aby teplota do 100 °C stoupala rychle a potom pomalu.

4.4 Testování biologických aktivit izolovaných látek

4.4.1 Stanovení antiradikálové aktivity DPPH testem

Antiradikálová aktivita izolovaných látek byla měřena stabilním DPPH radikálem (2,2'-difenyl-1-pikrylhydrazyl) SIA metodou⁴⁷⁰. Za normálních okolností fialový DPPH radikál reaguje s látkami fungujícími jako donor vodíku⁴⁷¹; dochází k redukci DPPH radikálu (redukováná forma má žlutou barvu) spojené s odpovídajícím odbarvením fialového roztoku. Kvantitativní míra poklesu absorbance se zjišťuje při $\lambda = 525$ nm a souvisí s koncentrací antioxidantu v testovaném roztoku.

Zásobní roztok testované látky (10 mM) byl připraven rozpuštěním v 50% (v/v) ethanolu během 10 minutové ultrazvukové sonikace (Sonorex SP, stupeň sonikace 10). Ze zásobního roztoku byly následným ředěním připraveny roztoky o sestupné koncentraci (5, 1, 0,5 a 0,1 mM). Roztok DPPH radikálu (0,1 mM) byl připraven rozpuštěním 3,9 mg DPPH radikálu ve 100 ml 50% (v/v) ethanolu rovněž za použití sonikace. Všechna používaná rozpouštědla pro testované látky, DPPH radikál a mobilní fázi SIA metody byla před použitím degasována 10 minutovou sonikací.

DPPH antiradikálová aktivita byla měřena na PC řízeném analyzáru FIALab 3000 vybavený 2,5 ml píšťovou pumpou, 6cestným selekčním ventilem, spektrofotometrem USB2000-UV/VIS se světelným zdrojem a průtokovou celou SMA-Z (délka 1cm); objem misíci cívky byl 0,6 ml a spojené PTFE hadičkami s vnitřím průměrem 0,72 mm.

Antiradikálová zhášecí aktivita jednotlivých měřených látek byla vyjádřena jako zhášecí index % Q_{DPPH} , který vyjadřuje procentuální pokles absorbance DPPH radikálu po přidání vzorku obsahující antioxidantně působící látku. Zhášecí index % Q_{DPPH} byl vypočítán podle vzorce:

$$\% Q_{DPPH} = (1 - A_x/A_0) \times 100$$

kde A_0 je průměrná absorbance, naměřená u slepého vzorku (EtOH místo roztoku antioxidantu) a A_x je absorbance, naměřená po přidání roztoku antioxidantu od které je odečtena absorbance samotného roztoku vzorku. Všechna měření byla prováděna 3×. Pomocí programu GraphPad Prism byla vypočtena hodnota EC_{50} – 50% účinná koncentrace antioxidantní aktivity a získané hodnoty EC_{50} testovaných látek byly porovnávány s hodnotami EC_{50} standardů (kvercetinem, troloxem a kyselinou askorbovou).

4.4.2 Stanovení cholinesterasové aktivity Ellmanovou metodou

4.4.2.1 Příprava erythrocytárních pouzder

Jako zdroj AChE byla použita pouzdra lidských erythrocytů, zdrojem BuChE byla lidská plazma. Erythrocytární pouzdra byla připravena z čerstvě odebrané krve zdravých dobrovolníků, ke které byl přidán 1 ml citrátu sodného na 10 ml krve podle metody Stecka a Kanta⁴⁷². Plazma byla odstraněna z plné krve centrifugací při rychlosti 4000 ot.min⁻¹ na centrifuze Boeco U-32R s rotorem Hettich 1611. Erythrocyty byly přemístěny do 50 ml zkumavek a třikrát promyty 5mM fosfátovým pufrem (pH 7,4) obsahujícím 150 mM chloridu sodného (12 000 ot.min⁻¹, centrifuga Avanti J-301, rotor JA-30.50). Promyté erythrocyty byly míchány s 30násobkem 5mM fosfátového pufru (pH 7,4) po dobu 10 minut, čímž došlo k jejich lýze. Následně byly centrifugovány rychlostí 20 000 ot.min⁻¹ a vzniklá pouzdra byla třikrát promyta fosfátovým pufrem.

4.4.2.2 Inhibice acetylcholinesterasy a butyrylcholinesterasy

Pro stanovení cholinesterasové inhibiční aktivity látek byla použita upravená Ellmanova spektrofotometrická metoda s použitím 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoové kyseliny (DTNB) a substrátů acetylthiocholinjodidu (ATChI) a butyrylthiocholinjodidu (BuTChI)³⁴.

Do kyvety bylo přidáno 25-50 μ l erythrocytárních pouzder (AChE) nebo plazmy (BuChE), 200 μ l DTNB, 650 μ l 100mM fosfátového pufru a 25 μ l vzorku nebo příslušného rozpuštědla (DMSO) jako slepého vzorku. Reakce byla iniciována přidáním substrátu (ATChI nebo BuTChI). Konečný poměr DTNB a substrátu byl 1:1. Nárůst absorbance byl měřen při $\lambda = 436$ nm po dobu 1 minuty při normální teplotě (25 °C) na spektrofotometru Shimadzu UV-1611. Každé měření bylo opakováno 3 \times t. Hodnoty IC₅₀ byly vypočítány z naměřených hodnot poklesu aktivity AChE nebo BuChE nelineární regresí v programu GraphPad Prism 5.02. Výsledné hodnoty IC₅₀ byly porovnány s hodnotami známých inhibitorů cholinesteras galanthaminem, huperzinem A a fysostigminem. Procenta inhibice (% I) byla vypočtena podle vzorce:

$$\% I = 100 - (\Delta A_{BL} / \Delta A_{SA}) \times 100$$

kde ΔA_{BL} je nárůst absorbance slepého vzorku za 1 minutu a ΔA_{SA} je nárůst absorbance měřeného vzorku.

4.4.3 Stanovení inhibice hrBACE1

4.4.3.1 Stanovení potenciální interference alkaloidů se substrátem M-2420

Před vlastním testováním látek na inhibici BACE1 byly izolované alkaloidy studovány na potenciální interferenci se substrátem M-2420. Pro zjištění interference byly u sloučenin proměřeny fluorescenční a UV spektra. Získané spektra byly porovnávány se spektry enzymové aktivity a substrátu. Fluorescenční spektra byla měřena na spektrofluorometru Jasco FP-6200. Vlnová délka pro excitaci byla nastavena na 320 nm a emisní spektra byla zaznamenávána v rozmezí vlnových délek 330-550 nm. UV spektra byla zaznamenávána spektrofotometrem UV/VIS Lambda Bio 20 v rozmezí 200-550 nm. Složení vzorků v kyvetách odpovídalo koncentracím jednotlivých složek v mikrotitračních jamkách u FRET metody (tab. 19).

Tab. 19 Složení testovaných vzorků v kyvetě při měření fluorescenčních a UV spekter

Testované vzorky	Složení testovaných roztoků v kyvetě
Testované sloučeniny	875 μ l pufru CHAPS + 25 μ l testované látky + 100 μ l pufru HEPES
Enzymová aktivita	875 μ l pufru CHAPS s BACE1 + 100 μ l pufru M-2420 + 25 μ l DMSO (15 minut inkubační doba)
Substrát M-2420	875 μ l pufru CHAPS bez enzymu + 100 μ l pufru M-2420 + 25 μ l DMSO

4.4.3.2 Testování inhibice hrBACE1

Vlastní inhibice hrBACE1 byla měřena 2 rozdílnými metodami:

- 1) na mikrotitračních destičkách (FRET assay)
- 2) pomocí imobilizovaného enzymového reaktoru (IMER) zapojeného do HPLC systému.

4.4.3.2.1 FRET assay

Inhibiční studie využívající černé mikrotitrační destičky Corning (96 jamkové, Sigma-Aldrich, Italy) byly měřeny s dvěma peptidickými FRET substráty M-2420 (Bachem, Germany) a Panvera substrátem (Invitrogen, Milan, Italy). Panvera substrát byl používán u látek fluorescenčně interferujícími s M-2420.

Testování inhibice BACE1 se substrátem M-2420 bylo prováděno podle následujícího postupu: 5 μ l roztoku testované látky o požadované koncentraci nebo slepého vzorku (DMSO) bylo preinkubováno 1 hodinu při 25 °C se 175 μ l BACE (20,7 nM, finální koncentrace enzymu) ve 20 mM octanu sodném (pH 4,5) obsahujícím detergent CHAPS

(0,1% m/v). Následně bylo přidáno 20 μ l substrátu M-2420 (3 μ M, finální koncentrace), který byl 15 minut inkubován se směsí. Fluorescenční emise byla detegována na spektrofluorometru při $\lambda = 405$ nm (excitace $\lambda = 320$ nm).

Testování inhibice BACE1 s Panvera substrátem bylo prováděno podle následujícího postupu: 20 μ l roztoku testované látky o požadované koncentraci nebo 20 mM octanu sodného (pH 4,5) bylo preinkubováno 60 minut s 20 μ l enzymu (20,7 nM, finální koncentrace). K nastarování reakce bylo přidáno 20 μ l Panvera substrátu (0,25 μ M, finální koncentrace) do každé jamky. Směs byla inkubována 60 minut při 37 °C a poté reakce byla zastavena přidáním 20 μ l BACE1 stop roztoku (octan sodný 2,5 M) do každé jamky. Následně byl měřen fluorescenční signál při $\lambda = 590$ nm (excitace $\lambda = 544$).

Procentuální inhibice testovaných látek byla vypočtena z naměřených fluorescenčních intenzit podle následujícího vzorce:

$$100 - (IF_i/IF_0) \times 100$$

kde IF_i a IF_0 jsou fluorescenční intenzity získané pro BACE1 v přítomnosti a nepřítomnosti inhibitoru. Rušící signál pozadí byl měřen v kontrolních jamkách obsahující všechny reagentie kromě hrBACE1 a byl odečten od hodnot měřených látek.

4.4.3.2.2 hrBACE1-IMER assay

Stanovení inhibice hrBACE1 metodou IMER (hrBACE1-IMER), který byl vložen do HPLC systému skládající se z pumpy Jasco PU-1580, autosampleru Jasco AS-2055 a fluorescenčního detektoru Jasco FP-2020, byla měřena se substrátem M-2420, fluorescenční detektor byl nastaven na $\lambda = 320$ nm (excitace) a 450 nm (emise). Imobilizovaný reaktor s navázanou BACE1 byl připraven metodou *in situ* kovalentním navázáním BACE1 na CIM-EDA disk⁴⁷³. Mobilní fáze (pH = 4,5) obsahovala 50 mM chloridu amoného, 25 mM triethanolaminu, CHAPS (0,1 % m/v)+DMSO v poměru 95:5 (v/v), průtok mobilní fáze byl nastaven na 1,0 ml/minutu, nástřikový objem 10 μ l. Chromatografická analýza probíhala při normální teplotě (25 °C). Nepoužívaný hrBACE1-IMER byl skladován při 4 °C ve skladovacím pufru (50 mM octan sodný, pH 6,0 obsahující 0,1% azidu sodného jako konzervační přísadu). Finální koncentrace testované látky v koloně (reaktoru) byla u screeningu inhibice BACE1 5 μ M (pro stanovení IC_{50} byly připravené rozdílné finální koncentrace testované sloučeniny podle aktivity) a 0,44 μ M pro substrát M-2420. Enzymová aktivita byla vztažena k ploše pod křivkou (AUC). Pro každou kon-

centraci měřeného vzorku byla vypočtena průměrná AUC ze dvou měření. Procentuální inhibice byla získána dle následujícího vzorce:

$$100 - (AUC_i/AUC_0) \times 100$$

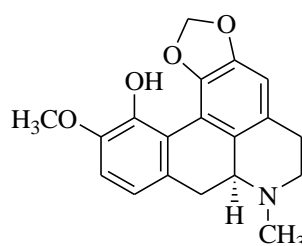
kde AUC_i a AUC_0 jsou fluorescenční intenzity získané pro substrát M-2420 v přítomnosti inhibitoru (AUC_i) a s absencí inhibitoru (AUC_0). Inhibiční křivky pro výše uvedené metody byly získány vnesením do grafů jako procentuální inhibice vůči logaritmu koncentrace inhibitoru v testovaném vzorku a byly extrapolovány hodnoty IC_{50} testovaných látek (GraphPad Prism 5.0 2006 (Graph PaD Software, San Diego, CA, USA). Získané hodnoty IC_{50} byly porovnány s hodnotami IC_{50} inhibitorů BACE1.

5. VÝSLEDKY

5.1 Strukturní analýza izolovaných alkaloidů

Všechny izolované alkaloidy byly již dříve strukturně popsány, a proto byly naměřena spektrální data z NMR a MS analýzy, teploty tání a hodnoty optické otáčivosti porovnány s údaji v databázích SciFinder a Dictionary of Natural Products⁴⁷⁴.

5.1.1 (+)-Bulbokapnin (JC-1)



Obr. 9 (+)-bulbokapnin

Bílá, jemně krystalická látka bez zápachu, t. tání: 200–202 °C.

5.1.1.1 MS analýza

ESI-MS m/z $[M+H]^+$ 370.2 (100). MS/MS m/z 352.1 (100), 339.1 (14), 321.0 (33), 290.2 (20), 188.2 (60).

5.1.1.2 NMR analýza

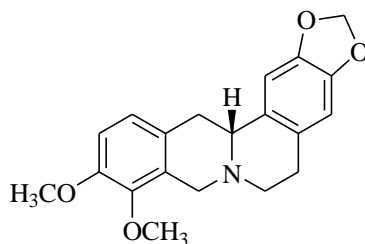
^1H NMR (CDCl_3 , 25°C): δ 7.00 (1H, bs); 6.84 (1H, d); 6.83 (1H, d, $J = 8.1$ Hz); 6.11 (1H, d); 5.95 (1H, d, $J = 1.4$ Hz); 3.15 (1H, bs); 3.08 (1H, dd, $J = 13.5$ Hz, $J = 3.6$ Hz); 3.02 (1H, br); 3.00 (1H, bs); 2.66 (1H, dd, $J = 16.4$ Hz, $J = 3.7$ Hz); 2.55 (3H, s); 2.52 (1H, bs); 2.49 (1H, bs).

^{13}C NMR (CDCl_3 , 25°C): δ 148.5, 146.3, 143.1, 140.8, 129.9, 129.0, 127.5, 119.5, 118.7, 114.5, 111.1, 107.9, 100.5, 63.0, 56.4, 53.2, 44.0, 35.5, 29.4.

5.1.1.3 Optická otáčivost

$[\alpha]^{25} = +306^\circ$ (c 0,252, MeOH).

5.1.2 (+)-Kanadin (JC-2)



Obr. 10 (+)-kanadin

Tmavě žlutá, jemně krystalická látka bez zápachu, t. tání 130–132 °C.

5.1.2.1 MS analýza

ESI-MS m/z $[M+H]^+$ 340.25 (100), 336.32 (4). MS/MS m/z 323.07 (7), 204.15 (4), 176.18 (100), 149.07 (9).

5.1.2.2 NMR analýza

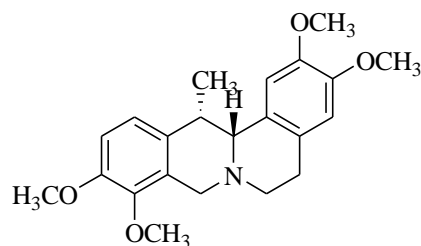
^1H NMR (CDCl_3 , 25°C): δ 6.86 (1H, d, $J = 8.3$ Hz); 6.79 (1H, d, $J = 8.3$ Hz); 6.72 (1H, s); 6.59 (1H, s); 5.91 (2H, s); 4.25 (1H, d, $J = 15.8$ Hz); 3.85 (3H, s); 3.84 (3H, s); 3.56 (2H, d, $J = 14.1$ Hz); 3.10-3.26 (3H, m); 2.80-2.89 (1H, m); 2.61-2.71 (2H, m).

^{13}C NMR (CDCl_3 , 25°C): δ 150.3, 146.2, 146.0, 145.0, 130.5, 128.3, 127.6, 127.5, 123.9, 111.0, 108.4, 105.5, 100.8, 60.2, 59.6, 55.9, 53.8, 51.3, 36.2, 29.4.

5.1.2.3 Optická otáčivost

$[\alpha]^{24} = +241^\circ$ (c 0,0228, CHCl_3).

5.1.3 (+)-Korydalin (JC-3)



Obr. 11 (+)-korydalin

Tmavě žlutá, jemná krystalická látka bez zápachu, t. tání 133–135 °C.

5.1.3.1 MS analýza

ESI-MS m/z $[M+H]^+$ 370.25 (100), 354.2 (3). MS/MS m/z 355.17 (29), 338.23 (12), 322.10 (7), 218.15 (24), 192.18 (100), 179.10 (15), 165.07 (99), 150.10 (20), 136.14 (6).

5.1.3.2 NMR analýza

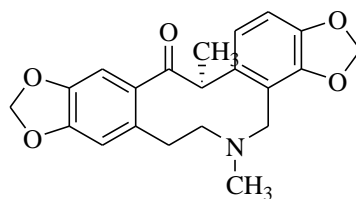
^1H NMR (CDCl_3 , 25°C): δ 6.90 (1H, d, $J = 8.3$ Hz); 6.82 (1H, d, $J = 8.3$ Hz); 6.68 (1H, s); 6.61 (1H, s); 4.16-4.28 (1H, m); 3.87 (6H, s); 3.86 (3H, s); 3.85 (3H, s); 3.67-3.74 (1H, m); 3.48-3.55 (1H, m); 3.05-3.28 (3H, m); 2.57-2.65 (2H, m); 0.96 (3H, bs).

^{13}C NMR (CDCl_3 , 25°C): δ 150.1, 147.7, 147.2, 144.9, 134.9, 128.3, 124.0, 111.2, 111.0, 108.7, 63.0, 60.1, 56.1, 55.9, 55.8, 54.4, 51.4, 38.2, 29.3, 18.3.

5.1.3.3 Optická otáčivost

$[\alpha]^{25} = +121^\circ$ (c 0,066, CHCl_3).

5.1.4 (-)-Korykavamin (JC-4)



Obr. 12 (-)-korykavamin

Bílá, jemně krystalická látka bez zápachu, t. tání 145–147 °C.

5.1.4.1 MS analýza

ESI-MS m/z $[M+H]^+$ 368 (100). MS/MS m/z 350 (50), 337 (57), 319 (65), 309 (40), 297 (9), 289 (94), 267 (15), 261 (16), 249 (8), 237 (9), 220 (12), 188 (39), 177 (12), 161 (42), 149 (100), 135 (9), 119 (11).

5.1.4.2 NMR analýza

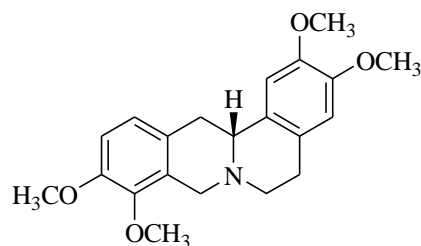
^1H NMR (CDCl_3 , 25°C): δ 6.98 (1H, s); 6.84 (1H, d, $J = 8.1$ Hz); 6.77 (1H, d, $J = 8.1$ Hz); 6.65 (1H, s), 5.97 (1H, d, $J = 1.5$ Hz); 5.94 (1H, d, $J = 1.5$ Hz); 5.93 (2H, s); 4.24 (1H, q, $J = 7.2$ Hz); 3.83 (1H, d, $J = 13.7$ Hz); 3.47 (1H, d, $J = 13.7$ Hz); 3.42 (1H, ddd, $J = 15.2$ Hz, $J = 12.7$ Hz, $J = 2.6$ Hz); 2.88 (1H, ddd, $J = 12.6$ Hz, $J = 3.9$ Hz, $J = 2.6$ Hz); 2.55 (1H, ddd, $J = 15.2$ Hz, $J = 3.9$ Hz, $J = 1.7$ Hz); 2.29 (1H, ddd, $J = 12.6$ Hz, $J = 12.7$ Hz, $J = 1.7$ Hz); 1.81 (3H, s), 1.35 (3H, d, $J = 7.2$ Hz).

^{13}C NMR (CDCl_3 , 25°C): δ 197.4, 148.5, 146.6, 146.5, 146.0, 135.4, 134.2, 132.7, 120.8, 116.8, 111.8, 110.6, 107.1, 101.5, 101.1, 57.7, 49.8, 46.3, 41.2, 33.6, 16.7.

5.1.4.3 Optická otáčivost

$[\alpha]^{25} = -51^\circ$ (c 0,2556, CHCl_3).

5.1.5 (+)-Tetrahydropalmatin (JC-5)



Obr. 13 (+)-tetrahydropalmatin

Nažloutlá, jemně krystalická látka, t. tání 141–143 °C.

5.1.5.1 MS analýza

ESI-MS m/z $[M+H]^+$ 326 (100), 295 (37). MS/MS m/z 295.1 (100), 263.1 (14), 235.1 (5).

5.1.5.2 NMR analýza

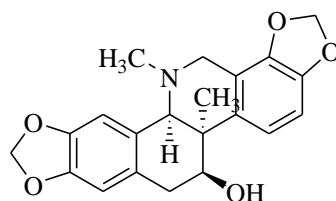
^1H NMR (CDCl_3 , 25°C): δ 6.88 (1H, d, $J = 8.4$ Hz); 6.81 (1H, d, $J = 8.4$ Hz); 6.74 (1H, s); 6.63 (1H, s); 4.26 (1H, d, $J = 15.6$ Hz); 3.89 (3H, s); 3.87 (3H, s); 3.86 (3H, s); 3.85 (3H, s); 3.59 (1H, bs); 3.56 (1H, bs); 3.27 (1H, dd, $J = 15.8$ Hz, $J = 3.6$ Hz); 3.22 (1H, bs); 3.17 (1H, bs); 2.86 (1H, bs); 2.69 (1H, bs); 2.66 (1H, bs).

^{13}C NMR (CDCl_3 , 25°C): δ 150.5, 147.8, 147.7, 145.3, 129.8, 128.8, 127.9, 126.9, 124.1, 111.6, 111.3, 108.8, 60.4, 59.5, 56.3, 56.1, 56.1, 54.2, 51.7, 36.5, 29.2.

5.1.5.3 Optická otáčivost

$[\alpha]^{25} = +264^\circ$ (c 0,212, MeOH).

5.1.6 (+)-Korynolin (JC-6)



Obr. 14 (+)-korynolin

Nažloutlá krystalická látka bez zápachu, t. tání 178–179 °C.

5.1.6.1 MS analýza

ESI-MS m/z $[M+H]^+$ 368.2 (100), 337.2 (13), 319.1 (10). MS/MS m/z 350.1 (12), 337.1 (98), 319.1 (100), 289.2 (42), 177.3 (8).

5.1.6.2 NMR analýza

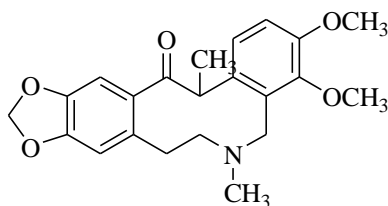
^1H NMR (CDCl_3 , 25°C): δ 7.79 (1H, bs); 6.92 (1H, d, $J = 8.2$ Hz); 6.79 (1H, d, $J = 8.2$ Hz); 6.66 (1H, s); 6.64 (1H, s); 5.97 (2H, dd, $J = 13.2$ Hz, $J = 1.5$ Hz); 5.94 (2H, d, $J = 1.4$ Hz); 4.06 (1H, d, $J = 15.4$ Hz); 3.94-3.97 (1H, d, $J = 15.8$ Hz); 3.32 (1H, s); 3.16 (1H, d, $J = 17.8$ Hz); 3.09 (1H, dd, $J = 17.8$, $J = 4.6$ Hz); 2.23 (3H, s); 1.14 (3H, s).

^{13}C NMR (CDCl_3 , 25°C): δ 147.9, 145.2, 145.0, 142.6, 135.9, 127.8, 125.0, 118.5, 116.6, 112.6, 109.3, 107.6, 101.3, 100.9, 76.0, 69.7, 54.2, 43.1, 40.7, 36.6, 23.3.

5.1.6.3 Optická otáčivost

$[\alpha]^{23} = +97^\circ$ (c 0,0516, CHCl_3).

5.1.7 (±)-Korykavidin (JC-7)



Obr. 15 (±)-korykavidin

Nažloutlá, jemně krystalická látka bez zápachu, t. tání 191–193 °C.

5.1.7.1 MS analýza

ESI-MS m/z $[M+H]^+$ 384.23 (100). MS/MS m/z 384.21 (9), 366.13 (75), 353.13 (27), 335.13 (100), 325.12 (36), 304.20 (82), 283 (6), 205.15 (27), 188.18 (75), 177.11 (74), 149.19 (15).

5.1.7.2 NMR analýza

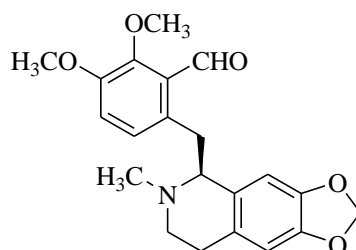
^1H NMR (CDCl_3 , 25°C): δ 7.09 (1H, d, $J = 8.4$ Hz); 7.02 (1H, s); 6.89 (1H, d, $J = 8.4$ Hz); 6.65 (1H, s); 5.95 (2H, dd, $J = 18.1$, $J = 1.3$ Hz); 4.14–4.20 (1H, m); 3.81–3.85 (2H, m); 3.87 (3H, s); 3.80 (3H, s); 3.48 (1H, t, $J = 13.4$ Hz); 2.94 (1H, d, $J = 11.4$ Hz); 2.56 (1H, d, $J = 15.0$ Hz); 2.33 (1H, t, $J = 12.0$ Hz); 1.80 (3H, s); 1.34 (3H, d, $J = 7.2$ Hz).

^{13}C NMR (CDCl_3 , 25°C): δ 195.6, 151.1, 148.2, 147.0, 146.4, 135.0, 132.8, 132.3, 128.2, 123.0, 111.7, 110.7, 110.2, 101.2, 60.8, 57.4, 55.6, 49.1, 45.6, 41.2, 32.9, 16.3.

5.1.7.3 Optická otáčivost

$[\alpha]^{25} = 0$ (c 0,932, CHCl_3).

5.1.8 (+)-Kanadalin (JC-8)



Obr. 16 (+)-kanadalin

Nažloutlá, jemně krystalická látka bez zápachu, t. tání 117–119 °C.

5.1.8.1 MS analýza

ESI-MS m/z $[M+H]^+$ 370 (100), 190 (19). MS/MS m/z 352 (45), 321 (18), 306 (5), 290 (9), 190 (100).

5.1.8.2 NMR analýza

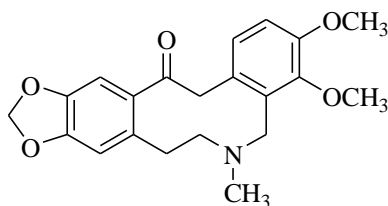
^1H NMR (CDCl_3 , 25°C): δ 10.41 (1H, bs); 6.98 (1H, d, $J = 8.4$ Hz); 6.79 (1H, d, $J = 8.4$ Hz); 6.51 (1H, s); 6.50 (1H, s); 5.86 (2H, d, $J = 7.9$ Hz); 3.93 (3H, s); 3.88 (3H, s); 3.62–3.69 (1H, m); 3.18–3.31 (2H, m); 3.05–3.12 (1H, m); 2.70–2.86 (2H, m); 2.42–2.51 (1H, m); 2.37 (3H, s).

^{13}C NMR (CDCl_3 , 25°C): δ 192.2, 152.7, 151.1, 145.8, 145.4, 133.2, 130.5, 129.1, 127.8, 127.3, 116.5, 108.2, 100.5, 64.1, 62.1, 55.9, 45.9, 42.5, 38.3, 24.8.

5.1.8.3 Optická otáčivost

$[\alpha]^{23} = +23^\circ$ (c 0,0848, CHCl_3).

5.1.9 Allokryptopin (JC-9)



Obr. 17 allokryptopin

Jemně žlutá krystalická látka bez zápachu, t. tání 159–161 °C.

5.1.9.1 MS analýza

ESI-MS m/z $[M+H]^+$ 370.2 (100). MS/MS m/z 352.1 (100), 339.1 (14), 321.0 (33), 290.2 (20), 188.2 (60).

5.1.9.2 NMR analýza

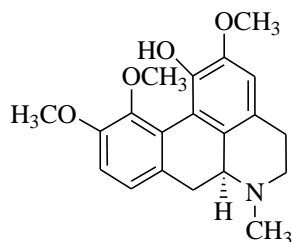
^1H NMR (CDCl_3 , 25°C): δ 6.95 (1H, s); 6.91 (1H, d); 6.80 (1H, d, $J = 8.24$ Hz); 6.63 (1H, s); 5.94 (2H, s); 3.86 (3H, s); 3.78 (3H, s); 3.72 (2H, bs); 2.2–3.5 (3H, m); 1.86 (3H, s).

^{13}C NMR (CDCl_3 , 25°C): δ 193.6, 151.8, 148.3, 147.9, 146.6, 136.3, 133.1, 129.8, 128.8, 128.0, 110.8, 110.7, 109.5, 101.4, 61.0, 57.8, 55.9, 50.4, 46.5, 41.4, 32.6.

5.1.9.3 Optická otáčivost

Neměřena (sloučenina není opticky aktivní – nemá chirální centrum).

5.1.10 (+)-Korydin (JC-10)



Obr. 18 (+)-korydin

Růžová, jehlicovitě krystalická látka bez zápachu, t. tání 147–149 °C.

5.1.10.1 MS analýza

ESI-MS m/z $[M+H]^+$ 342.13 (100), 311.17 (10). MS/MS m/z 325.21 (2), 311.05 (100), 279.06 (2), 237.15 (3).

5.1.10.2 NMR analýza

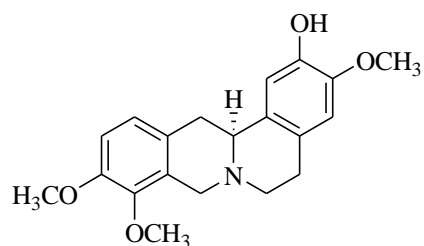
^1H NMR (CDCl_3 , 25°C): δ 8.70 (1H, s); 7.09 (1H, d, $J = 8.1$ Hz); 6.88 (1H, d, $J = 8.1$ Hz); 6.69 (1H, s); 3.91 (3H, s); 3.90 (3H, s); 3.73 (3H, s); 3.17-3.25 (1H, m); 3.00-3.11 (3H, m); 2.70 (1H, d, $J = 16.5$ Hz); 2.59-2.65 (1H, m); 2.58 (3H, s); 2.48 (1H, t, $J = 13.4$ Hz).

^{13}C NMR (CDCl_3 , 25°C): δ 151.9, 149.3, 143.9, 142.5, 130.5, 127.7, 126.4, 124.4, 123.6, 119.3, 111.3, 110.9, 62.7, 62.0, 56.1, 52.7, 43.8, 35.3, 28.8.

5.1.10.3 Optická otáčivost

$[\alpha]^{23} = +203^\circ$ (c 0,9992, CHCl_3).

5.1.11 (-)-Isokorypalmin (JC-11)



Obr. 19 (-)-isokorypalmin

Nažloutlá, jemně krystalická látka bez zápachu, t. tání 241–242 °C.

5.1.11.1 MS analýza

ESI-MS m/z $[M+H]^+$ 342 (100), 178 (15). MS/MS m/z 342 (15), 325 (8), 293 (5), 192 (15), 178 (100), 151 (10).

5.1.11.2 NMR analýza

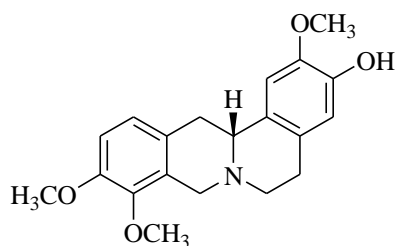
^1H NMR (CDCl_3 , 25°C): δ 6.87 (1H, d, $J = 8.3$ Hz); 6.81 (1H, s); 6.79 (1H, d, $J = 8.3$); 6.59 (1H, s); 5.64 (1H, bs); 4.26 (1H, d, $J = 15.9$ Hz); 3.86 (3H, s); 3.85 (3H, s); 3.84 (3H, s); 3.51-3.65 (2H, m); 3.13-3.32 (3H, m); 2.78-2.91 (1H, m); 2.63-2.76 (2H, m).

^{13}C NMR (CDCl_3 , 25°C): δ 150.3, 145.2, 145.0, 144.0, 130.0, 128.1, 127.6, 125.7, 123.9, 111.3, 111.1, 110.6, 60.2, 59.2, 55.9, 55.8, 53.8, 51.5, 35.9, 28.9.

5.1.11.3 Optická otáčivost

$[\alpha]^{24} = -256^\circ$ (c 0,162, CHCl_3).

5.1.12 (+)-Korypalmin (JC-12)



Obr. 20 (+)-korypalmin

Nažloutlá, jemně krystalická látka bez zápachu, t. tání 234–236 °C.

5.1.12.1 MS analýza

ESI-MS m/z $[M+H]^+$ 342 (100), 178 (11). MS/MS m/z 342 (4), 327 (5), 192 (3), 178 (100), 151 (11).

5.1.12.2 NMR analýza

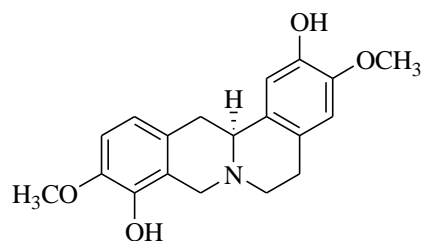
^1H NMR (CDCl_3 , 25°C): δ 6.88 (1H, d, $J = 8.3$ Hz); 6.79 (1H, d, $J = 8.3$ Hz); 6.71 (1H, s); 6.69 (1H, s); 4.26 (1H, d, $J = 15.6$ Hz); 3.90 (3H, s); 3.85 (3H, s); 3.57 (1H, bs); 3.55 (1H, bs); 3.26 (1H, dd, $J = 15.8$ Hz, $J = 3.4$ Hz); 3.20 (1H, bs); 3.12 (1H, bs); 2.86 (1H, bs); 2.68 (1H, bs); 2.65 (1H, bs).

^{13}C NMR (CDCl_3 , 25°C): δ 150.6, 145.4, 145.4, 144.3, 129.9, 128.8, 127.8, 127.7, 124.0, 114.5, 111.3, 108.0, 60.4, 59.6, 56.3, 56.1, 54.2, 51.7, 36.6, 29.0.

5.1.12.3 Optická otáčivost

$[\alpha]^{24} = +266^\circ$ (c 0,216, CHCl_3).

5.1.13 (-)-Skulerin (JC-13)



Obr. 21 (-)-skulerin

Slabě narůžovělá, jemně krystalická látka bez zápachu, t. tání 200–203 °C.

5.1.13.1 MS analýza

ESI-MS m/z $[M+H]^+$ 328.1 (100), 178 (4). MS/MS m/z 328.2 (11), 313.1 (7), 296 (4), 279.1 (8), 178.1 (100), 151.0 (11).

5.1.13.2 NMR analýza

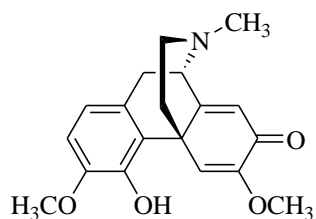
^1H NMR (CDCl_3 , 25°C): δ 2.66 (1H, bs); 2.68 (1H, bs); 2.85 (1H, bs); 3.17 (1H, bs); 3.22 (1H, bs); 3.26 (1H, dd, $J = 16.1$ Hz, $J = 3.9$ Hz); 3.55 (1H, bs); 3.57 (1H, bs); 3.87 (3H, s); 3.88 (3H, s); 4.25 (1H, d, $J = 15.6$ Hz); 5.52 (1H, bs); 5.68 (1H, bs); 6.60 (1H, s); 6.67 (1H, d, $J = 8.3$ Hz); 6.74 (1H, d, $J = 8.3$ Hz); 6.83 (1H, s).

^{13}C NMR (CDCl_3 , 25°C): δ 145.1, 144.0, 143.9, 141.5, 130.3, 127.9, 125.9, 120.8, 119.3, 111.3, 110.6, 109.2, 59.1, 56.1, 55.9, 53.4, 51.5, 36.1, 29.0.

5.1.13.3 Optická otáčivost

$[\alpha]^{25} = -252^\circ$ (c 0,2024, MeOH).

5.1.14 (-)-Sinoakutin (JC-14)



Obr. 22 (-)-sinoakutin

Bílá, jemně krystalická látka bez zápachu, t. tání 196–198 °C.

5.1.14.1 MS analýza

ESI-MS m/z $[M+H]^+$ 328 (100). MS/MS m/z 296 (29), 285 (77), 265 (100), 239 (75), 211 (14), 192 (47).

5.1.14.2 NMR analýza

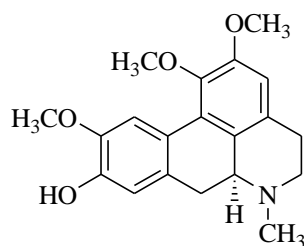
^1H NMR (CDCl_3 , 25°C): δ 7.54 (1H, s); 6.67 (1H, d, $J = 8.4$ Hz), (1H, d, $J = 8.4$ Hz); 6.33 (1H, s); 6.22 (1H, s); 3.89 (3H, s); 3.76 (3H, s); 3.71 (1H, d, $J = 5.7$ Hz); 3.35 (1H, d, $J = 17.6$ Hz); 3.00 (1H, dd, $J = 17.6$ Hz, $J = 5.7$ Hz); 2.63 (1H, dd, $J = 12.8$ Hz, $J = 4.6$ Hz); 2.50 (1H, ddd, $J = 12.8$ Hz, $J = 12.6$ Hz, $J = 2.3$ Hz); 2.46 (3H, s); 2.37 (1H, dd, $J = 12.8$ Hz, $J = 2.3$ Hz); 1.78 (1H, ddd, $J = 12.8$ Hz, $J = 12.6$ Hz, $J = 4.6$ Hz).

^{13}C NMR (CDCl_3 , 25°C): δ 171.5, 151.4, 141.3, 135.6, 133.6, 120.0, 114.2, 112.6, 110.7, 109.2, 99.8, 51.3, 46.6, 45.1, 37.3, 34.9, 33.9, 27.9, 23.0.

5.1.14.3 Optická otáčivost

$[\alpha]^{25} = -172^\circ$ (c 0,1976, CHCl_3).

5.1.15 (+)-*N*-methyllaurotetanin (JC-15)



Obr. 23 (+)-*N*-methyllaurotetanin

Nažloutlá, jemně krystalická látka bez zápachu, t. tání 157–159 °C.

5.1.15.1 MS analýza

ESI-MS m/z $[M+H]^+$ 342 (100), 311 (44), 296 (8), 280 (13). MS/MS m/z 311 (100), 296 (9), 280 (8).

5.1.15.2 NMR analýza

^1H NMR (CDCl_3 , 25°C): δ 8.06 (1H, s); 6.81 (1H, s); 6.58 (1H, s); 3.89 (3H, s); 3.88 (3H, s); 3.65 (3H, s); 3.16 (1H, m); 3.03 (1H, m); 2.99 (1H, s); 2.96 (1H, d, $J = 4.22$ Hz); 2.67 (1H, dd, $J = 16.3$ Hz, $J = 3.4$ Hz); 2.56 d (1H, d, $J = 12.7$ Hz); 2.53 (3H, s); 2.50 (1H, dd, $J = 11.7$ Hz, $J = 3.9$ Hz).

^{13}C NMR (CDCl_3 , 25°C): δ 152.2, 145.5, 145.1, 144.4, 130.4, 129.1, 127.4, 127.3, 124.2, 114.1, 111.4, 110.5, 62.8, 60.4, 56.3, 56.0, 53.5, 44.2, 34.5, 29.4.

5.1.15.3 Optická otáčivost

$[\alpha]^{23} = +311^\circ$ (c 0,0852, CHCl_3).

5.2 Biologické testy izolovaných alkaloidů z hlíz dymnivky duté

5.2.1 Inhibiční aktivita vůči AChE a BuChE

Tab. 20 Hodnoty IC₅₀ (μM) izolovaných alkaloidů vůči AChE a BuChE

Izolované alkaloidy		IC ₅₀ (μM)	
		AChE	BuChE
JC-1	(+)-bulbokapnin	>1000	67,0 ± 2,1
JC-2	(+)-kanadin	12,4 ± 0,9	483 ± 11,5
JC-3	(+)-korydalin	40,5 ± 1,9	>1000
JC-4	(-)-korykavamin	428 ± 8,4	218 ± 5,1
JC-5	(+)-tetrahydropalmin	876 ± 15,3	>1000
JC-6	(+)-korynolin	>1000	>1000
JC-7	(±)-korykavidin	223 ± 7,8	46,2 ± 2,4
JC-8	(+)-kanadalin	20,1 ± 1,1	85,2 ± 2,2
JC-9	allokryptopin	250 ± 2,5	530 ± 28,2
JC-10	(+)-korydin	208 ± 6,8	>1000
JC-11	(-)-isokorypalmin	196 ± 4,2	>1000
JC-12	(+)-korypalmin	321 ± 10,1	>1000
JC-13	(-)-skulerin	245 ± 2,5	903 ± 12,5
JC-14	(-)-sinoakutin	>1000	>1000
JC-15	(+)- <i>N</i> -methyllaurotetanin	898 ± 10,5	>1000
–	fysostigmin ^a	2,17 ± 0,1	1,62 ± 0,06
–	galanthamin ^a	6,9 ± 0,3	156 ± 6,9
–	huperzin A ^a	0,252 ± 0,01	>1000

^a referenční inhibitory cholinesteras

5.2.2 Antiradikálová aktivita

Tab. 21 Hodnoty EC₅₀ (μM) izolovaných alkaloidů

Izolované alkaloidy		EC ₅₀ (μM) DPPH test
JC-1	(+)-bulbokapnin	279,0 ± 15,1
JC-2	(+)-kanadin	>1000
JC-3	(+)-korydalin	>1000
JC-4	(-)-korykavamin	>1000
JC-5	(+)-tetrahydropalmin	>1000
JC-6	(+)-korynolin	>1000
JC-7	(±)-korykavidin	>1000
JC-8	(+)-kanadalin	>1000
JC-9	allokryptopin	>1000

Tab. 21 Hodnoty EC₅₀ (μM) izolovaných alkaloidů (pokračování)

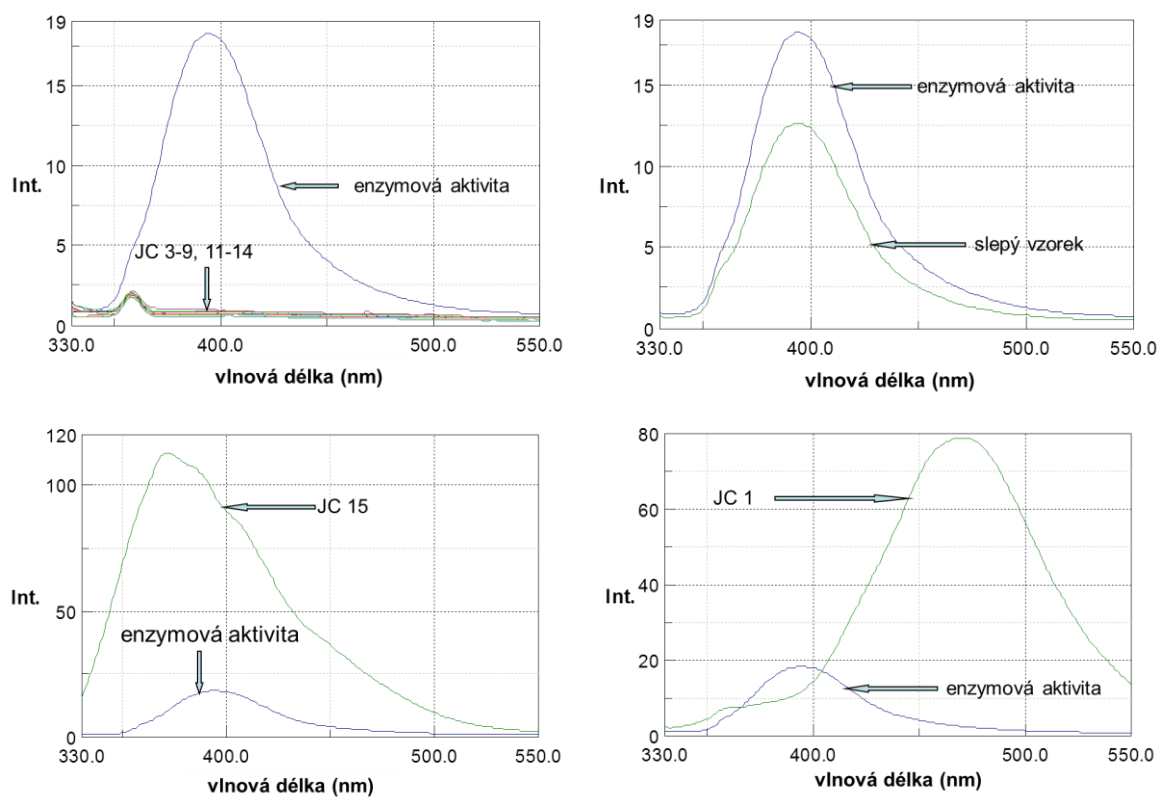
Izolované alkaloidy		EC ₅₀ (μM) DPPH test
JC-10	(+)-korydin	>1000
JC-11	(-)-isokorypalmin	>1000
JC-12	(+)-korypalmin	>1000
JC-13	(-)-skulerin	102,0 ± 4,9
JC-14	(-)-sinoakutin	209,0 ± 8,3
JC-15	(+)- <i>N</i> -methylaurotetanin	>1000
–	kvercetin ^a	25,3 ± 1,3
–	trolox ^a	27,8 ± 0,39
–	L-askorbová kyselina ^a	51,15 ± 3,27

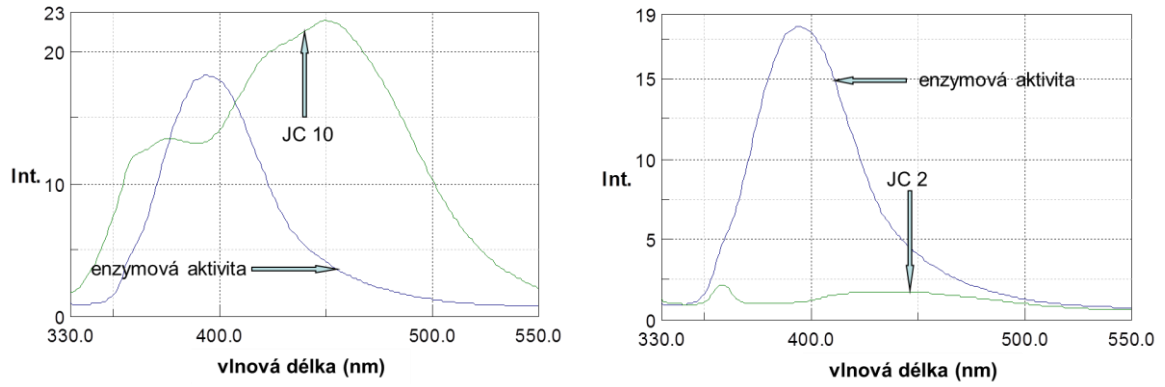
^a referenční antioxidanty

5.2.3 Inhibice hrBACE1

5.2.3.1 Stanovení potenciální interference testovaných látek

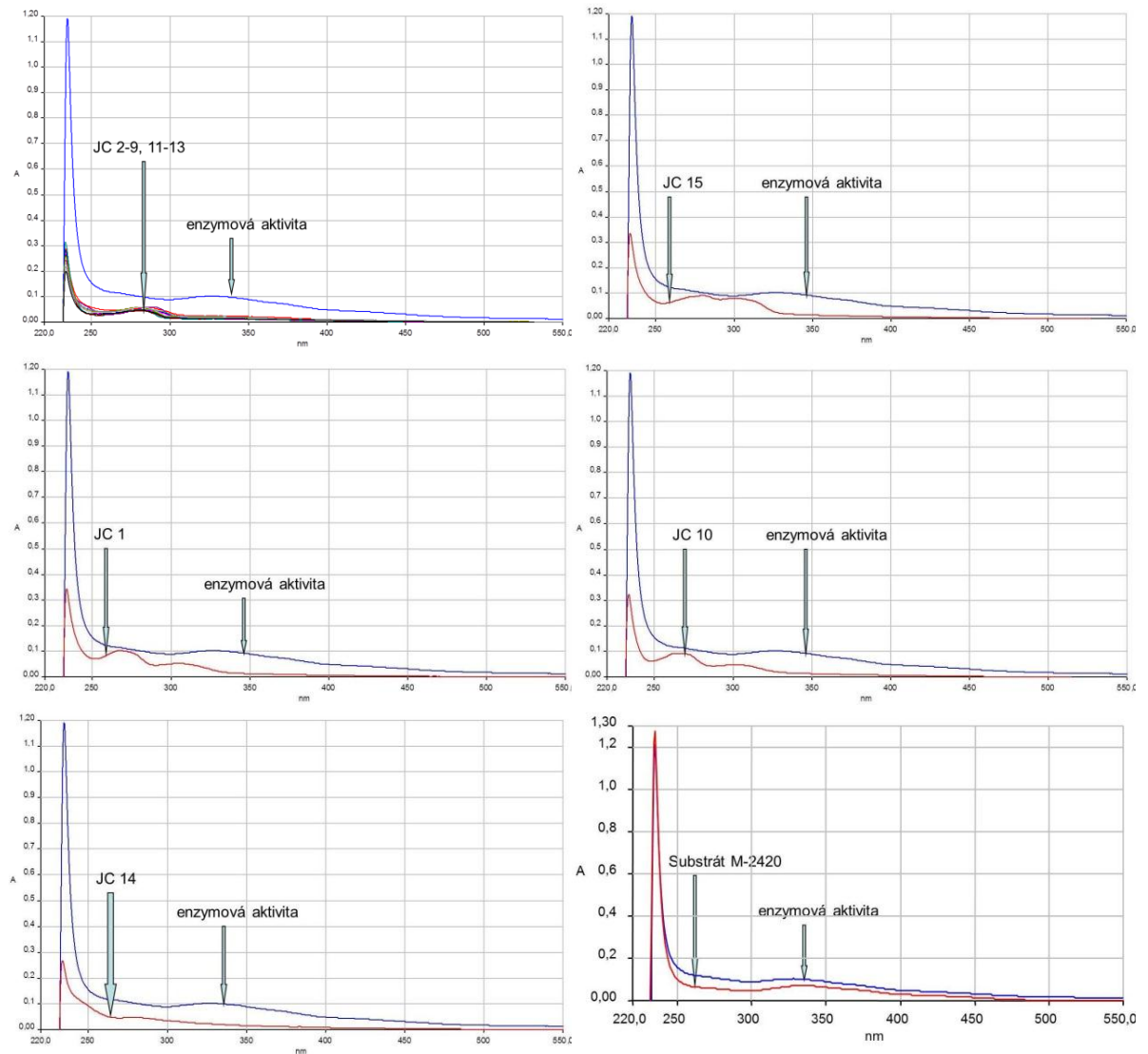
5.2.3.1.1 Fluorescenční spektra JC1-15





Obr. 24 Porovnání fluorescenčních spekter JC-1 až JC-15 a slepého vzorku se spektrem enzymové aktivity

5.2.3.1.2 UV spektra JC-1 až JC-15



Obr. 25 Porovnání UV spekter JC 1-15, substrátu M-2420 a enzymové aktivity

5.2.3.2 Inhibiční aktivita izolovaných alkaloidů vůči hrBACE1

Tab. 22 Hodnoty IC₅₀ (μM) izolovaných alkaloidů (FRET a hr BACE1-IMER assay)

zoloované alkaloidy		IC ₅₀ (μM)	
		FRET assay	hrBACE1-IMER assay
JC-1	(+)-bulbokapnin	NA ^c	NT
JC-2	(+)-kanadin	NA ^c	NT
JC-3	(+)-korydalin	NA	NA
JC-4	(-)-korykavamin	41,16 ± 7,82	1690 ± 545
JC-5	(+)-tetrahydropalmin	NA	NA
JC-6	(+)-korynolin	33,59 ± 0,23	89,07 ± 15,08
JC-7	(±)-korykavidin	0 ^b	15,86 ± 2,64 ^e
JC-8	(+)-kanadalin	0 ^b	18,07 ± 0,11 ^e
JC-9	allokryptopin	0 ^b	16,86 ± 4,35 ^e
JC-10	(+)-korydin	NA ^c	NT
JC-11	(-)-isokorypalmin	0 ^b	17,20 ± 5,82 ^e
JC-12	(+)-korypalmin	NA	0 ^d
JC-13	(-)-skulerin	0 ^b	19,02 ± 1,59 ^e
JC-14	(-)-sinoakutin	NA	NA
JC-15	(+)- <i>N</i> -methyllaurotetanin	NA ^c	NT
–	inhibitor IV ^a	0,02 ± 0,00	0,46 ± 0,06

^a referenční inhibitor BACE1; ^b absence korelace mezi koncentrací testované látky a inhibicí enzymu; ^c inhibice BACE1 byla měřena s Panvera substrátem; ^d chromatografická interference; ^e procentuální inhibice při 5μM koncentraci; NA = testovaná sloučenina nevykazovala žádnou inhibiční aktivitu v 5μM koncentraci; NT = netestováno (interference se substrátem M-2420).

6. DISKUSE

6.1 Výběr rostlinné drogy pro izolaci sekundárních metabolitů

Pro bližší studium cholinesterasové inhibiční aktivity sekundárních metabolitů rostlin alkaloidního typu byla vybrána *Corydalis cava* (L.) Schweigg. & Koerte – dymnivka dutá. Některé alkaloidy izolované z této dymnivky, nebo z dalších druhů dymnivek byly již testovány na cholinesterasovou aktivitu^{13,100}.

Cholinesterasová inhibiční aktivita alkaloidního extraktu z hlíz dymnivky duté byla potvrzena ve vlastním bio-guided testu (tab. 18). Pro screening cholinesterasové aktivity byla použita spektrofotometrická Ellmanova metoda, která dovoluje nejen kvantifikovat cholinesterasovou inhibiční aktivitu extraktu (porovnání hodnot IC_{50} extraktu s inhibitory cholinesteras), ale i eliminovat falešně pozitivní reakce, které se běžně vyskytují při použití screeningových metodách na TLC⁴³.

6.2 Izolace alkaloidů

Je známo, že kvarterní dusík hraje při vazbě na cholinesterasy důležitou roli⁴⁷⁵. Nicméně, tyto sloučeniny mohou mít problém procházet přes hematoencefalickou bariéru⁴⁷⁶. Z tohoto důvodu byla tato práce zaměřena na izolaci terciárních alkaloidů – u vysoce aktivních látek lze očekávat jejich toxickou ale i terapeutickou aktivitu vůči mozkovým cholinesterasám.

Pro zjednodušení izolace terciárních alkaloidů byly nejprve připraveny ze sumárního alkaloidního extraktu alkaloidní výtřepky organickými rozpouštědly z vodných roztoků o rozdílném pH (obr. 8). Na rozdíl od Slavíkova postupu¹⁴ nebyla alkaloidní frakce A obsahující terciární alkaloidy dále dělena roztřepáváním na jednotlivé typy alkaloidů, jejichž chloridy jsou rozpustné/nerozpustné v $CHCl_3$; Slavík dále tyto 2 podfrakce děлил dalším roztřepáváním na alkaloidy fenolové a nefenolové. Při vlastní preliminární studii s ~ 1 g frakce A se tento postup neosvědčil, neboť pomocí TLC a MS/MS analýzy bylo prokázáno, že v jednotlivých 4 podfrakcích byly přítomny prakticky všechny alkaloidy, i když v různém kvantitativním poměru, a proto byly alkaloidy frakce A děleny dále jako jeden celek.

Z alkaloidního výtřepku A obsahující terciární alkaloidy bylo vyizolováno sloupcovou chromatografií a preparativní TLC 15 sloučenin, které poskytly pozitivní reakci

s Dragendorffovým činidlem. Na základě MS analýzy a ^1H a ^{13}C NMR spekter lze izolované alkaloidy rozdělit do 6 strukturálních typů: na protoberberinové, benzofenanthridinové, sekoberberinové, aporfinové, morfinanové a protopinové alkaloidy. Srovnáním spektrálních dat v literatuře a optické otáčivosti byly izolované alkaloidy určeny jako (+)-bulbokapnin (**JC-1**), (+)-kanadin (**JC-2**), (+)-korydalin (**JC-3**), (–)-korykavamin (**JC-4**), (+)-tetrahydropalmin (**JC-5**), (+)-korynolin (**JC-6**), (±)-korykavidin (**JC-7**), (+)-kanadalin (**JC-8**), allokryptopin (**JC-9**), (+)-korydin (**JC-10**), (–)-isocorypalmin (**JC-11**), (–)-korypalmin (**JC-12**), (–)-skulerin (**JC-13**), (–)-sinoakutin (**JC-14**) a (+)-*N*-methyllaurotetanin (**JC-15**). Z kvantitativního hlediska mezi majoritní izolované alkaloidy patřily (+)-bulbokapnin, kterého bylo vyizolováno 47,5 g a (+)-tetrahydropalmin (29,3 g), ostatní alkaloidy byly získány nejčastěji v desítkách až stovkách miligramů. Literární údaje o tom, že (+)-bulbokapnin je uváděn jako hlavní alkaloid, byly i v tomto případě potvrzeny^{12,14}.

Alkaloidy (–)-korykavamin (**JC-4**), (+)-kanadalin (**JC-8**), (+)-korynolin (**JC-6**) a (+)-*N*-methyllaurotetanin (**JC-15**) nebyly z hlíz dymnivky duté dosud izolovány. (+)-Kanadalin byl dříve nalezen pouze v *Hydrastis canadensis* L.⁴⁷⁷. (+)-Kanadalin náleží do malé strukturální skupiny benzylochinolinových alkaloidů nazývané sekoberberiny; jsou považovány za intermediární produkty v biosyntéze ftalidisochinolinových alkaloidů⁴⁷⁸. Zajímavé je, že jeho enantiomer (–)-kanadalin byl identifikován v historické sbírce substancí, jež byly izolovány z dymnivky duté v letech 1898–1928²⁶³. (–)-Korykavamin, (+)-korynolin a (+)-*N*-methyllaurotetanin byly již izolovány z jiných druhů dymnivek (např. z *C. incisa* (Thunb.) Pers., *C. bungeana* Turcz., *C. ambigua* Kuntze a *C. taliensis* Franch)^{101,436,479,480,481}. Ostatní izolované alkaloidy byly izolovány z různých částí dymnivky duté a běžně se vyskytují v rostlinách z čeledi Fumariaceae a Papaveraceae.

6.3 Cholinesterasová inhibiční aktivita izolovaných alkaloidů

Cholinesterasová inhibiční aktivita izolovaných 15 alkaloidů byla studována *in vitro* spektrofotometrickou Ellmanovou metodou. Jako zdroj AChE byla použita pouzdra lidských erytrocytů, zdrojem BuChE byla lidská plazma. Výsledky byly vyjádřeny jako hodnoty IC_{50} (μM), galanthamin, huperzin A a fysostigmin byly použity jako pozitivní kontroly (tab. 20). Galanthamin a huperzin A jsou selektivními inhibitory AChE ($\text{IC}_{50} = 6,9 \pm 0,3 \mu\text{M}$ a $\text{IC}_{50} = 0,252 \pm 0,01 \mu\text{M}$). Huperzin A byl vůči BuChE inhibičně zcela neaktivní ($\text{IC}_{50} > 1 \text{ mM}$), galanthamin vykazoval nevýraznou inhibici ($\text{IC}_{50} = 156 \pm 6,9$

μM). Na druhou stranu, fysostigmin inhiboval významně jak AChE, tak BuChE ($\text{IC}_{50} = 2,17 \pm 0,1 \mu\text{M}$ a $\text{IC}_{50} = 1,62 \pm 0,06 \mu\text{M}$). Minoritní sekoberberinový alkaloid (+)-kanadalin (**JC-8**) významně inhiboval AChE i BuChE ($\text{IC}_{50} = 20,1 \pm 1,1 \mu\text{M}$ a $\text{IC}_{50} = 85,2 \pm 3,2 \mu\text{M}$). Nejvýraznější inhibiční aktivitu vůči AChE vykazoval protoberberinový alkaloid (+)-kanadin (**JC-2**, $\text{IC}_{50} = 12,4 \pm 0,9 \mu\text{M}$). Vyšší inhibiční aktivitu BuChE než galanthamin vykazovaly protopinový alkaloid (\pm)-korykavidin a (+)-bulbokapnin (**JC-7**, $\text{IC}_{50} = 46,2 \pm 1,5 \mu\text{M}$; **JC-1**, $\text{IC}_{50} = 67,0 \pm 1,8 \mu\text{M}$) mající aporfínový skelet. Navíc, (\pm)-korykavidin (**JC-7**) vykazoval i slabou inhibici vůči AChE ($\text{IC}_{50} = 223 \pm 7,8 \mu\text{M}$). Zajímavé je, že (+)-bulbokapnin (**JC-1**), který je v literatuře zmiňován jako inhibitor AChE z elektrického úhoře ($\text{IC}_{50} = 40 \pm 2 \mu\text{M}$)¹³, nevykazoval žádnou inhibiční aktivitu vůči AChE ($\text{IC}_{50} > 1000 \mu\text{M}$). Naopak, jeho inhibiční aktivita vůči sérové bovinní BuChE ($\text{IC}_{50} = 83 \pm 3 \mu\text{M}$)¹³ byla srovnatelná s výsledky dosažené v této práci. Dále, (+)-korydalin (**JC-3**) vykazoval podobné hodnoty IC_{50} u AChE z elektrického úhoře¹³, krysiho mozku¹⁰⁰ a rovněž v této studii na AChE ($\text{IC}_{50} = 40,5 \pm 1,9 \mu\text{M}$). Ve studii z roku 2002 byl (+)-korynolin (**JC-6**), patřící do skupiny benzofenanthridinových alkaloidů, shledán jako nekompetitivní, reverzibilní inhibitor AChE, jeho inhibiční aktivita byla stanovena na mozkové myši AChE ($\text{IC}_{50} = 30,6 \mu\text{M}$)¹⁰¹. Stojí za zmínku, že v této studii byl vůči cholinesterasám zcela neaktivní ($\text{IC}_{50} > 1000 \mu\text{M}$). Na ostatní izolované alkaloidy lze nahlížet jako významně neaktivní látky vůči AChE a BuChE ($\text{IC}_{50} > 100 \mu\text{M}$).

Rozdílné hodnoty IC_{50} látek testovaných v této studii a v literatuře souvisí s použitými modely cholinesteras (pro sledování závislosti mezi strukturou a biologickou aktivitou je nutné vždy používat vybraný stejný enzymový systém). Pro testování inhibice AChE jsou většinou používány AChE z elektrického úhoře (*Electrophorus electricus*), rekombinantní lidská AChE, bovinní erytrocytární AChE, lidská a potkaní krev jako zdroj erytrocytární AChE, erytrocyty, nebo erytrocytární pouzdra a homogenáty potkaního mozku, svalu, srdce, žaludku, jater nebo plic. Jako zdroje BuChE jsou v testech používány lidská rekombinantní BuChE, sérová koňská, lidská nebo potkaní BuChE. Použití lidských cholinesteras dává větší předpoklad, že získané výsledky z tohoto modelu by mohly odpovídat inhibičním (toxickým/terapeutickým) aktivitám *in vivo* – v lidském organismu. V této studii byla použita lidská erytrocytární AChE a sérová BuChE. Protože se v těle obratlovců se vyskytují 3 formy AChE (jak už bylo řečeno), může erytrocytární AChE (G2 forma) poskytovat poněkud rozdílné výsledky než v případě použití mozkové AChE. Optimální by bylo použít rekombinantní mozkovou AChE, ale tato AChE se poměrně rychle rozkládá,

je drahá, práce s ní je velmi náročná a během jejího používání v naší laboratoři nepřinášela efektivní výsledky⁴⁸².

6.4 Antiradikálová aktivita izolovaných alkaloidů

Je všeobecně bráno a uznáváno, že antioxidanty ať endogenní nebo exogenně přijaté, hrají klíčovou roli v ochraně zdraví. Jsou schopné zhaset reaktivní formy kyslíku a dusíku tvořené při oxidačním stresu, které mohou být spuštěny patologicky, nebo xenobiotiky a chrání celistvost DNA před genotoxickými látkami. Nicméně, existuje spousta látek s nejasnými, neurčenými antioxidačními/prooxidačními aktivitami. Prooxidační (toxická) aktivita antioxidantů se může projevit za určitých pomínek (např. při jejich vysokých koncentracích a za přítomnosti přechodných kovů)^{483,484,485}.

Antiradikálová aktivita izolovaných látek byla měřena stabilním DPPH radikálem (2,2'-difenyl-1-pikrylhydrazyl) SIA metodou⁴⁷⁰. Hodnoty antiradikálové aktivity byly vyjádřeny jako EC₅₀ (μM) vzhledem ke troloxu, kvercetin a L-askorbové kyselině jako pozitivní kontrole. Trolox, L-askorbová kyselina a kvercetin jsou antioxidačně působící látky, které jsou často používány jako referenční antioxidanty v různých modelových testech na stanovení antioxidační/antiradikálové aktivity. V této studii, trolox, L-askorbová kyselina a kvercetin vykazovaly významnou zhasací (antiradikálovou) aktivitu (EC₅₀ = 27,8 ± 0,39 μM, 51,15 ± 3,27 μM a 25,3 ± 1,3 μM). Berberinový alkaloid (–)-skulerin (**JC-13**), obsahující ve své struktuře 2 fenolové hydroxyskupiny, vykazoval nejvýraznější zhasací aktivitu DPPH radikálu (EC₅₀ = 102,0 ± 4,9 μM), ostatní testované berberinové alkaloidy (+)-kanadin (**JC-2**), (+)-korydalin (**JC-3**), (–)-isokorypalmin (**JC-11**), (+)-korypalmin (**JC-12**) a (+)-tetrahydropalmin (**JC-5**), obsahující jako substituenty pouze methoxyskupiny nebo methoxyskupiny skupiny a jednu fenolovou hydroxyskupinu skupinu, byly neaktivní (hodnoty EC₅₀ byly větší než 1 mM). V dřívější publikované práci, (–)-skulerin (**JC-13**) vykazoval antiradikálovou aktivitu v *in vitro* testu, ve kterém snižoval Fe²⁺-vitamínem C indukované hladiny malondialdehydu a zhasel volné OH radikály v potkaních jaterních mitochondriích (IC₅₀ = 7,7 ± 2,0 μM a 0,59 ± 0,15 μM). Dále, promorfinanový alkaloid (–)-sinoakutin vykazoval srovnatelnou antiradikálovou aktivitu s aporfinovým alkaloidem (+)-bulbokapninem, (**JC-14**, EC₅₀ = 209,0 ± 8,3 μM; **JC-1**, EC₅₀ = 79 ± 15,1 μM). V dříve publikovaných pracích (–)-sinoakutin vykazoval ochranný vliv (zhasací radikálovou aktivitu) před poškozením buněk (linie PC12) vyvolané peroxidem vodíku⁴⁰⁶, (+)-bulbokapnin inhiboval železitými ionty indukovanou mikrosomální

lipidovou peroxidaci a železitými ionty a peroxidem vodíku indukovanou degradaci ribosy⁴⁸⁶. Další aporfinové alkaloidy, (+)-korydin (**JC-10**) a (+)-*N*-methyllaurotetanin (**JC-15**) lze považovat z hlediska antiradikálové zhášecí schopnosti vůči DPPH radikálu za neaktivní ($EC_{50} > 1$ mM). Je zajímavé, že v dřívější studii (+)-*N*-methyllaurotetanin vykazoval DPPH radikálovou zhášecí aktivitu ($IC_{0,200} = 24,9 \pm 0,6$ μ M), ve které byly testovány alkaloidy izolované z *Hernandia nymphaeifolia* (Presl.) Kubitzki na antioxidační aktivitu⁴⁸⁷. Mezi neaktivní látky ($EC_{50} > 1$ mM) v této studii patřily alkaloidy protopinového typu (\pm)-korykavidin (**JC-7**), (-)-korykavamin (**JC-4**) a allokryptopin (**JC-9**) a benzofenanthridinový alkaloid (+)-korynolin (**JC-6**). Allokryptopin nevykazoval významnou antioxidační aktivitu v *in vitro* testu, ve kterém byla testována inhibice oxidace LDL-cholesterolu. Tato látka inhibovala oxidaci LDL-cholesterol při koncentraci 5 μ g/ml z $34 \pm 0,2$ %⁴⁸⁸.

Alkaloidy (+)-kanadin (**JC-2**), (+)-korydalin (**JC-3**), (-)-isokorypalmin (**JC-11**), (+)-korypalmin (**JC-12**), (+)-tetrahydropalmin (**JC-5**), (+)-kanadalin (**JC-8**), (\pm)-korykavidin (**JC-7**), (-)-korykavamin (**JC-4**), (+)-korydin (**JC-10**) a (+)-korynolin (**JC-6**) byly testovány vůbec poprvé na antiradikálovou/antioxidační aktivitu. Při použití 50% EtOH jako rozpouštědla a nosného proudu v použité validované SIA metodě nebyly některé látky plně rozpustné při přípravě vzorků v testovaných koncentracích (snížena rozpustnost byla pozorována u (+)-kanadinu (**JC-2**), (+)-korydinu (**JC-10**), (+)-korypalminu (**JC-12**), (+)-kanadalinu (**JC-8**) a (\pm)-korykavidinu (**JC-7**). Snížená rozpustnost některých testovaných vzorků mohla způsobit vznik zákalu roztoků a vést k chybám v měření. Isochinolinové alkaloidy jsou zpravidla velmi lipofilní látky a použití 50% EtOH se jeví poněkud nevhodné vzhledem k jejich omezené rozpustnosti v tomto rozpouštědle. Pro ověření jejich zhášecí aktivity by bylo vhodné modifikovat použitou SIA metodu - použít buď jiné rozpouštědlo, ve kterých se budou testované látky lépe rozpouštět (např. dimethylsulfoxid) nebo terciární alkaloidy převést na rozpustnější soli. Pro ověření antiradikálové/antioxidační aktivity testovaných alkaloidů by se měly látky otestovat další metodou, neboť přestože je používání DPPH radikálu velmi rozšířené, v některých případech dává nesprávné výsledky a velmi důležité z hlediska aktivity testovaných látek je i použité rozpouštědlo⁴⁸⁹.

6.5 Inhibice hrBACE1

6.5.1 Výběr substrátu

Protože některé látky obsahující aromatické systémy mohou produkovat interferenční fluorescenci, byly látky nejprve **JC-1** až **JC-15** testovány na potenciální interferenci se substrátem M-2420 – u látek byla proměřena fluorescence a UV spektra. Sloučeniny (+)-bulbokapnin (**JC-1**), (+)-korydin (**JC-10**) a (+)-*N*-methyllaurotetanin (**JC-15**) vykazovaly významnou fluorescenční interferenci způsobenou aromatickým systémem v jejich struktuře (výše uvedené sloučeniny patří strukturně mezi aporfinové alkaloidy), dále vykázal výraznou interferenci protoberberinový (+)-kanadin (**JC-2**). Tyto látky nemohly být testovány na BACE1 inhibiční aktivitu s fluorogenním peptidovým substrátem M-2420, a proto byla BACE1 inhibice těchto látek měřena s Panvera substrátem, u kterého se používá pro excitaci $\lambda = 544$ nm a pro emisi $\lambda = 590$ nm (obr. 24). UV spektra testovaných látek prokázala minimální interferenci látek (adsorbci) při $\lambda = 320$ nm (obr. 25).

6.5.2 FRET assay

Testované látky (+)-bulbokapnin (**JC-1**), (+)-kanadin (**JC-2**), (+)-korydalin (**JC-3**), (+)-tetrahydropalmin (**JC-5**), (+)-korydin (**JC-10**), (+)-*N*-methyllaurotetanin (**JC-15**), (+)-korypalmin (**JC-12**) a (–)-sinoakutin (**JC-14**) byly považované za neaktivní, protože v 5 μ M koncentracích nevykazovaly žádný procentuální pokles intenzit při použití pozitivní kontroly – inhibitoru IV. (–)-Korykavamin (**JC-4**), (+)-korynolin (**JC-6**), (\pm)-korykavidin (**JC-7**), (+)-kanadalin (**JC-8**), allokryptopin (**JC-9**), (–)-isokorypalmin (**JC-11**) a (–)-skulerin (**JC-13**) vykazovaly v 5 μ M koncentraci 21–41% inhibici BACE1. Tyto látky byly dále opakovaně testovány (3–4 \times) v 1–150 μ M koncentracích pro stanovení hodnot IC_{50} . Kromě alkaloidů (–)-korykavaminu (**JC-4**) a (+)-korynolin (**JC-6**) nebyla u ostatních látek shledána závislost mezi koncentrací testovaných látek a enzymovou inhibicí. (–)-Korykavamin (**JC-4**) a (+)-korynolin (**JC-6**) vykazovaly inhibici BACE1 ($IC_{50} = 41,16 \pm 7,85$ μ M a $33,59 \pm 0,23$ μ M), ne však tak výraznou v porovnání s referenčním inhibitorem inhibitor IV ($IC_{50} = 0,20 \pm 0,0$ μ M).

6.5.3 hrBACE1-IMER assay

Výsledky inhibice immobilizované hrBACE1 v HPLC systému odpovídaly výsledkům z předchozího FRET testu (tab. 22). (+)-Bulbokapnin (**JC-1**), (+)-kanadin (**JC-2**), (+)-korydin (**JC-10**) a (+)-*N*-methyllaurotetanin (**JC-15**) nebyly testovány z důvodu interference s M-2420 substrátem. Navíc, v předchozím testu s Panvera substrátem nevykazovaly na BACE1 žádnou inhibiční aktivitu. (+)-Korypalmin (**JC-12**) vykazoval za měřených podmínek chromatografickou interferenci (nebylo možno vypočítat procentuální inhibici z AUC). (+)-korydalin (**JC-3**), (+)-tetrahydropalmatin (**JC-5**) a (–)-sinoakutin (**JC-14**) v 5 µM koncentracích nevykazovaly žádnou inhibiční aktivitu, (–)-korykavamin (**JC-4**), (+)-korynolin (**JC-6**), (±)-korykavidin (**JC-7**), (+)-kanadalin (**JC-8**), allokryptopin (**JC-9**), (–)-isokorypalmin (**JC-11**) a (–)-skulerin (**JC-13**) vykazovaly 12–19% inhibici. Pro stanovení IC₅₀ byly vybrány jen (–)-korykavamin (**JC-4**) a (+)-korynolinu (**JC-6**), neboť z inhibičně aktivních látek vykazovaly v předešlém testu závislost inhibice enzymu na koncentraci testované látky. (–)-Korykavamin (**JC-4**) a (+)-korynolin (**JC-6**) inhibovaly BACE1 v závislosti na koncentracích s IC₅₀ 1690 ± 545 µM a 89,07 ± 15,08 µM. Hodnoty IC₅₀ byly porovnány se standardem inhibitorem IV (IC₅₀ = 0,46 ± 0,06 µM).

Rozdílnost hodnot IC₅₀ (–)-korykavaminu (**JC-4**) a (+)-korynolinu (**JC-6**) při porovnání obou použitých metod je způsobena rozdílným množstvím (koncentrací enzymu) v obou testech a rozdílnými podmínkami při měření, zjištěné výsledky korelují s údaji v literatuře. Ze stanovených hodnot IC₅₀ (–)-korykavaminu (**JC-4**) a (+)-korynolinu (**JC-6**) vyplývá, že tyto látky vykazují řádově podobnou inhibiční BACE1 aktivitu v porovnání s inhibitorem pepstatinem A (IC_{50FRET assay} = 21,19 ± 0,35 µM a IC_{50hrBACE1-IMER} = 481,95 ± 10,70 µM), ale ne tak výraznou jako např. standardní inhibitor IV (IC_{50FRET assay} = 0,02 ± 0,0 µM a IC_{50hrBACE1-IMER} = 0,46 ± 0,06 µM).²²⁹. Srovnatelná inhibiční aktivita BACE1 byla nalezená u kvarterních isochinolinových alkaloidů izolovaných z *Coptidis rhizoma* (groenlandicin, IC₅₀ = 19,68 ± 1,42 µM; epiberberin, IC₅₀ = 8,55 ± 1,29 µM)¹²⁷.

6.6 Shrnutí dosažených výsledků

Závěrem lze shrnout, že alkaloidní frakce z hlíz dymnivky duté nebude s velkou pravděpodobností vykazovat z toxikologického hlediska (při terapeutickém použití jako obsoletního léčiva nebo v případě otravy) významný centrální cholinomimetický efekt na zákla-

dě zhodnocení, které níže uvádím. Alkaloidy, které mají významnou inhibiční aktivitu vůči AChE, tj. (+)-kanadin (**JC-2**), (+)-korydalin (**JC-3**) a (+)-kanadalin (**JC-8**), byly izolovány v kvantitativně nízkém množství (**JC-2** 10 mg; **JC-3** 30 mg; **JC-8** 115 mg) vzhledem k obsahu v droze. Vůči BuChE byly aktivní (+)-bulbokapnin (**JC-1**), (±)-korykavidin (**JC-7**) a (+)-kanadalin (**JC-7**). (+)-Bulbokapnin (**JC-1**) je sice majoritním alkaloidem (46,5 g), jeho aktivita vůči BuChE však není tak výrazná (IC_{50} $67 \pm 2,1$ μ M), u ostatních alkaloidů, ovlivňujících poznatelně BuChE, byl izolační zisk opět nízký (**JC-7** 55 mg; **JC-8** 115 mg). Důležitým nálezem je, že druhý majoritní alkaloid, (+)-tetrahydropalmin (**JC-5**), je z hlediska inhibice BuChE neúčinný, z hlediska ovlivnění AChE prakticky neaktivní a lze tudíž předpokládat případné „zředění“ toxického účinku.

Nicméně, může vzniknout námitka, že tento závěr je spekulativní, protože v hlízách (ať v suchých nebo nativních) nebyly žádnou objektivní analytickou metodou (např. HPLC) přesně stanoveny hodnoty obsahu jednotlivých alkaloidů. Navíc by mohl vzniknout názor, že při aplikaci směsi alkaloidů přítomné v hlízách, by mohlo docházet k synergizaci účinku. Tyto úvahy však pokládám osobně za neopodstatněné, protože na základě zkušeností z izolace, kterou jsem provedl, nepředpokládám, že stanovení obsahu HPLC by se řádově lišilo od izolovaného množství těchto látek. Co se týká možného synergismu účinků izolovaných alkaloidů na cholinesterasy, v literatuře nejsou pro případ alkaloidů ovlivňujících cholinesterasy popsány případy, kdy by se málo aktivní alkaloidy ve svém účinku navzájem synergizovaly ve smyslu silnějších účinků.

Sledování inhibiční aktivity vůči BACE1 za použití testů uvedených v této práci ukázalo jako příspěvek k toxikologii alkaloidů z *Corydalis cava* nemá smysl vůbec komentovat (viz tab. 22).

Z hlediska terapeutického připadá do úvahy využití některých aktivních alkaloidů jako leading structure pro vývoj nových potenciálních léčiv. (+)-kanadin (**JC-2**, IC_{50} $12,4 \pm 0,9$ μ M) a (+)-korydalin (**JC-3**, IC_{50} $40,5 \pm 1,9$ μ M) vykazují zajímavou aktivitu z hlediska inhibice AChE, ale vůči BuChE jsou aktivitou významově nezajímavými látkami. Zajímavou aktivitu vůči BuChE vykázal (±)-korykavidin (**JC-7**; IC_{50} $46,2 \pm 2,4$ μ M). Jinak je tomu u (+)-kanadalinu (**JC-8**), aktivnímu vůči AChE (IC_{50} $20,1 \pm 1,1$ μ M) i BuChE (IC_{50} $85,2 \pm 2,2$ μ M). (+)-Kanadalin (**JC-8**) se zdá být nejperspektivnější látkou z hlediska dalšího potenciálního studia; procentuální inhibice BACE1 při koncentraci látky 5 μ M byla při použití hrACE1-IMER assay $18,7 \pm 0,11$ % (v případě inhibitoru IV byla IC_{50} $0,46 \pm 0,06$ μ M), je to však látka, která je aktivní jak vůči cholinesterasám, tak

vůči BACE1. Zda bude perspektivní pro další studium, ukáže příprava derivátů a jejich biologická aktivita.

Zhodnotím-li vliv izolovaných alkaloidů pouze na BACE1 (i když atraktivnější jsou látky inhibující jak β -sekretasu, tak cholinesterasy), pak zde existují dvě potenciálně zajímavé sloučeniny: (–)-korykavamin (**JC-4**) a (+)-korynolin (**JC-6**). Tyto alkaloidy byly aktivní v obou použitých testech na rozdíl od (+)-kanadalinu (**JC-8**).

Obecná antioxidační aktivita DPPH testem přinesla výsledky, které se daly očekávat na základě hodnot, které poskytly jiné isochinolinové alkaloidy studované pracovní skupinou ADINACO Research Group – tj. hodnoty významově zanedbatelné. Je to aktivita doplňková; vezmeme-li v úvahu, že by některý z alkaloidů mohl být teoreticky používán jako inhibitor cholinesteras, pak by se jeho denní dávka pohybovala řádově maximálně v miligramech. Při takovém množství by se antioxidační účinek nemohl nijak významně projevit, i kdyby se blížil hodnotě troloxu nebo kvercetinu (tab. 21). Nicméně, pro potvrzení antioxidačních aktivit testovaných látek by bylo nutné použít sérii dalších antiradikálových/antioxidačních testů, které dostatečně validně poskytují pohled na chování látky z různých hledisek. Tyto testy (ABTS, ORAC, FRAP, AAPH) jsem však ve své práci nepoužil, protože prvotní studie s DPPH ukázala, že by to nebylo produktivní.

Závěrem, pro případné další studium alkaloidů ovlivňujících Alzheimerovu chorobu je vhodné věnovat pozornost (+)-kanadinu, (+)-korydalinu, (+)-korykavaminu, (\pm)-korykavidinu, (+)-korynolinu a (+)-kanadalinu.

7. ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické botaniky a ekologie

Kandidát: **Mgr. Jakub Chlebek**

Školitel: **Doc. RNDr. Lubomír Opletal, CSc.**

Název disertační práce: **Studium biologické aktivity alkaloidů izolovaných z *Corydalis cava* (Fumariaceae).**

Klíčová slova: *Corydalis cava*, isochinolinové alkaloidy, DPPH, AChE, BuChE, BACE1, IMER.

Hlízy dymnivky duté byly vybrány na základě bio-guided spektrofotometrické Ellmanovy metody jako zdroj isochinolinových alkaloidů pro studium jejich vybraných biologických aktivit. Hlízy dymnivky duté byly extrahovány EtOH a sumární směs s terciárními alkaloidy (frakce A) byly separovány sloupcovou chromatografií na silikagelu použitím stupňovité eluce C_6H_{14} , $CHCl_3$ a EtOH. Opakovaná sloupcová chromatografie, preparativní TLC a krystalizace vedly k izolaci 15 isochinolinových alkaloidů. Chemická struktura izolovaných sloučenin byla určena na základě spektroskopických technik a srovnáním s daty v literatuře. Izolované alkaloidy byly testovány na schopnost inhibovat erytrocytární AChE, sérovou BuChE (IC_{50}), BACE1 a zhášet volné radikály (EC_{50}).

Cholinesterasová inhibiční aktivita byly určena *in vitro* modifikovanou spektrofotometrickou Ellmanovou metodou. (+)-Kanadalin inhiboval AChE i BuChE způsobem závislý na dávce s hodnotou $IC_{50} = 20,1 \pm 1,1 \mu M$ a $85,2 \pm 3,2 \mu M$. (+)-Kanadin byl nejúčinnějším inhibítorem AChE ($IC_{50} = 12,4 \pm 0,9 \mu M$), zatímco (±)-korykavidin a (+)-bulbokapnin byly efektivními inhibitory BuChE ($IC_{50} = 46,2 \pm 2,4 \mu M$ a $67,0 \pm 2,1 \mu M$). Další izolované alkaloidy byly považovány za neaktivní ($IC_{50} > 100 \mu M$).

Zhášecí aktivita volných radikálů u izolovaných alkaloidů byla testována *in vitro* DPPH testem. Nejvyšší aktivitu této skupiny látek vykazovaly (–)-skulerin, (–)-sinoakutin a (+)-bulbokapnin ($EC_{50} = 102 \pm 6,2 \mu M$, $209 \pm 8,1 \mu M$ a $279 \pm 16,7 \mu M$). Další alkaloidy byly považovány za neaktivní ($EC_{50} > 1000 \mu M$).

BACE1 inhibiční aktivita izolovaných alkaloidů byla měřena 2 odlišnými metodami: FRET testem na mikrotitračních destičkách a hrBACE1-IMER testem. FRET assay byla

prováděna na multijamkovém spektrofluorometru za použití substrátu M-2420 a Panvera substrátu. Fluorescenční signály byly detegovány u těchto substrátů při $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 320/405$ nm a 544/590 nm. Panvera substrát byl použit u 4 alkaloidů, které fluorescenčně interferovaly se substrátem M-2420 při $\lambda_{\text{em}} = 405$ nm. hrBACE-IMER byl zapojen do HPLC system a pro chromatografickou analýzu byl používán substrát M-2420. Fluorescenční detektor byl nastaven na $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 320/405$ nm. (-)-Korykavamin a (+)-korynolin vykazovaly BACE1 inhibiční aktivitu v obou metodách: ve FRET testu ($\text{IC}_{50} = 41,16 \mu\text{M}$ a $\text{IC}_{50} = 33,59 \mu\text{M}$) i v hrBACE-IMER testu ($\text{IC}_{50} = 1690 \mu\text{M}$ a $\text{IC}_{50} = 59,07 \mu\text{M}$). Ostatní sloučeniny byly neaktivní nebo nevykazovaly závislost mezi koncentrací látky a enzymovou inhibicí. Žádná z testovaných látek nemůže být považována jako lead structure pro BACE1 inhibici v porovnání s BACE1 standardním inhibitorem – inhibitorem IV ($\text{IC}_{50} = 0,02 \mu\text{M}$ – FRET assay). Použití obou výše uvedených metod představuje vhodný přístup pro screening a určení BACE1 inhibiční aktivity testovaných sloučenin.

8. ABSTRACT

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmaceutical Botany and Ecology

Candidate: Mgr. Jakub Chlebek

Supervisor: Doc. RNDr. Lubomír Opletal, CSc.

Title of Doctoral Thesis: **Study of biological activity of isolated alkaloids from *Corydalis cava* (Fumariaceae).**

Key words: *Corydalis cava*, isoquinoline alkaloids, DPPH, AChE, BuChE, BACE1, IMER.

Tubers of *Corydalis cava* were selected on the basis of bio-guided spectrophotometric Ellman's method as a source of isoquinoline alkaloids for study of their selected biological activities. The tubers of *Corydalis cava* were extracted with ethanol and the mixture of summary tertiary alkaloids (fraction A) was fractionated in silica gel chromatography column using step gradient elution with hexane, chloroform and ethanol. Repeated column chromatography, preparative TLC and crystallization led to the isolation of fifteen isoquinoline alkaloids. The chemical structures of isolated compounds were determined on the basis of spectroscopic techniques and by comparison with literature data. Isolated alkaloids were tested on ability to inhibit AChE, serum BuChE (IC₅₀), BACE1 and for its free-radical scavenging activity (EC₅₀).

The cholinesterase inhibitory activity was determined *in vitro* by modified spectrophotometric Ellman's method. (+)-Canadoline inhibited AChE as well as BuChE in a dose-dependent manner with IC₅₀ values $20.1 \pm 1.1 \mu\text{M}$ and $85.2 \pm 3.2 \mu\text{M}$, respectively. (+)-Canadine with an IC₅₀ value $12.4 \pm 0.9 \mu\text{M}$ was the most potent inhibitor of acetylcholinesterase, whilst (±)-corycavidine and (+)-bulbocapnine were effective inhibitors of butyrylcholinesterase with IC₅₀ values $46.2 \pm 2.4 \mu\text{M}$ and $67.0 \pm 2.1 \mu\text{M}$, respectively. Other isolated alkaloids were considered inactive (IC₅₀ > 100 μM).

The free-radical scavenging activity of isolated alkaloids was tested *in vitro* by means of the DPPH test. The highest activity was exhibited by (–)-scoulerine, (–)-sinoacutine and (+)-bulbocapnine with EC₅₀ values $102 \pm 6.2 \mu\text{M}$, $209 \pm 8.1 \mu\text{M}$ and $279 \pm 16.7 \mu\text{M}$, respectively. Other isolated alkaloids were considered inactive (EC₅₀ > 1000 μM).

BACE1 inhibitory activity of isolated alkaloids was measured by two different assays: multi-well plate format (FRET assay) and hrBACE1-IMER assay. FRET assay in solution studies was carried out on a multi-well spectrofluorimeter using M-2420 and Panvera substrates. The assay was performed by reading the fluorescence signal at $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 320/405$ nm and 544/590 nm, respectively. Panvera substrate was used for four compounds which were found to interfere with substrate M-2420 at $\lambda = 405$ nm. The hrBACE-IMER was inserted into a HPLC system and chromatographic analyses were performed using substrate M-2420. Fluorescence detector was set at 320 and 405 nm for excitation and emission wavelengths, respectively. (-)-Corycavamine and (+)-corynoline established their BACE1 inhibitory activity in both FRET assay ($IC_{50} = 41,16$ μM and $IC_{50} = 33,59$ μM , respectively) and in the hrBACE-IMER assay ($IC_{50} = 1690$ μM and $IC_{50} = 59,07$ μM , respectively), other compounds were inactive or did not show a correlation between inhibitor concentration and enzyme inhibition. None of tested compounds can be considered as a good lead compound for BACE1 inhibition in comparison with BACE1 standard inhibitor IV ($IC_{50} = 0.02$ μM). Use of the above mentioned methods represents a suitable approach for the screening and determination of BACE1 inhibitory activity of tested compounds.

9. PŘEHLED PUBLIKACÍ

9.1 Původní práce

Cahlíková L., Macáková K., Kuneš J., Kurfürst M., Opletal L., Cvačka J., Chlebek J., Blunden G.: Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory compounds from *Eschscholzia californica* (Papaveraceae). *Nat. Prod. Commun.* 2010, 5, 1035–1038.

Chlebek J., Macáková K., Cahlíková L., Kurfürst M., Kuneš J., Opletal L.: Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory compounds from *Corydalis cava* (Fumariaceae). *Nat. Prod. Commun.* 2011, 6, 607–610.

Novák Z., Chlebek J., Opletal L., Jiroš P., Macáková K., Kuneš J., Cahlíková L.: Corylucinine, a new alkaloid from *Corydalis cava* (Fumariaceae), and its cholinesterase activity. *Nat. Prod. Commun.* 2012, přijato do tisku.

9.2 Přehledy

Kolečkář V., Řeháková Z., Brojerová E., Kuča K., Jun D., Macáková K., Opletal L., Drašar P., Jahodář L., Chlebek J., Cahlíková L.: Proanthocyanidiny a jejich antioxidační aktivita. *Chem. Listy* 2012, 106, 113–121.

Cahlíková L., Macáková K., Chlebek J., Hošťálková A., Kulhánková A., Opletal L.: Ecdysterone and its activity on some degenerative diseases. *Nat. Prod. Commun.* 2011, 6, 707–718.

9.3 Monografie

Opletal L., Rozkot M., Chlebek J., Čeřovský J.: Látky přírodního původu potenciálně ovlivňující reprodukci prasat. in: Opletal L., Skřivanová V. (eds): Přírodní látky a jejich biologická aktivita. sv. 2. Využití látek pro ovlivnění fyziologických procesů hospodářských zvířat, s. 517–582, Karolinum, Praha 2010.

9.4 Konference

9.4.1 Přednášky

Chlebek J., Macáková K., Cahlíková L., Opletal L., Kurfürst M.: Alkaloidy *Corydalis cava* (Fumariaceae) a jejich inhibiční cholinesterasová aktivita. Sborník abstraktů přednášek a plakátových sdělení, XXXX. Konferencia Syntéza a analýza liečiv, Modra, Slovensko, 2. – 4. 9. 2010, str. 39.

Chlebek J., De Simone A., Mancini F., Andrisano V., Opletal L.: BACE1 inhibitory activity of *Corydalis cava* alkaloids. Book of abstracts and lectures, Summer School on Pharmaceutical Analysis 2011, Pavia, September 19th – 21st 2011, Italy, p. 12.

9.4.2 Plakátová sdělení

Hošťálková A., Macáková K., Chlebek J., Opletal L., Cahlíková L.: Screening vybraných taxonů rostlin na inhibici cholinesteráz a antioxidační účinek. Sborník abstraktů přednášek a plakátových sdělení, XXXX. Konferencia Syntéza a analýza liečiv, Modra, Slovensko, 2. – 4. 9. 2010, str. 71, [P24].

Chlebek J., Macáková K., Cahlíková L., Opletal L., Kurfürst M.: Isochinolinové terciární alkaloidy *Corydalis cava* a jejich inhibiční aktivita vůči acetylcholinesterase a butyrylcholinesterase. Sborník 38. Konference Syntéza a analýza léčiv, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Hradec Králové, Česká Republika, 14. – 16. 9. 2009, str. 89, [P27].

Chlebek J., Macáková K., Cahlíková L., Opletal L., Kurfürst M.: Isoquinoline alkaloids from *Corydalis cava* (Fumariaceae) as potential cholinesterase inhibitors. Book of abstracts, 7th International Symposium on Chromatography of Natural Products, and 6th International Symposium of the International Society for the Development of Natural Products, Lublin, Poland, June 14th – 17th 2010, p. 83, [P21].

Chlebek J., Macáková K., Cahlíková L., Opletal L., Kurfürst M.: Anticholinesterase and free-radical scavenging activity of *Corydalis cava* alkaloids. 59th International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research, Antalya, Turkey, September 4th – 9th 2011, *Planta Med.* 2011, 77, 1387 [PL57].

Chlebek J., Macáková K., Cahlíková L., Opletal L.: A free-radical scavenging activity of *Corydalis cava* alkaloids. Book of abstracts, 40th Conference Drug Synthesis and Analysis, Brno, Czech Republic, September 12th – 13th 2011, [P31].

9.4.3 Účelové finanční podpory

Chlebek J., Cahlíková L., Macáková K., Opletal L.: Sekundární metabolity rostlin z podtříd Magnoliidae, Ranunculidae, Cornidae a Lamiidae ovlivňující aktivitu lidských cholinesteras in vitro jako příspěvek ke studiu Alzheimerovy choroby: bio-guided isolation strategy. GA UK Univerzity Karlovy, č. 122309/209/BiBIO (2009–2011).

10. LITERATURA

- ¹ Bala K. M., Sri P. A., Shiva K. R., Ramu V., Satyanarayana D., Madhu P.: Drug interaction; principles, methodology and applications (general aspects). *Int. J. Chem. Pharm. Sci.* 2011, 2, 1–4.
- ² Délano-Frier J. P., Castro-Guillén J. L., Blanco-Labra A.: Recent findings on the multifaceted functionality of enzyme inhibition by natural compounds: A review. *Curr. Enzym. Inhib.* 2008, 4, 121–152.
- ³ Houghton P. J., Rena Y., Howes M. J.: Acetylcholinesterase inhibitors from plants and fungi. *Nat. Prod. Rep.* 2006, 23, 181–199.
- ⁴ Aráoz R., Molgo J., Marsac N. T.: Neurotoxic cyanobacterial toxins. *Toxicon* 2010, 56, 813–828.
- ⁵ Ratih P., Se-Kwon K.: Neuroprotective effects of marine algae. *Mar. Drugs* 2011, 9, 803–818.
- ⁶ Geonseek R., Soo H. P., Eun S. K., Byoung W. C., Shi Y. R., Bong H. L.: Cholinesterase inhibitory activity of two farnesylacetone derivatives from the brown alga *Sargassum sagamianum*. *Arch. Pharmacol. Res.* 2003, 26, 796–799.
- ⁷ Garcia-Alonso I., Martinez J. R., Aneiros A., Acosta K., Cowley S., Alvarez M., Jomarron L., Marrero M., Halstead B. W., Foster C. L.: Cuban marine algae as sources on potent antiherpetic and anticholinesterase metabolites. *J. Nat. Tox.* 1992, 1, 39–45.
- ⁸ Wang T., Tang X. C.: Reversal of scopolamine-induced deficits in radial maze performance by (–)-huperzine A: comparison with E2020 and tacrine. *Eur. J. Pharmacol.* 1998, 349, 137–142.
- ⁹ Berkov S., Bastida J., Nikolova M., Viladomat F., Codina C.: Rapid TLC/GC-MS identification of acetylcholinesterase inhibitors in alkaloid extracts. *Phytochem. Anal.* 2008, 19, 411–419.
- ¹⁰ Hostettmann K., Borloz A., Urbain A., Marston A.: Natural product inhibitors of acetylcholinesterase. *Curr. Org. Chem.* 2006, 10, 825–847.
- ¹¹ Mukherjee P. K., Kumar V., Malb M., Houghton P. J.: Acetylcholinesterase inhibitors from plants. *Phytomedicine* 2007, 14, 289–300.
- ¹² Preininger V., Thakur R. S., Šantavý F.: Isolation and chemistry of alkaloids from plants of the family Papaveraceae LXVII: *Corydalis cava* (L.) Sch. et K. (*C. tuberosa* DC.). *J. Pharm. Sci.* 1976, 65, 294–296.
- ¹³ Adersen A., Kjølbye A., Dall O., Jäger A. K.: Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory compounds from *Corydalis cava* Schweigg. & Kort. *J. Ethnopharmacol.* 2007, 113, 179–182.
- ¹⁴ Slavík J., Slavíková L.: Alkaloids from *Corydalis cava* (L.) Schw. et Koerte. *Coll. Czech. Chem. Comm.* 1979, 44, 2261–2274.
- ¹⁵ Preininger V.: In: *The Alkaloids*, Brossi A (ed.), Chemistry and pharmacology, sv. 29, Academic Press, New York, 1986.

-
- ¹⁶ Baloun J., Jahodář L., Leifertová I., Štípek S.: Rostliny způsobující otravy a alergie. Avicenum, Praha 1989.
- ¹⁷ Gonzalez-Vegas J. A.: Antagonism of dopamine-mediated inhibition in the nigro-striatal pathway: A mode of action of some catatonia-inducing drugs. *Brain Res.* 1974, 80, 219–228.
- ¹⁸ Hrdina V., Hrdina R., Jahodář L., Martinec Z., Měrka V.: *Přírodní toxiny a jedy*. Galén a Karolinum, Praha 2004.
- ¹⁹ Ellis J. M.: Cholinesterase inhibitors in the treatment of dementia. *J Am. Osteopath. Assoc.* 2005, 105, 145–158.
- ²⁰ Henze T.: Therapy of myasthenia gravis with cholinesterase inhibitors: principles and pharmacologic monitoring. *Fortschr. Neurol. Psychiatr.* 1996, 64, 110–121.
- ²¹ Lincová D., Farghali H. et al.: *Základní a aplikovaná farmakologie*. 2. vyd. Galén, Praha 2007.
- ²² Řepová L.: *Diplomová práce*. Univerzita Karlova Praha, Farmaceutická fakulta, Hradec Králové 2007.
- ²³ Massoulié J.: The origin of the molecular diversity and functional anchoring of cholinesterases. *Neurosignals* 2002, 11, 130–143.
- ²⁴ Giacobini E.: Cholinesterase inhibitors: new roles and therapeutic alternatives. *Pharmacol. Res.* 2004, 50, 433–440.
- ²⁵ Scholl F. G., Scheiffele P.: Making connections: cholinesterase-domain proteins in the CNS. *Trends Neurosci.* 2003, 26, 618–624.
- ²⁶ Genever P. G., Birch M. A., Brown E., Skerry T. M.: Osteoblast-derived acetylcholinesterase: a novel mediator of cell-matrix interactions in bone? *Bone* 1999, 24, 297–303.
- ²⁷ Paraoanu L. E., Layer P. G.: Mouse acetylcholinesterase interacts in yeast with the extracellular matrix component laminin-1beta. *FEBS Lett.* 2004, 576, 161–164.
- ²⁸ Sharma K. V., Koenigsberger C., Brimijoin S., Bigbee J. W.: Direct evidence for an adhesive function in the noncholinergic role of acetylcholinesterase in neurite outgrowth. *J. Neurosci. Res.* 2001, 63, 165–175.
- ²⁹ Inestrosa N. C., Alvarez A., Perez C. A., Moreno R. D., Vicente M., Linker C., Casanueva O. I., Soto C., Garrido J.: Acetylcholinesterase accelerates assembly of amyloid-beta-peptides into Alzheimer's fibrils: possible role of the peripheral site of the enzyme. *Neuron* 1996, 16, 881–891.
- ³⁰ Carson K. A., Geula C., Mesulam M. M.: Electron microscopic localization of cholinesterase activity in Alzheimer brain tissue. *Brain Res.* 1991, 540, 204–208.
- ³¹ Alvarez A., Alarcon R., Opazo C., Campos E. O., Munoz F. J., Calderon F. H., Dajas F., Gentry M. K., Doctor B. P., De Mello F. G., Inestrosa N. C.: Stable complexes involving acetylcholinesterase and amyloid-beta peptide change the biochemical properties of the enzyme and increase the neurotoxicity of Alzheimer's fibrils. *J. Neurosci.* 1998, 18, 3213–3223.
- ³² Patočka J., Kuča K., Jun D.: Acetylcholinesterase: crucial enzyme of human body. *Acta Medica* 2004, 47, 215–230.

-
- ³³ Miao Y., He N., Zhu J. J.: History and new developments of assays for cholinesterase activity and inhibition. *Chem. Rev.* 2010, *110*, 5216–5234.
- ³⁴ Ellman G. L., Courtney K. D., Andres V., Featherstone R. M.: A new rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 1961, *7*, 88–95.
- ³⁵ Ingkaninan K., de Best C. M., van der Heijden R., Hofte A. J. P., Karabatak B., Irth H., Tjaden U. R., van der Greef J., Verpoorte R.: High-performance liquid chromatography with on-line coupled UV, mass spectrometric and biochemical detection for identification of acetylcholinesterase inhibitors from natural products *J. Chromatogr. A.* 2000, *872*, 61–73.
- ³⁶ Ingkaninan K., Temkitthawon P., Chuenchom K., Yuyaem T., Thongnoi W.: Screening for acetylcholinesterase inhibitory activity in plants used in Thai traditional rejuvenating and neurotonic remedies. *J. Ethnopharmacol.* 2003, *89*, 261–264.
- ³⁷ Brühlmann C., Marston A., Hostettmann K., Carrupt P. A., Testa B.: Screening of non-alkaloidal natural compounds as acetylcholinesterase inhibitors. *Chem. Biodivers.* 2004, *1*, 819–829.
- ³⁸ Kim D. K., Lee K. T., Baek N. I., Kim S. H., Park H. W., Lim J. P., Shin T. Y., Eom D. O., Yang J. H., Eun J. S.: Acetylcholinesterase inhibitors from the aerial parts of *Corydalis speciosa*. *Arch. Pharmacol. Res.* 2004, *27*, 1127–1131.
- ³⁹ Hammond P. S., Foster J. S.: A microassay-based procedure for measuring low levels of toxic organophosphorus compounds through acetylcholinesterase inhibition. *Anal. Biochem.* 1989, *180*, 380–383.
- ⁴⁰ Worek F., Mast U., Kiderlen D., Diepold C., Eyer P.: Improved determination of acetylcholinesterase activity in human whole blood. *Clin. Chim. Acta* 1999, *288*, 73–90.
- ⁴¹ Manuel J. D., Viria M. M.: Validación de la determinación de acetilcolinesterasa eritrocítica humana a 340 nm. *Rev. Biomed.* 2000, *11*, 161–168.
- ⁴² Kiely J. S., Moos W. H., Pavia M. R., Schwarz R. D., Woodward G. L.: A silica gel plate-based qualitative assay for acetylcholinesterase activity: a mass method to screen for potential inhibitors. *Anal. Biochem.* 1991, *196*, 439–442.
- ⁴³ Rhee I. K., van Rijn R. M., Verpoorte R.: Qualitative determination of false-positive effects in the acetylcholinesterase assay using thin layer chromatography. *Phytochem. Anal.* 2003, *14*, 127–131.
- ⁴⁴ Marston A., Kissling J., Hostettmann K.: A Rapid TLC bioautographic method for the detection of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors in plants. *Phytochem. Anal.* 2002, *13*, 51–54.
- ⁴⁵ Okabe H., Sagesaka K., Nakajima N., Noma A.: New enzymatic assay of cholinesterase activity. *Clin. Chim. Acta* 1977, *80*, 87–94.
- ⁴⁶ Pavlov V., Xiao Y., Willner I.: Inhibition of the acetylcholine esterase-stimulated growth of Au nanoparticles: Nanotechnology-based sensing of nerve gases. *Nano Lett.* 2005, *5*, 649–653.
- ⁴⁷ Wang M., Gu X., Zhang G, Zhang D., Zhu D.: Continuous colorimetric assay for acetylcholinesterase and inhibitor screening with gold nanoparticles. *Langmuir* 2009, *25*, 2504.

-
- ⁴⁸ Guilbalt G. G., Kramer, D. N.: Resorufin butyrate and indoxyl acetate as fluorogenic substrates for cholinesterase. *Anal. Chem.* 1965, *37*, 120–123.
- ⁴⁹ Parvari R., Pecht I., Soreq H.: A microfluorometric assay for cholinesterases, suitable for multiple kinetic determinations of picomoles of released thiocholine. *Anal. Biochem.* 1983, *133*, 450–456.
- ⁵⁰ Navas D. A., Garcia S. F., Bracho V., Lovillo J., Aguilar A.: Enzymic determination of fenitrothion by cholinesterase and acetylcholinesterase on fluorogenic substrates. *Frese-
nius J. Anal. Chem.* 1997, *357*, 958–961; Chem. Abstr. *127*, 1938 (1997).
- ⁵¹ Zhou M., Diwu Z., Panchuk-Voloshina N., Haugland R. P.: A stable nonfluorescent derivative of resorufin for the fluorometric determination of trace hydrogen peroxide: Applications in detecting the activity of phagocyte NADPH oxidase and other oxidases. *Anal. Biochem.* 1997, *253*, 162–168.
- ⁵² Rhee I. K., Appels N., Luijendijk T., Irth H., Verpoorte R.: Determining acetylcholinesterase inhibitory activity in plant extracts using a fluorimetric flow assay. *Phytochem. Anal.* 2003, *14*, 145–149.
- ⁵³ Hadd A. G., Jacobson S. C., Ramsey J. M.: Microfluidic assays of acetylcholinesterase inhibitors. *Anal. Chem.* 1999, *71*, 5206–5212.
- ⁵⁴ Gill R., Bashshi L., Freema R. Willner I.: Optical detection of glucose and acetylcholine esterase inhibitors by H₂O₂-sensitive CdSe/ZnS quantum dots. *Angew. Chem, Int. Ed.* 2008, *47*, 1676–1679.
- ⁵⁵ Guilarte T. R., Burns H. D., Dannals R. F., Wagner H. N. J.: A simple radiometric in vitro assay for acetylcholinesterase inhibitors. *J. Pharm. Sci.* 1983, *72*, 90–92.
- ⁵⁶ Johnson C. D., Russell R. I.: A rapid, simple, radiometric assay for cholinesterase, suitable for multiple determinations. *Anal. Biochem.* 1975, *64*, 229–238.
- ⁵⁷ Reed D. J., Goto K., Wang C. H.: A direct radioisotopic assay for acetylcholinesterase. *Anal. Biochem.* 1966, *16*, 59–64.
- ⁵⁸ Wall D. B., Finch J. W., Cohen S. A.: Comparison of desorption/ionization on silicon (DIOS) time-of-flight and liquid chromatography/tandem mass spectrometry for assaying enzyme-inhibition reactions. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2004, *18*, 1482–1486.
- ⁵⁹ de Jong C. F., Derks R. J. E., Bruyneel B., Niessen W., Irth H.: High-performance liquid chromatography–mass spectrometry-based acetylcholinesterase assay for the screening of inhibitors in natural extracts. *J. Chromatogr. A.* 2006, *1112*, 303–310.
- ⁶⁰ Frankfort S. V., Ouwehand M., van Maanen M. J., Rosing H., Tulner L. R., Beijnen J. H.: A simple and sensitive assay for the quantitative analysis of rivastigmine and its metabolite NAP 226-90 in human EDTA plasma using coupled liquid chromatography and tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2006, *20*, 3330–3336.
- ⁶¹ Kumaran S, Tran-Minh C.: Determination of organophosphorous and carbamate insecticides by flow injection analysis. *Anal. Biochem.* 1992, *200*, 187–194.
- ⁶² Kumaran S., Morita M.: Application of a cholinesterase biosensor to screen for organophosphorus pesticides extracted from soil. *Talanta* 1995, *42*, 649–655.
- ⁶³ Kindervater R. Künnecke W., Schmid R. D.: Exchangeable immobilized enzyme reactor for enzyme inhibition tests in flow-injection analysis using a magnetic device. Determination of pesticides in drinking water. *Anal. Chim. Acta* 1990, *234*, 113–117.

-
- ⁶⁴ Leon-Gonzalez M. E., Townshend A.: Determination of organophosphorus and carbamate pesticide standards by liquid-chromatography with detection by inhibition of immobilized acetylcholinesterase. *J. Chromatogr.* 1991, 539, 47–54.
- ⁶⁵ Andrisano V., Bartolini M., Gotti R., Cavrini V., Felix G. J.: Determination of inhibitors' potency (IC₅₀) by a direct high-performance liquid chromatographic method on an immobilised acetylcholinesterase column. *J. Chromatogr. B, Biomed. Sci. Appl.* 2001, 753, 375–383.
- ⁶⁶ Bartolini M., Cavrini V., Andrisano V.: Monolithic micro-immobilized-enzyme reactor with human recombinant acetylcholinesterase for on-line inhibition studies. *J. Chromatogr. A.* 2004, 1031, 27–34.
- ⁶⁷ Bartolini M., Cavrini V., Andrisano V.: Choosing the right chromatographic support in making a new acetylcholinesterase-micro-immobilised enzyme reactor for drug discovery. *J. Chromatogr. A.* 2005, 1065, 135–144.
- ⁶⁸ Orhan I., Sener B.: Acetylcholinesterase inhibitors from natural resources. *FABAD J. Pharm. Sci.* 2003, 28, 51–58.
- ⁶⁹ Takhtajan A.: *Flowering Plants*, 2nd ed., Springer, Berlin-Heidelberg 2009.
- ⁷⁰ López S., Bastida J., Viladomat F. Codina C.: Acetylcholinesterase inhibitory activity of some Amaryllidaceae alkaloids and *Narcissus* extracts. *Life Sci.* 2002, 71, 2521–2529.
- ⁷¹ Bachus R., Bickel U., Thomsen T., Roots I., Kewitz H.: The *O*-demethylation of the antimentia drug galanthamine is catalysed by cytochrome P450 2D6. *Pharmacogen.* 1999, 9, 661–668.
- ⁷² Kulhánková A., Cahlíková L., Macáková K., Opletal L.: Biologicky aktivní metabolity rostlin čeledi Amaryllidaceae, jejich cholinesterasová a antioxidační aktivita. XI Mezioborové setkání mladých biologů, biochemiků a chemiků (Žďár nad Sázavou, 24. 5. – 26. 5. 2011). *Chem. Listy* 2011, 105, 405–406.
- ⁷³ Elgorashi E. E., Stafford G. I., van Staden J.: Acetylcholinesterase enzyme inhibitory effects of Amaryllidaceae alkaloids. *Planta Med.* 2004, 70, 258–260.
- ⁷⁴ Houghton P. J., Agbedahunsi J. M., Adegbulugbe A.: Choline esterase inhibitory properties of alkaloids from two Nigerian *Crinum* species. *Phytochemistry* 2004, 65, 2893–2896.
- ⁷⁵ Orhan I., Sener B.: Bioactivity-directed fractionation of alkaloids from some Amaryllidaceae plants and their anticholinesterase activity. *Chem. Nat. Comp.* 2003, 39, 383–386.
- ⁷⁶ Rhee I. K., Appels N., Hofte B., Karabatak B., Erkelens C., Stark L. M., Flippin L. A., Verpoorte R.: Isolation of the acetylcholinesterase inhibitor ungeremine from *Nerine bowdenii* by preparative HPLC coupled on-line to a flow assay system. *Biol. Pharm. Bull.* 2004, 27, 1804–1809.
- ⁷⁷ Kalauni S. K., Choudhary M. I., Khalid A., Manandhar M. D., Shaheen F., Atta-ur-Rahman, Gewali M. B.: New cholinesterase inhibiting steroidal alkaloids from the leaves of *Sarcococca coriacea* of Nepalese origin. *Chem. Pharm. Bull.* 2002, 50, 1423–1426.
- ⁷⁸ Choudhary M. I., Devkota K. P., Nawaz S. A., Shaheen F., Atta-ur-Rahman.: Cholinesterase-inhibiting new steroidal alkaloids from *Sarcococca hookeriana* of Nepalese origin. *Helv. Chim. Acta* 2004, 87, 1099–1107.

-
- ⁷⁹ Choudhary M. I., Devkota K. P., Nawaz S. A., Ranjit R., Atta-ur-Rahman.: Cholinesterase inhibitory pregnane-type steroidal alkaloids from *Sarcococca hookeriana*. *Steroids* 2005, 70, 295–303.
- ⁸⁰ Devkota K. P., Lenta B. N., Wansi J. D., Choudhary M. I., Kisangau D. P., Naz Q., Samreen S. N.: Bioactive 5 α -pregnane-type steroidal alkaloids from *Sarcococca hookeriana*. *J. Nat. Prod.* 2008, 71, 1481–1484.
- ⁸¹ Devkota K. P., Lenta B. N., Choudhary M. I., Naz Q., Fekam F. B., Rosenthal P. J., Sewald N.: Cholinesterase inhibiting and antiplasmodial steroidal alkaloids from *Sarcococca hookeriana*. *Chem. Pharm. Bull.* 2007, 55, 1397–1401.
- ⁸² Atta-ur-Rahman, Feroz F., Naeem I., Zaheer-ul-Haq, Nawaz S. A., Khan N., Khan M. R., Choudhary M. I.: New pregnane-type steroidal alkaloids from *Sarcococca saligna* and their cholinesterase inhibitory activity. *Steroids* 2004, 69, 735–741.
- ⁸³ Atta-ur-Rahman, Zaheer-ul-Haq, Khalid A., Anjum S., Khan M. R., Choudhary M. I.: A new class of cholinesterase inhibitors. *Helv. Chim. Acta* 2002, 85, 678–688.
- ⁸⁴ Khalid A., Zaheer-ul-Haq, Anjum S., Riaz Khan M., Atta-ur-Rahman, Choudhary M. I.: Kinetics and structure-activity relationship studies on pregnane-type steroidal alkaloids that inhibit cholinesterases. *Bioorg. Med. Chem.* 2004, 12, 1995–2003.
- ⁸⁵ Anwar-ul G. H., Ghayur M. N., Khalid A., Zaheer-ul-Haq, Choudhary M. I., Atta-ur-Rahman.: Presence of antispasmodic, antidiarrheal, antisecretory, calcium antagonist and acetylcholinesterase inhibitory steroidal alkaloids in *Sarcococca saligna*. *Planta Med.* 2005, 71, 120–125.
- ⁸⁶ Atta-ur-Rahman, Feroz F., Zaheer-ul-Haq, Nawaz S. A., Khan M. R., Choudhary M. I.: *Nat. Prod. Res.* 2003, 17, 235–241.
- ⁸⁷ Atta-ur-Rahman, Parveen S., Khalid A., Farooq A., Choudhary M. I.: Acetyl and butyrylcholinesterase-inhibiting triterpenoid alkaloids from *Buxus papillosa*. *Phytochemistry* 2001, 58, 963–968.
- ⁸⁸ Atta-ur-Rahman, Choudhary M. I.: Bioactive natural products as a potential source of new pharmacophores a theory of memory. *Pure Appl. Chem.* 2001, 73, 555–560.
- ⁸⁹ Atta-ur-Rahman, Parveen S., Khalid A., Farooq A., Ayatollahi S. A. M., Choudhary M. I.: Acetylcholinesterase inhibiting triterpenoidal alkaloids from *Buxus hyrcana*. *Heterocycles* 1998, 49, 481–488.
- ⁹⁰ Stejskal J., Kovář J., Slavík J.: Inhibition of acetylcholine esterase and butyrylcholine esterase with isoquinoline alkaloids. *Coll. Czech. Chem. Commun.* 1985, 50, 2471–2479.
- ⁹¹ Ulrichová J., Walterová D., Preininger V., Slavík J., Lenfeld J., Cushman M., Šimánek, V.: Inhibition of acetylcholinesterase activity by some isoquinoline alkaloids. *Planta Med.* 1983, 48, 111–115.
- ⁹² Ulrichová J., Walterová D., Preininger V., Šimánek V.: Inhibition of butyrylcholinesterase activity by Some isoquinoline alkaloids. *Planta Med.* 1983, 48, 174–177.
- ⁹³ Kuznetsova L. P., Nikolskaya E. B., Sochilina E. E., Faddeeva M. D.: Inhibition of human blood acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase by some alkaloids. *J. Evol. Biochem. Physiol.* 2002, 38, 35–39.

-
- ⁹⁴ Cahlíková L., Opletal L., Kurfürst M., Macáková K., Kulhánková A., Hošťálková A.: Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory compounds from *Chelidonium majus* (Papaveraceae). *Nat. Prod. Commun.* 2010, 5, 1751–1754.
- ⁹⁵ Cahlíková L., Macáková K., Kuneš J., Kurfürst M., Opletal L., Cvačka J., Chlebek J., Blunden G.: Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory compounds from *Eschscholzia californica* (Papaveraceae). *Nat. Prod. Commun.* 2010, 5, 1035–1038.
- ⁹⁶ Kim S. R., Hwang S. Y., Jang Y. P., Park M. J., Markelonis G. J., Oh T. H., Kim Y. C.: Protopine from *Corydalis ternata* has anticholinesterase and anti-amnesic activities. *Planta Med.* 1999, 65, 218–221.
- ⁹⁷ Miyazawa M., Yoshio K., Ishikawa Y., Kameoka H.: Insecticidal alkaloids from *Corydalis bulbosa* against *Drosophila melanogaster*. *J. Agric. Food Chem.* 1998, 46, 1914–1919.
- ⁹⁸ Hai-Tao X., Jiao P., Yan L., Jie Y., Xue B., Xiao-Yan H., Fu-Mei Y., Qian-Yun S.: Acetylcholinesterase inhibitors from *Corydalis yanhusuo*. *Nat. Prod. Res.* 2011, 25, 1418–1422.
- ⁹⁹ Hung T. M., Thuong P. T., Nhan N. T., Mai N. T. T., Quan T. L., Choi J. S., Woo M. H., Min B. S., Bae K.: Cholinesterase inhibitory activities of alkaloids from *Corydalis tuber*. *Nat. Prod. Sci.* 2011, 17, 108–112.
- ¹⁰⁰ Hung T. M., Na M. K., Dat N. T., Ngoc T. M., Joung U., Kim H. J., Min B. S., Lee J. P., Bae K. H.: Cholinesterase inhibitory and anti-amnesic activity of alkaloids from *Corydalis turtschaninovii*. *J. Ethnopharmacol.* 2008, 119, 74–80.
- ¹⁰¹ Kim D. K.: Inhibitory effect of corynoline isolated from the aerial parts of *Corydalis incisa* on the acetylcholinesterase. *Arch. Pharmacol Res.* 2002, 25, 817–819.
- ¹⁰² Chlebek J., Macáková K., Cahlíková L., Kurfürst M., Kuneš J., Opletal L.: Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory compounds from *Corydalis cava* (Fumariaceae). *Nat. Prod. Commun.* 2011, 6, 607–610.
- ¹⁰³ Sener B., Orhan I.: Molecular diversity in the bioactive compounds from turkish plants evaluation of acetylcholinesterase inhibitory activity of *Fumaria* species. *J. Chem. Soc. Pak.* 2004, 26, 313–315; Chem. Abstr. 142, 151897 (2004).
- ¹⁰⁴ Mroue M. A., Euler K. L., Ghuman M. A., Maktoob A.: Indole alkaloids of *Haplophyton crooksii*. *J. Nat. Prod.* 1996, 59, 890–893.
- ¹⁰⁵ Seidl C., Correia B. L., Stinghen A. E. M., Santos C. A. M.: Acetylcholinesterase inhibitory activity of uleine from *Himatanthus lancifolius*. *J. Biosci.* 2010, 65, 440–444.
- ¹⁰⁶ Zha-Jun Z., Qi Y., Zhan-Li W., Wei-Guang S.: Indole alkaloids from *Ervatamia hainanensis* with potent acetylcholinesterase inhibition activities. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2010, 20, 6185–6187.
- ¹⁰⁷ Alper K., Reith M. E. A., Sershen H.: Ibogaine and the inhibition of acetylcholinesterase. *J. Ethnopharmacol.* 2012, 139, 879–882.
- ¹⁰⁸ Ingkaninan K., Changwijit K., Suwanborirux K.: Vobasinyl-iboga bisindole alkaloids, potent acetylcholinesterase inhibitors from *Tabernaemontana divaricata* root. *J. Pharm. Pharmacol.* 2006, 58, 847–852.
- ¹⁰⁹ Pereira D. M., Ferreres F., Oliveira J. M., Gaspar L., Faria J., Valentão P., Sottomayor M., Andrade P. B.: Pharmacological effects of *Catharanthus roseus* root alkaloids in ace-

tylcholinesterase inhibition and cholinergic neurotransmission. *Phytomedicine* 2010, 17, 646–652.

¹¹⁰ Satheeshkumar N., Mukherjee P. K., Bhadra S., Saha B. P.: Acetylcholinesterase enzyme inhibitory potential of standardized extract of *Trigonella foenum graecum* L. and its constituents. *Phytomedicine* 2010, 17, 292–295.

¹¹¹ Tang X. C., Han Y. F.: Pharmacological profile of huperzine A, a novel acetylcholinesterase inhibitor from chinese herb. *CNS Drug Rev.* 1999, 5, 281–300.

¹¹² Xu-Chang H., Song F., Zhi-Fei W., Yufang S., Suxin Z., Yu X., Hualiang J., Xi-Can T., Donglu B.: Study on dual-site inhibitors of acetylcholinesterase: Highly potent derivatives of bis- and bifunctional huperzine B. *Bioorg. Med. Chem.* 2007, 15, 1394–1408.

¹¹³ Ma X., Gang D. R.: The Lycopodium alkaloids. *Nat. Prod. Rep.* 2004, 21, 752–772.

¹¹⁴ Ferheen S., Ahmed E., Afza N., Malik A., Shah M. R., Nawaz S. A., Choudhary M. I.: Haloxylines A and B, antifungal and cholinesterase inhibiting piperidine alkaloids from *Haloxylon salicornicum*. *Chem. Pharm. Bull.* 2005, 53, 570–572.

¹¹⁵ Atta-Ur-Rahman, Akhtar M. N., Choudhary M. I., Tsuda Y., Sener B., Khalid A., Parvez M.: New steroidal alkaloids from *Fritillaria imperialis* and their cholinesterase inhibiting activities. *Chem. Pharm. Bull.* 2002, 50, 1013–1016.

¹¹⁶ Hirasawa Y., Morita H., Shiro M., Kobayashi J.: Sieboldine A, a novel tetracyclic alkaloid from *Lycopodium sieboldii*, inhibiting acetylcholinesterase. *Org. Lett.* 2003, 5, 3991–3993.

¹¹⁷ Choo C. Y., Hirasawa Y., Karimata C., Koyama K., Sekiguchi M., Kobayashi J., Morita H.: Carinatumins A-C, new alkaloids from *Lycopodium carinatum* inhibiting acetylcholinesterase. *Bioorg. Med. Chem.* 2007, 15, 1703–1707.

¹¹⁸ Halldorsdottir E. S., Jaroszewski J. W., Olafsdottir E. S.: Acetylcholinesterase inhibitory activity of lycopodane-type alkaloids from the icelandic *Lycopodium annotinum* ssp. *alpestre*. *Phytochemistry* 2010, 71, 149–157.

¹¹⁹ Katakawa K., Nozoe A., Kogure N., Kitajima M., Hosokawa M., Hiromitsu T.: Facettimine-related alkaloids from *Lycopodium serratum*. *J. Nat. Prod.* 2007, 70, 1024–1028.

¹²⁰ Hirasawa Y., Kobayashi J., Morita H.: Lycoperine A, a novel C27N3-type pentacyclic alkaloid from *Lycopodium hamiltonii*, inhibiting acetylcholinesterase. *Org. Lett.* 2006, 8, 123–126.

¹²¹ Koyama K., Hirasawa Y., Kobayashi J., Morita H.: Cryptadines A and B, novel C27N3-type pentacyclic alkaloids from *Lycopodium cryptomerinum*. *Bioorg. Med. Chem.* 2007, 15, 7803–7808.

¹²² Rollinger J. M., Schuster D., Baier E., Ellmerer E. P., Langer T., Stuppner H.: Taspine: bioactivity-guided isolation and molecular ligand-target insight of a potent acetylcholinesterase inhibitor from *Magnolia x soulangiana*. *J. Nat. Prod.* 2006, 69, 1341–1346.

¹²³ Ogino T., Yamaguchi T., Sato T., Sasaki H., Sugama K., Okada M., Maruno M.: Studies on inhibitory activity against acetylcholinesterase of new bisbenzylisoquinoline alkaloid and its related compounds. *Heterocycles* 1997, 45, 2253–2260.

¹²⁴ Ingkaninan K., Phengpa P., Yuenyongsawad S., Khorana N.: Acetylcholinesterase inhibitors from *Stephania venosa* tuber. *J. Pharm. Pharmacol.* 2006, 58, 695–700.

-
- ¹²⁵ Murebwayire S., Ingkaninan K., Kanokwan C., Frederich M., Duez P.: *Triclisia sacleuxii* (Pierre) Diels (Menispermaceae), a potential source of acetylcholinesterase inhibitors. *J. Pharm. Pharmacol.* 2009, *61*, 103–107.
- ¹²⁶ Atta-ur-Rahman, Fatima N., Akhtar F., Choudhary M. I., Khalid A.: New Norditerpenoid alkaloids from *Aconitum falconeri*. *J. Nat. Prod.* 2000, *63*, 1393–1395.
- ¹²⁷ Jung H. A., Min B. S., Yokozawa T., Lee J. H., Kim Y. S., Choi J. S.: Anti-Alzheimer and antioxidant activities of coptidis Rhizoma alkaloids. *Biol. Pharm. Bull.* 2009, *32*, 1433–1438.
- ¹²⁸ Shigeta K., Ootaki K., Tatemoto H., Nakanishi T., Inada A., Muto N.: Potentiation of nerve growth factor-induced neurite outgrowth in PC12 cells by a Coptidis Rhizoma extract and protoberberine alkaloids. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2002, *66*, 2491–2494.
- ¹²⁹ Cardoso C. L., Castro-Gamboa I., Silva D. H. S., Furlan M., Epifanio R. A., Pinto A. C., Rezende C. M., Lima J. A., Bolzani V. S.: Indole glucoalkaloids from *Chimarris turbinata* and their evaluation as antioxidant agents and acetylcholinesterase inhibitors. *J. Nat. Prod.* 2004, *67*, 1882–1885.
- ¹³⁰ Park C. H., Kim S. H., Choi W., Lee Y. L., Kim J. S., Kang S. S., Suh Y. H.: Novel anticholinesterase and anti-amnesic activities of dehydroevodiamine, a constituent of *Evo-dia rutaecarpa*. *Planta Med.* 1996, *62*, 405–409.
- ¹³¹ Decke, M.: Novel inhibitors of acetyl- and butyrylcholinesterase derived from the alkaloids dehydroevodiamine and rutaecarpine. *Eur. J. Med. Chem.* 2005, *40*, 305–313.
- ¹³² Cardoso-Lopes E. M., Maier J. A., da Silva M. R., Regasini L. O., Simote S. Y., Lopes N. P., Pirani J. R., Bolzani V. S., Young M. C.: Alkaloids from stems of *Esenbeckia leiocarpa* Engl. (Rutaceae) as potential treatment for Alzheimer disease. *Molecules* 2010, *15*, 9205–9213.
- ¹³³ Atta-ur-Rahman, Khalid A., Sultana N., Ghayur M. N., Mesaik M. A., Khan M. R., Gilani A. H., Choudhary M. I.: New natural cholinesterase inhibiting and calcium channel blocking quinoline alkaloids. *J. Enzym. Inhib. Med. Chem.* 2006, *21*, 703–710.
- ¹³⁴ McGehee D. S., Krasowski M. D., Fung D. L., Wilson B., Gronert G. A., Moos J.: Cholinesterase inhibition by potato glycoalkaloids slows mivacurium metabolism. *Anesthesiology* 2000; *93*, 510–519.
- ¹³⁵ Ryan M. F., Byrne O.: Plant-insect coevolution and inhibition of acetylcholinesterase. *J. Chem. Ecol.* 1988, *14*, 1965–1975.
- ¹³⁶ Perry E. K., Pickering A. T., Wang W. W., Houghton P. J., Perry N. S. L.: Medicinal plants and Alzheimer's disease: Integrating ethnobotanical and contemporary scientific evidence. *J. Alt. Complement. Med.* 1998, *4*, 419–428.
- ¹³⁷ Mukherjee P. K., Kumar V., Mal M., Houghton P. J.: *In vitro* acetylcholinesterase inhibitory activity of the essential oil from *Acorus calamus* and its main constituents. *Planta Med.* 2007, *73*, 283–285.
- ¹³⁸ Perry N. S., Houghton P. J., Theobald A., Jenner P., Perry E. K.: In-vitro inhibition of human erythrocyte acetylcholinesterase by *Salvia lavandulaefolia* essential oil and constituent terpenes. *J. Pharm. Pharmacol.* 2000, *52*, 895–902.

-
- ¹³⁹ Miyazawa M., Watanabe H., Umemoto K., Kameoka, H.: Inhibition of acetylcholinesterase activity by essential oils of *Mentha* species. *J. Agric. Food Chem.* 1998, *46*, 3431–3434.
- ¹⁴⁰ Aazza S., Lyoussi B., Miguel M. G.: Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of some commercial essential oils and their major compounds. *Molecules* 2011, *16*, 7672–7690.
- ¹⁴¹ Savelev S. U., Okello E. J., Perry E. K.: Butyryl- and acetylcholinesterase inhibitory activities in essential oils of *Salvia* species and their constituents. *Phytother. Res.* 2004, *18*, 315–324.
- ¹⁴² Miyazawa M., Yamafuji C.: Inhibition of acetylcholinesterase activity by tea tree oil and constituent terpenoids. *Flav. Fragr.* 2006, *21*, 198–201.
- ¹⁴³ Keane S., Ryan M. F.: Purification, characterization and inhibition by monoterpenes of acetylcholinesterase from the wax moth, *Galleria mellonella* (L.). *Insect Biochem. Mol. Biol.* 1999, *29*, 1097–1104.
- ¹⁴⁴ Miyazawa M., Watanabe H., Kameoka H.: Inhibition of acetylcholinesterase activity by monoterpenoids with a *p*-menthane skeleton. *J. Agric. Food Chem.* 1997, *45*, 677–679.
- ¹⁴⁵ Mills C., Cleary B. J., Gilmer J. F., Walsh J. J.: Inhibition of acetylcholinesterase by Tea Tree oil. *J Pharm. Pharmacol.* 2004, *56*, 375–379.
- ¹⁴⁶ Perry N., Court G., Bidet N., Court J., Perry E.: European herbs with cholinergic activities: potential in demetia therapy. *Int. J. Geriatr. Psychiatry* 1996, *11*, 1063–1069.
- ¹⁴⁷ Rasoamiaranjanahary L., Guilet D., Marston A., Randimbivololona F., Hostettmann K.: Antifungal isopimaranes from *Hypoestes serpens*. *Phytochemistry* 2003, *64*, 543–548.
- ¹⁴⁸ Cavin A. L., Hay A. E., Marston A., Stoeckli-Evans H., Scopelliti R., Diallo D., Hostettmann K.: Bioactive diterpenes from the fruits of *Detarium microcarpum*. *J. Nat. Prod.* 2006, *69*, 768–773.
- ¹⁴⁹ Eldeen I. M. S., van Heerden F. R., van Staden J.: *In vitro* biological activities of niloticane, a new bioactive cassane diterpene from the bark of *Acacia nilotica* subsp. *kraussiana*. *J. Ethnopharmacol.* 2010, *128*, 555–560.
- ¹⁵⁰ Ren Y., Houghton P. J., Hider R. C., Howes M. J.: Novel diterpenoid acetylcholinesterase inhibitors from *Salvia miltiorrhiza*. *Planta Med.* 2004, *70*, 201–204.
- ¹⁵¹ Thirugnanasampandan R., Jayakumar R., Bai V., Narmatha M., Ebenezar P., Rajendra K. J.: Antiacetylcholinesterase and antioxidant ent-kaurane diterpenoid, melissoidesin from *Isodon wightii* (Benth) H. Hara. *Nat. Prod. Res.* 2008, *22*, 681–688.
- ¹⁵² Riaz N., Nawaz S. A., Mukhtar N., Malik A., Afza N., Ali S., Ullah S., Muhammad P., Choudhary M. I.: Isolation and enzyme-inhibition studies of the chemical constituents from *Ajuga bracteosa*. *Chem. Biodivers.* 2007, *4*, 72–83.
- ¹⁵³ Topcu G., Ertas A., Ozturk M., Dincel D., Kilic T., Halfon B.: Ent-kaurane diterpenoids isolated from *Sideritis congesta*. *Phytochem. Lett.* 2011, *4*, 436–439.
- ¹⁵⁴ Ertaş A., Oztürk M., Boğa M., Topçu G.: Antioxidant and anticholinesterase activity evaluation of ent-kaurane diterpenoids from *Sideritis arguta*. *J. Nat. Prod.* 2009, *72*, 500–502.

-
- ¹⁵⁵ Hung T. M., Luan T. C., Vinh B. T., Cuong T. D., Min B. S.: Labdane-type diterpenoids from *Leonurus heterophyllus* and their cholinesterase inhibitory activity. *Phytother. Res.* 2011, 25, 611–614.
- ¹⁵⁶ Ahmad V. U., Khan A., Farooq U., Kousar F., Khan S. S., Nawaz S. A., Abbasi M. A., Choudhary M. I.: Three new cholinesterase-inhibiting cis-clerodane diterpenoids from *Otostegia limbata*. *Chem. Pharm. Bull.* 2005, 53, 378–381.
- ¹⁵⁷ Khan S. B., Malik A., Afza N., Jahan N., Haq A. U., Ahmed Z., Nawaz S. A., Choudhary M. I.: Enzyme inhibiting terpenoids from *Amberboa ramosa*. *Z. Naturforsch., B: Chem. Sci.* 2004, 59, 579–583.
- ¹⁵⁸ Facundo V. A., Rios K. A., Medeiros C. M., Militão J. S. L. T., Miranda A. L. P., de Epifanio R. A., Carvalho M. P., Andrade A. T., Pinto A. C., Rezende C. M.: Arjunolic acid in the ethanolic extract of *Combretum leprosum* root and its use as a potential multi-functional phytomedicine and drug for neurodegenerative disorders: Antiinflammatory and anticholinesterasic activities. *J. Braz. Chem. Soc.* 2005, 16, 1309–1312.
- ¹⁵⁹ Lee J. H., Lee K. T., Yang J. H., Baek N. I., Kim D. K.: Acetylcholinesterase inhibitors from the twigs of *Vaccinium oldhami* Miquel. *Arch. Pharmacol Res.* 2004, 27, 53–56.
- ¹⁶⁰ Mehmood S., Riaz N., Nawaz S. A., Afza N., Malik A., Choudhary M. I.: New butyrylcholinesterase inhibitory triterpenes from *Salvia santolinifolia*. *Arch. Pharmacol Res.* 2006, 29, 195–198.
- ¹⁶¹ Chung Y. K., Heo H. J., Kim E. K., Kim H. K., Huh T. L., Lim Y., Kim S. K., Shin D. H.: Inhibitory effect of ursolic acid purified from *Origanum majorana* L. on the acetylcholinesterase. *Mol. Cells* 2001, 11, 137–143.
- ¹⁶² Rollinger J. M., Ewelt J., Seger C., Sturm S., Ellmerer E. P., Stuppner H.: New insights into the acetylcholinesterase inhibitory activity of *Lycopodium clavatum*. *Planta Med.* 2005, 71, 1040–1043.
- ¹⁶³ Ahmed E., Nawaz S. A., Malik A., Choudhary M. I.: Isolation and cholinesterase-inhibition studies of sterols from *Haloxylon recurvum*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2006, 16, 573–580.
- ¹⁶⁴ Riaz N., Malik A., Aziz-ur-Rehman, Nawaz S. A., Muhammad P., Choudhary M. I.: Cholinesterase-inhibiting withanolides from *Ajuga bracteosa*. *Chem. Biodivers.* 2004, 1, 1289–1295.
- ¹⁶⁵ Lee B., Jung K., Kim D. H.: Timosaponin AIII, a saponin isolated from *Anemarrhena asphodeloides*, ameliorates learning and memory deficits in mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2009, 93, 121–127.
- ¹⁶⁶ Choudhar, M. I., Yousuf S., Nawaz S. A., Ahmed S.: Cholinesterase inhibiting withanolides from *Withania somnifera*. *Chem. Pharm. Bull.* 2004, 52, 1358–1361.
- ¹⁶⁷ Conforti F., Rigano D., Formisano C., Bruno M., Loizzo M. R., Menichini F., Senatore F.: Metabolite profile and in vitro activities of *Phagnalon saxatile* (L.) Cass. relevant to treatment of Alzheimer's disease. *J. Enzym. Inhib. Med. Chem.* 2010, 25, 97–104.
- ¹⁶⁸ Ahmad I., Anis I., Malik A., Nawaz S. A., Choudhary M. I.: Cholinesterase inhibitory constituents from *Onosma hispida*. *Chem. Pharm. Bull.* 2003, 51, 412–414.

-
- ¹⁶⁹ Fan P., Hay A. E., Marston A., Hostettmann K.: Acetylcholinesterase inhibitory activity of linarin from *Buddleja davidii*, structure-activity relationships of related flavonoids, and chemical investigation of *Buddleja nitida*. *Pharm. Biol.* 2008, *46*, 596–601.
- ¹⁷⁰ Hacıbekiroğlu I., Kolak U.: Antioxidant and anticholinesterase constituents from the petroleum ether and chloroform extracts of *Iris suaveolens*. *Phytother. Res.* 2011, *25*, 522–529.
- ¹⁷¹ Oinonen P. P., Jokela J. K., Hatakka A. I., Vuorela P. M.: Linarin, a selective acetylcholinesterase inhibitor from *Mentha arvensis*. *Fitoterapia* 2006, *77*, 429–434.
- ¹⁷² Atia-tun-Noor, Fatima I., Ahmad I., Malik A., Afza N., Iqbal L., Latif M., Khan S. B.: Leufoflins A and B, potent butyrylcholinesterase-inhibiting flavonoid glucosides from *Leucas urticifolia*. *Molecules* 2007, *12*, 1447–1454.
- ¹⁷³ Kolak U., Hacıbekiroğlu I., Öztürk M., Özgökçe F., Topçu G., Ulubelen A.: Antioxidant and anticholinesterase constituents of *Salvia pocolata*. *Turk. J. Chem.* 2009, *33*, 813–823.
- ¹⁷⁴ Orhan I., Senol F. S., Kartal M., Dvorská M., Zemlicka M., Smejkal K., Mokry P.: Cholinesterase inhibitory effects of the extracts and compounds of *Maclura pomifera* (Rafin.) Schneider. *Food Chem. Toxicol.* 2009, *47*, 1747–1751.
- ¹⁷⁵ Kim J. Y., Lee W. S., Kim Y. S., Curtis-Long M. J., Lee B. W., Ryu Y. B., Park K. H.: Isolation of cholinesterase-inhibiting flavonoids from *Morus lhou*. *J. Agric. Food Chem.* 2011, *59*, 4589–4596.
- ¹⁷⁶ Min B. S., Cuong T. D., Lee J. S., Shin B. S., Woo M. H., Hung T. M.: Cholinesterase inhibitors from *Cleistocalyx operculatus* buds. *Arch. Pharmacol Res.* 2010, *33*, 1665–1670.
- ¹⁷⁷ Khan M. T. H., Orhan I., Senol F. S., Kartal M., Sener B., Dvorska M., Smejkal K., Slapetova T.: Cholinesterase inhibitory activities of some flavonoid derivatives and chosen xanthone and their molecular docking studies. *Chem. Biol. Interact.* 2009, *181*, 383–389.
- ¹⁷⁸ Jung M., Park M.: Acetylcholinesterase inhibition by flavonoids from *Agrimonia pilosa*. *Molecules* 2007, *12*, 2130–2139.
- ¹⁷⁹ Heo H. J., Kim M. J., Lee J. M., Choi S. J., Cho H. Y., Hong B., Kim H. K., Kim E., Shin D. H.: Naringenin from *Citrus junos* has an inhibitory effect on acetylcholinesterase and a mitigating effect on amnesia. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* 2004, *17*, 151–157.
- ¹⁸⁰ Loizzo M. R., Tundis R., Menichini F., Bonesi M., Statti G. A., Deguin B., Tillequin F., Menichini F., Houghton P. J.: Acetylcholinesterase inhibition by extracts and isolated flavones from *Linaria reflexa* Desf. (Scrophulariaceae) *Nat. Prod. Commun.* 2007, *2*, 759.
- ¹⁸¹ Ahmad V. U., Iqbal S., Nawaz S. A., Choudhary M. I., Farooq U., Ali S. T., Ahmad A., Bader S., Kousar F., Arshad S., Tareen R. B.: Isolation of four new pterocarpanes from *Zygophyllum eurypterum* (syn. *Z. atriplicoides*) with enzyme-inhibition properties. *Chem. Biodivers.* 2006, *3*, 996–1003.
- ¹⁸² Orhan I., Kartal M., Tosun F., Sener B.: Screening of various phenolic acids and flavonoid derivatives for their anticholinesterase potential. *Z. Naturforsch. C, Biosci.* 2007, *62*, 829–832.

-
- ¹⁸³ Katalinić M., Rusak G., Domaćinović B. J., Sinko G., Jelić D., Antolović R., Kovarik Z.: Structural aspects of flavonoids as inhibitors of human butyrylcholinesterase. *Eur. J. Med. Chem.* 2010, *45*, 186–192.
- ¹⁸⁴ Kang S. Y., Lee K. Y., Sung S. H., Park M. J., Kim Y. C.: Coumarins isolated from *Angelica gigas* inhibit acetylcholinesterase: structure-activity relationships. *J. Nat. Prod.* 2001, *64*, 683–685.
- ¹⁸⁵ Miyazawa M., Tsukamoto T., Anzai J., Ishikawa Y.: Insecticidal effect of phthalides and furanocoumarins from *Angelica acutiloba* against *Drosophila melanogaster*. *J. Agric. Food Chem.* 2004, *52*, 4401–4405.
- ¹⁸⁶ Kim D. K., Lim J. P., Yang J. H., Eom D. O., Eun J. S., Leem K. H.: Acetylcholinesterase inhibitors from the roots of *Angelica dahurica*. *Arch. Pharmacol Res.* 2002, *25*, 856–859.
- ¹⁸⁷ Senol F. S., Wozniak K. S., Khan M. T. H., Orhan I. E., Sener B., Głowniak K.: An in vitro and in silico approach to cholinesterase inhibitory and antioxidant effects of the methanol extract, furanocoumarin fraction, and major coumarins of *Angelica officinalis* L. fruits. *Phytochem. Lett.* 2011, *4*, 462–467.
- ¹⁸⁸ Choudhary M. I., Khalid A., Sultani S. Z., Atta-ur-Rahman.: A new coumarin from *Murraya paniculata*. *Planta Med.* 2002, *68*, 81–83.
- ¹⁸⁹ Rollinger J. M., Hornick A., Langer T., Stuppner H., Prast H.: Acetylcholinesterase inhibitory activity of scopolin and scopoletin discovered by virtual screening of natural products. *J. Med. Chem.* 2004, *47*, 6248–6254.
- ¹⁹⁰ Kim D. K., Lee K.: Inhibitory effect of *trans-N-p*-coumaroyl tyramine from the twigs of *Celtis chinensis* on the acetylcholinesterase. *Arch. Pharmacol Res.* 2003, *26*, 735–738.
- ¹⁹¹ Louh G. N., Lannang A. M., Mbazoa C. D., Tangmouo J. G., Komguem J., Castilho P., Ngninzeko F. N., Qamar N., Lontsi D., Choudhary M. I., Sondengam B. L.: Polyanxanthone A, B and C, three xanthenes from the wood trunk of *Garcinia polyantha* Oliv. *Phytochemistry* 2008, *69*, 1013–1017.
- ¹⁹² Lenta B. N., Vonthron-Sénécheau C., Weniger B., Devkota K. P., Ngoupayo J., Kaiser M., Naz Q., Choudhary M. I., Tsamo E., Sewald N.: Leishmanicidal and cholinesterase inhibiting activities of phenolic compounds from *Allanblackia monticola* and *Symphonia globulifera*. *Molecules* 2007, *12*, 1548–1557.
- ¹⁹³ Urbain A., Marston A., Queiroz E. F., Ndjoko K., Hostettmann K.: Xanthenes from *Gentiana campestris* as new acetylcholinesterase inhibitors. *Planta Med.* 2004, *70*, 1011–1014.
- ¹⁹⁴ El-Hassan A., El-Sayed M., Hamed A. I., Rhee I. K., Ahmed A. A., Zeller K. P., Verpoorte R.: Bioactive constituents of *Leptadenia arborea*. *Fitoterapia* 2003, *74*, 184–187.
- ¹⁹⁵ Lee Y. K., Yuk D. Y., Kim T. I., Kim Y. H., Kim K. T., Kim K. H., Lee B. J., Nam S. Y., Hong J. T.: Protective effect of the ethanol extract of *Magnolia officinalis* and 4-*O*-methylhonokiol on scopolamine-induced memory impairment and the inhibition of acetylcholinesterase activity. *J. Nat. Med.* 2009, *63*, 274–282.
- ¹⁹⁶ Kim D. H., Hung T. M., Bae K. H., Jung J. W., Lee S., Yoon B. H., Cheong J. H., Ko K. H., Ryu J. H.: Gomisins A improves scopolamine-induced memory impairment in mice. *Eur. J. Pharmacol.* 2006, *542*, 129–135.

-
- ¹⁹⁷ Hung T. M., Na M., Min B. S., Ngoc T. M., Lee I., Zhang X., Bae K.: Acetylcholinesterase inhibitory effect of lignans isolated from *Schizandra chinensis*. *Arch. Pharmacol Res.* 2007, 30, 685–690.
- ¹⁹⁸ Azhar-Ul-Haq, Malik A., Anis I., Khan S. B., Ahmed E., Ahmed Z., Nawaz S. A., Choudhary M. I.: Enzyme inhibiting lignans from *Vitex negundo*. *Chem. Pharm. Bull.* 2004, 52, 1269–1272.
- ¹⁹⁹ Kumar P., Singh V. K., Singh D. K.: Kinetics of enzyme inhibition by active molluscicidal agents ferulic acid, umbelliferone, eugenol and limonene in the nervous tissue of snail *Lymnaea acuminata*. *Phytother. Res.* 2009, 23, 172–177.
- ²⁰⁰ Ge H. M., Zhu C. H., Shi da H., Zhang L. D., Xie D. Q., Yang J., Ng S. W., Tan R. X.: Hopeahainol A: an acetylcholinesterase inhibitor from *Hopea hainanensis*. *Chemistry* 2008, 14, 376–381.
- ²⁰¹ Sung S. H., Kang S. Y., Lee K. Y., Park M. J., Kim J. H., Park J. H., Kim Y. C., Kim J., Kim Y. C.: (+)- α -viniferin, a stilbene trimer from *Caragana chamlague*, inhibits acetylcholinesterase. *Biol. Pharm. Bull.* 2002, 25, 125–127.
- ²⁰² Okello E. J., Savelev S. U., Perry E. K.: In vitro anti-beta-secretase and dual anti-cholinesterase activities of *Camellia sinensis* L. (tea) relevant to treatment of dementia. *Phytother. Res.* 2004, 18, 624–627.
- ²⁰³ Lee K. Y., Sung S. H., Kim Y. C.: New acetylcholinesterase-inhibitory pregnane glycosides of *Cynanchum atratum* roots. *Helv. Chim. Acta* 2003, 86, 474–483.
- ²⁰⁴ Ahmad V. U., Hussain J., Hussain H., Farooq U., Akber E., Nawaz S. A., Choudhary M. I.: Two ceramides from *Tanacetum artemisioides*. *Z. Naturforsch. B: Chem. Sci.* 2004, 59, 329–333.
- ²⁰⁵ Heo H. J., Hong S. C., Cho H. Y., Hong B., Kim H. K., Kim E. K., Shin D. H.: Inhibitory effect of zeatin, isolated from *Fiatoua villosa*, on acetylcholinesterase activity from PC12 cells. *Mol. Cells* 2002, 13, 113–117.
- ²⁰⁶ Vassar R., Kovacs D. M., Riqiang Y., Wong P. C.: The β -secretase enzyme BACE in health and Alzheimer's disease: regulation, cell biology, function, and therapeutic potential. *J. Neurosci.* 2009, 29, 12787–12794.
- ²⁰⁷ Eggert S., Paliga K., Soba P., Evin G., Masters C. L., Weidemann A., Beyreuther K.: The proteolytic processing of the amyloid precursor protein gene family members APLP-1 and APLP-2 involves alpha-, beta-, gamma-, and epsilon-like cleavages: modulation of APLP-1 processing by n-glycosylation. *J. Biol. Chem.* 2004, 279, 18146–18156.
- ²⁰⁸ Wong H. K., Sakurai T., Oyama F., Kaneko K., Wada K., Miyazaki H., Kurosawa M., De Strooper B., Saftig P., Nukina N.: beta Subunits of voltage-gated sodium channels are novel substrates of beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme (BACE1) and gamma-secretase. *J. Biol. Chem.* 2005, 280, 2300–23017.
- ²⁰⁹ Kim D. Y., Carey B. W., Wang H., Ingano L. A., Binshtok A. M., Wertz M. H., Pettingell W. H., He P., Lee V. M., Woolf C. J., Kovacs D. M.: BACE1 regulates voltage-gated sodium channels and neuronal activity. *Nat. Cell. Biol.* 2007, 9, 755–764.
- ²¹⁰ Von Armin C. A., Kinoshita A., Peltan I. D., Tangredi M. M., Herl L Lee B. M., Spoelgen R., Hshieh T. T., Ranganathan S., Battey F. D., Liu C. X., Bacskai B. J., Sever S., Irizary M. C., Strickland D. K., Hyman B. T.: The low density lipoprotein receptor-

related protein (LRP) is a novel beta-secretase (BACE1) substrate. *J. Biol. Chem.* 2005, 280, 17777–17785.

²¹¹ Lichtenhaler S. F., Dominiquez D. I., Westmeyer G. G., Reiss K., Haass C., Saftig P., De Strooper B., Seed B.: The cell adhesion protein P-selectin glycoprotein ligand-1 is a substrate for aspartyl protease BACE1. *J. Biol. Chem.* 2003, 278, 48713–48719.

²¹² Kitazume S., Tachida Y., Oka R., Shirotani K., Saido T. C., Hashimoto Y.: Alzheimer's beta-secretase, beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme, is responsible for cleavage secretion of a Golgi-resident sialyltransferase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2001, 98, 13554–13559.

²¹³ Kuhn P. H., Marjaux E., Imhof A., De Strooper B., Haass C., Lichtenthaler S. F.: Regulated intramembrane proteolysis of the interleukin-1 receptor II by alpha-, beta-, gamma-secretase. *J. Biol. Chem.* 2007, 282, 11982–11995.

²¹⁴ Selkoe D. J.: Translating cell biology into therapeutic advances in Alzheimer's disease. *Nature* 1999, 399, A23–A31.

²¹⁵ Sinha S., Lieberburg I.: Cellular mechanisms of beta-amyloid production and secretion. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1999, 96, 11049–11053.

²¹⁶ Wolfe S. M.: γ -Secretase inhibitors and modulators for Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* 2012, 120, 89–98.

²¹⁷ Cai H., Wang Y., McCarthy D., Wen H., Borchelt D. R., Price D. L., Wong P. C.: BACE1 is the major beta-secretase for generation of A β peptides by neurons. *Nat. Neurosci.* 2001, 4, 233–234.

²¹⁸ Willem M., Garratt A. N., Novak B., Citron M., Kaufmann S., Rittger A., De Strooper B., Saftig P., Birchmeier C., Haass C.: Control of peripheral nerve myelination by the beta-secretase BACE1. *Science* 2006, 314, 664–666.

²¹⁹ Kobayashi D., Zeller M., Cole T., Buttini M., McConlogue L., Sinha S., Freedman S., Morris R. G., Chen K. S.: BACE1 gene deletion: impact on behavioral function in a model of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 2008, 29, 861–873.

²²⁰ Hitt B. D., Jaramillo T. C., Chetkovich D. M. and Vassar R.: BACE1^{-/-} mice exhibit seizure activity that does not correlate with sodium channel level or axonal localization. *Mol. Neurodegen.* 2010, 5, 31–34.

²²¹ Hu X., Zhou X., He W., Yang J., Xiong W., Wong P., Wilson C. G., Yan R.: BACE1 deficiency causes altered neuronal activity and neurodegeneration. *J. Neurosci.* 2010, 30, 8819–8829.

²²² Dominguez D., Tournoy J., Hartmann D., Dieter H. T., Cryns K., Deforce S., Serneels L., Camacho I. E., Marjaux E., Craessaerts K.: Phenotypic and biochemical analyses of BACE1- and BACE2-deficient mice. *J. Biol. Chem.* 2005, 280, 30797–30806.

²²³ Wong L., HE X., Huang X., Chang W., Tang J.: Structural features of human memapsin 2 (β -secretase) and their biological and pathological implications. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* 2004, 36, 787–792; Chem. Abstr. 142, 369611 (2005).

²²⁴ Kornacker M. G., Lai Z., Witmer M., Ma J., Hendrick J., Lee V. G., Riexinger D. J., Mapelli C., Metzeler W., Copeland R. A.: An inhibitor binding pocket distinct from the catalytic active site on human β -APP cleaving enzyme. *Biochemistry* 2005, 44, 11567–11573.

-
- ²²⁵ Kornacker M. G., Copeland R. A., Hendrick J., Lai Z., Mapelli C., Witmer M. R., Marcinkeviciene J., Metzeler W., Lee V. G., Riexinger D. J.: Beta secretase exosite binding peptides and methods for identifying beta secretase modulators. PCT Int. Appl. WO 2004035606 A2 20040429; Chem. Abstr. 140, 370816 (2004).
- ²²⁶ Kennedy M. E., Wang W., Song L., Lee J., Zhang L., Wong G., Wang L., Parker E.: Measuring human beta-secretase (BACE1) activity using homogeneous time resolved fluorescence. *Anal. Biochem.* 2003, 319, 49–55.
- ²²⁷ Mancini F., De Simone A., Andrisano V.: Beta-secretase as a target for Alzheimer's disease drug discovery: an overview of in vitro methods for characterization of inhibitors. *Anal. Bioanal. Chem.* 2011, 400, 1979–1996.
- ²²⁸ Porcari V., Magnoni L., Terstappen G. C., Fecke W.: A continuous time-resolved fluorescence assay for identification of BACE1 inhibitors. *Assay Drug. Dev. Technol.* 2005, 3, 287–297.
- ²²⁹ Mancini F., Andrisano V.: Development of a liquid chromatographic system with fluorescent detection for β -secretase immobilized enzyme reactor on-line enzymatic studies. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2010, 52, 355–361.
- ²³⁰ Mancini F., Naldi M., Cavrini V., Andrisano V.: Multiwell fluorometric and colorimetric microassays for the evaluation of beta-secretase (BACE-1) inhibitors. *Anal. Bioanal. Chem.* 2007, 388, 1175–1183
- ²³¹ Christopheit T., Stenberg G., Gossas T., Nyström S., Baraznenok V., Lindström E., Danielson U. H.: A surface plasmon resonance-based biosensor with full-length BACE1 in a reconstituted membrane. *Anal. Biochem.* 2011, 414, 14–22.
- ²³² Marumoto S., Miayazawa M.: β -secretase inhibitory effects of furanocoumarins from the root of *Angelica dahurica*. *Phytother. Res.* 2010, 24, 510–513
- ²³³ Choi Y. H., Yon G. H., Hong K. S., Yoo D. S., Choi C. W., Park W. K., Kong J. Y., Kim Y. S., Ryu S. Y.: In vitro BACE-1 inhibitory phenolic components from the seeds of *Psoralea corylifolia*. *Planta Med.* 2008, 74, 1405–1408.
- ²³⁴ Zhu Z., Li C., Wang X., Yang Z., Chen J., Hu L., Jiang H., Shen X.: 2,2',4'-Trihydroxychalcone from *Glycyrrhiza glabra* as a new specific BACE1 inhibitor efficiently ameliorates memory impairment in mice. *J. Neurochemistry* 2010, 114, 374–385.
- ²³⁵ Choi S. H., Hur J. M., Yang E. J., Jun M., Park H. J., Lee K. B., Moon E., Song K. S.: β -Secretase (BACE1) inhibitors from *Perilla frutescens* var. *acuta*. *Arch. Pharmacol. Res.* 2008, 31, 183–187.
- ²³⁶ Cho J. K., Ryu Y. B., Curtis-Long M. J., Kim J. Y., Kim D., Lee S., Lee Woo S., Park, K. H.: Inhibition and structural reliability of prenylated flavones from the stem bark of *Morus lhou* on β -secretase (BACE-1). *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2011, 21, 2945–2948.
- ²³⁷ Lv J., Jia H., Jiang Y., Ruan Y., Liu Z., Yue W., Beyreuther K., Tu P., Zhang D.: Tenuifolin, an extract derived from tenuigenin, inhibits amyloid-beta secretion in vitro. *Acta Physiol.* 2009, 196, 419–425
- ²³⁸ Jia H., Jiang Y., Ruan Y., Zhang Y., Ma X., Zhang J., Beyreuther K., Tu, Penfei Z. D.: Tenuigenin treatment decreases secretion of the Alzheimer's disease amyloid β -protein in cultured cells. *Neurosci. Lett.* 2004, 367, 123–128.

- ²³⁹ Jeon S. Y., Kwon S. H., Seong Y. H., Bae K., Hur J. M., Lee Y. Y., Suh D. Y., Song K. S.: Beta-secretase (BACE1)-inhibiting stilbenoids from *Smilax Rhizoma*. *Phytomedicine* 2007, 14, 403–408.
- ²⁴⁰ Cheng X. R., Zhou J. W., Zhou Y., Cheng J. P., Yang R. F., Zhou W. X., Zhang Y., Yun L. H.: The green tea polyphenol (2)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG) is not a β -secretase inhibitor. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2012, 22, 1408–1414.
- ²⁴¹ Jeon S. Y., Bae K., Seong Y. H., Song K. S.: Green tea catechins as a BACE1 (beta-secretase) inhibitor. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2003, 13, 3905–3908.
- ²⁴² Choi Y. H., Yoo M. Y., Choi C. W., Cha M. R., Yon G. H., Kwon D. Y., Kim Y. S., Park W. K., Ryu S. Y.: A new specific BACE-1 inhibitor from the stem bark extract of *Vitis vinifera*. *Planta Med.* 2009; 75, 537–540.
- ²⁴³ von Bernhardi R., Eugenin J.: Alzheimer's disease: Redox dysregulation as a common denominator for diverse pathogenic mechanisms. *Antioxid. Red. Signal.* 2012, 16, 974 – 1031.
- ²⁴⁴ Reddy P. H., Tripathi R., Troung Q., Tirumala K., Reddy T. P., Anekonda V., Shirendeb U. P., Calkins M. J., Reddy A. P., Mao P.: Abnormal mitochondrial dynamics and synaptic degeneration as early events in Alzheimer's disease: Implications to mitochondria-targeted antioxidant therapeutics. *Biochim. Biophys. Acta, Mol. Basis Dis.* 2012, 1822, 639–649.
- ²⁴⁵ Choi D. Y., Lee Y. J., Hong J. T., Lee H. J.: Antioxidant properties of natural polyphenols and their therapeutic potentials for Alzheimer's disease. *Brain Res. Bull.* 2012, 87, 144–153.
- ²⁴⁶ Albarracín S. L., Stab B., Casas Z., Sutachan J. J., Samudio I., Gonzalez J., Gonzalo L., Capani F., Morales L., Barreto G. E.: Effects of natural antioxidants in neurodegenerative disease. *Nutr. Neurosci.* 2012, 15, 1–9.
- ²⁴⁷ Acosta M., Arnao M. B., Cano A.: An Adaptation for Measurement by HPLC, in: *Encyclopedia of Chromatography* (Cazes J., ed.), 2nd ed., str. 105-110, CRC Press, Boca Raton 2005.
- ²⁴⁸ Paulová H., Bochořáková H., Táborská E.: Metody stanovení antioxidantní aktivity přírodních látek in vitro. *Chem. Listy* 2004, 98, 174–179.
- ²⁴⁹ Jiráček R.: Současné trendy v biologické terapii Alzheimerovy choroby. *Psychiatrie pro praxi* 2006, 1, 8–11.
- ²⁵⁰ ---: *Corydalis cava*. Hohler Lerchensporn. Papaveraceae: <http://www.henriettesherbal.com/eclectic/madaus/corydalis.html>, staženo 5. června 2012.
- ²⁵¹ Hejny S., Slavík B.: *Květena ČSR*. 1. díl. Academia, Praha 1988.
- ²⁵² ---: Fumariaceae: <http://botanika.bf.jcu.cz/materials/fotogalerie-nahledy.php?family=Fumariaceae&name=Ranunculidae>, staženo 24. února 2012.
- ²⁵³ Souhthorn I. W., Buckingham J.: *Dictionary of Alkaloids*. Chapman and Hall, London 1989.
- ²⁵⁴ Coassini L. L., Poldini L.: Flower color and anthocyanidin pigments in some Italian flora species. *G. Botan. Ital.* 1978, 112, 327–336.

-
- ²⁵⁵ Xie C., Veitch N. C., Houghton P. J., Simmonds M. S. J.: Flavonoid glycosides and isoquinolinone alkaloids from *Corydalis bungeana*. *Phytochemistry* 2004, 65, 3041–3047.
- ²⁵⁶ Lu F., Xu X.: Chemical constituents of *Corydalis scaberula*. *Zhongcaoyao* 38, 990–991 (2007); Chem. Abstr. 150, 417777 (2008).
- ²⁵⁷ Wang Q. Z., Liang J. Y., Yuan Y.: Purification and identification of chemical constituents of *Corydalis saxicola*. *Zhongguo Tianran Yaowu* 2007, 5, 31–34; Chem. Abstr. 147, 78994 (2007).
- ²⁵⁸ Kim Y. A., Kong C. S., Yea S. S., Seo Y.: Constituents of *Corydalis heterocarpa* and their antiproliferative effects on human cancer cells. *Food Chem. Toxicol.* 2010, 48, 722–728.
- ²⁵⁹ Bai Z., Zhang J., Yang Y., Yao J., Wang Y.: Research of essential oil in *Corydalis straminea* Maxim. by GC-MS. *Xibei Zhiwu Xuebao* 2004, 24, 907–910; Chem. Abstr. 143, 393197 (2005).
- ²⁶⁰ Zhang J., Ma J., Yang Y., Yao J., Bai Z.: *Corydalis adunca* essential oil. *Lanzhou Daxue Xuebao, Ziran Kexueban* 2003, 39, 67–69; Chem. Abstr. 143, 382803 (2005).
- ²⁶¹ Halbsguth C., Meissner O., Haberlein H.: Positive cooperation of protoberberine type 2 alkaloids from *Corydalis cava* on the GABAA binding site. *Planta Med.* 2003, 69, 305–309.
- ²⁶² Gasic O., Popovic M., Dragutinovic A.: Alkaloids of *Corydalis cava* (L) Sch. and K. *Zbornik za Prirodne Nauke* 1985, 69, 99–106; Chem. Abstr. 106, 81572 (1987).
- ²⁶³ Meyer A., Imming P.: R(–)-Canadoline as first secoberberine alkaloid from *Corydalis cava*. *Phytochem. Lett.* 2008, 1, 168–170.
- ²⁶⁴ Trabert H., Schneidewind U.: Constituents of *Corydalis cava*. II. Seeds. *Pharm. Zentralh.* 1960, 99, 2–7.
- ²⁶⁵ Kroeber R. L.: *Das neuzeitliche Kräuterbuch*. Hippokrates-Verlag, Marquardt & Cie, Stuttgart 1938.
- ²⁶⁶ ---: Blaschek W., Ebel S., Hilgenfeldt U., Holzgrabe U., Reichling J., Schulz V (eds.): *Corydalis*. Hagerrom 2008, Hagers Enzyklopädie der Arzneistoffe und Drogen, Springer, Heilderberg 2008.
- ²⁶⁷ Heinz U. J.: *Handbuch der modernen Pflanzenheilkunde*. Verlag Hermann Bauer, Freiburg 1984.
- ²⁶⁸ Hao H., Quicheng F.: Chemical study on alkaloids from *Corydalis bulleyana*. *Planta Med.* 1986, 3, 193–198.
- ²⁶⁹ Cheng Z. H., Guo Y. I., Wang H. Y., Chen G. Q.: Qualitative and quantitative analysis of quaternary ammonium alkaloids from Rhizoma *Corydalis* by matrix-assisted laser desorption/ionization Fouriertransform mass spectrometry coupled with a selective precipitation reaction using Reinecke salt. *Anal. Chim. Acta* 2006, 555, 269–277.
- ²⁷⁰ Li Y., Wang S., Liu Y., Li Z., Yang X., Wang H., Wen Y., Chen Y.: Effect of α -allocryptopine on transient outward potassium current in rabbit ventricular myocytes. *Cardiology* 2008, 111, 229–236.
- ²⁷¹ Kardos J., Blasko G., Simonyi M.: Enhancement of γ -aminobutyric acid receptor binding by protopine-type alkaloids. *Arzneimittel-Forsch.* 1986, 36, 939–940.

-
- ²⁷² Zhao Y., Hellum B. H., Liang A., Nilsen O. G.: The in vitro inhibition of human CYP1A2, CYP2D6 and CYP3A4 by tetrahydropalmatine, neferine and berberine. *Phytother. Res.* 2012, 26, 277–283.
- ²⁷³ Qin Y., Pang J. Y., Chen W. H., Zhao Z. Z., Liu L., Jiang Z. H.: Inhibition of DNA topoisomerase I by natural and synthetic mono- and dimeric protoberberine alkaloids. *Chem. Biodivers.* 2007, 4, 481–487.
- ²⁷⁴ Meyerson L. R., McMurtrey K. D., Davis V. E.: Isoquinoline alkaloids. Inhibitory actions on cation-dependent ATP-phosphohydrolases. *Neurochem. Res.* 1978, 3, 239–257.
- ²⁷⁵ Tanabe H., Suzuki H., Nagatsu A., Mizukami H., Ogihara Y., Inoue M.: Selective inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation by coptisine isolated from *Coptis rhizoma*, one of the crude drugs composing Kampo medicines Unsei-in. *Phytomedicine* 2006, 13, 334–342.
- ²⁷⁶ Mahady G. B., Pendland S. L., Stoia A., Chadwick L. R.: In vitro susceptibility of *Helicobacter pylori* to isoquinoline alkaloids from *Sanguinaria canadensis* and *Hydrastis canadensis*. *Phytother. Res.* 2003, 17, 217–221.
- ²⁷⁷ Shigeta K., Ootaki K., Tatemoto H., Nakanishi T., Inada A., Muto N.: Potentiation of nerve growth factor-induced neurite outgrowth in PC12 cells by a coptidis rhizoma extract and protoberberine alkaloids. *Biosci. Biotech. Biochem.* 2002, 66, 2491–2494.
- ²⁷⁸ Grippa E., Valla R., Battinelli L., Mazzanti G., Saso L., Silvestrini B.: Inhibition of *Candida rugosa* lipase by berberine and structurally related alkaloids, evaluated by high-performance liquid chromatography. *Biosci. Biotech. Biochem.* 1999, 63, 1557–1562.
- ²⁷⁹ Kong W., Wei J., Abidi P., Lin M., Inaba S., Li C., Wang Y., Wang Z., Si S., Pan H.: Berberine is a novel cholesterol-lowering drug working through a unique mechanism distinct from statins. *Nat. Med.* 2004, 10, 1344–1351.
- ²⁸⁰ Wu M., Wang J., Liu L. T.: Advance of studies on anti-atherosclerosis mechanism of berberine. *Chin. J. Integr. Med.* 2010, 16, 188–192.
- ²⁸¹ Wang H. D., Lu D. X., Qi R. B.: Therapeutic strategies targeting the LPS signaling and cytokines. *Pathophysiology* 2009, 16, 291–296.
- ²⁸² Liu Y. Q., Cheng M. C., Wang L. X., Xiao H. B.: Rhizoma coptidis and berberine-induced activation of murine microglia N9 cells. *J. Ethnopharmacol.* 2010, 129, 121–126.
- ²⁸³ Rosenkranz V., Wink M.: Induction of apoptosis by alkaloids, non-protein amino acids, and cardiac glycosides in human promyelotic HL-60 cells. *Z. Naturforsch. C: J. Biosci.* 2007, 62, 458–466.
- ²⁸⁴ Asai M., Iwata N., Yoshikawa A., Aizaki Y., Ishiura S., Saido T. C., Maruyama K.: Berberine alters the processing of Alzheimer's amyloid precursor protein to decrease Aβ secretion. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007, 352, 498–502.
- ²⁸⁵ Hu Y., Chen X., Duan H., Hu Y., Mu X.: *Pulsatilla* decoction and its active ingredients inhibit secretion of NO, ET-1, TNF-α, and IL-1α in LPS-induced rat intestinal microvascular endothelial cells. *Cell. Biochem. Funct.* 2009, 27, 284–288.
- ²⁸⁶ Cicero A. F. G., Ertek S.: Berberine: metabolic and cardiovascular effects in preclinical and clinical trials. *Nutr. Diet. Suppl.* 2009, 1, 1–10.

-
- ²⁸⁷ Abdel-Haq H., Cometa M. F., Palmery M., Leone M. G., Silvestrini B., Saso L.: Relaxant effects of *Hydrastis canadensis* L. and its major alkaloids on guinea pig isolated trachea. *Pharm. Toxicol.* 2000, 87, 218–222.
- ²⁸⁸ Walterova D., Kovar J., Preininger V., Simanek, V.: Isolation and chemistry of the alkaloids from some plants of the genus *Papaver*. LXXXII. Interaction between horse liver alcohol dehydrogenase and aporphine alkaloids. *Coll. Czech. Chem. Commun.* 1982, 47, 296–303.
- ²⁸⁹ Ubeda A., Montesinos C., Payá M., Terencio C., Alcaraz M. J.: Antioxidant action of benzylisoquinoline alkaloids. *Free Rad. Res. Commun.* 1993, 18, 167–175.
- ²⁹⁰ Zetler G.: Neuroleptic-like, anticonvulsant and antinociceptive effects of aporphine alkaloids: bulbocapnine, corytuberine, boldine and glaucine. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* 1988, 296, 255–281.
- ²⁹¹ Tadaki Nozaka T., Yamada S., Ishino M., Morimoto I., Tanaka A., Kunitomo J.: Clastogenicity of aporphine alkaloids in vitro. *J. Pharmacobiodyn.* 1992, 15, 501–512.
- ²⁹² Schaus J. M., Titus R. D., Foreman M. M., Mason N. R., Truex L. L.: Aporphines as antagonists of dopamine D₁ receptors. *J. Med. Chem.* 1990, 33, 600–607.
- ²⁹³ Miller R. J., Kelly P. H., Neumeyer J. L.: Aporphines. 15. Action of aporphine alkaloids on dopaminergic mechanisms in rat brain. *Eur. J. Pharmacol.* 1976, 35, 77–83.
- ²⁹⁴ Shin J. S., Kim K. T., Lee M. K.: Inhibitory effects of bulbocapnine on dopamine biosynthesis in PC12 cells. *Neurosci. Lett.* 1998, 244, 161–164.
- ²⁹⁵ De Risio C., Marro F.: Effect of some neurotropic drugs on active sodium transport through the isolated skin of the frog. *Riv. Neurobiol.* 1962, 8, 268–272.
- ²⁹⁶ Feldberg W., Sherwood S. L.: Injections of bulbocapnine into the cerebral ventricles of cats. *Brit. J. Pharmacol. Chemother.* 1955, 10, 371–374.
- ²⁹⁷ Li H. L., Han T., Liu R. H., Zhang C., Chen H. S., Zhang W. D.: Alkaloids from *Corydalis saxicola* and their anti-hepatitis B virus activity. *Chem. Biodivers.* 2008, 5, 777–783.
- ²⁹⁸ Kubo M., Matsuda H., Tokuoka K., Kobayashi Y., Ma S., Tanaka T.: Studies of anti-cataract drugs from natural sources. I. Effects of a methanolic extract and the alkaloidal components from *Corydalis* tuber on in vitro aldose reductase activity. *Biol. Pharm. Bull.* 1994, 17, 458–459.
- ²⁹⁹ Kubo M., Matsuda H., Tokuoka K., Ma S., Shiomoto H.: Anti-inflammatory activities of methanolic extract and alkaloidal components from *Corydalis* tuber. *Biol. Pharm. Bull.* 1994, 17, 262–265.
- ³⁰⁰ Satou T., Akao N., Matsushashi R., Koike K., Fujita K., Nikaido T.: Inhibitory effect of isoquinoline alkaloids on movement of second-stage larvae of *Toxocara canis*. *Biol. Pharm. Bull.* 2002, 25, 1651–1654.
- ³⁰¹ Matsuda H., Tokuoka K., Wu J., Shiomoto H., Kubo M.: Inhibitory effects of dehydrocorydaline isolated from *Corydalis* Tuber against type I-IV allergic models. *Biol. Pharm. Bull.* 1997, 20, 431–434.
- ³⁰² De las Heras B., Rios J. L., Martinez-Mir I., Rubio E.: A study of the adrenergic activity of the alkaloids boldine and glaucine. *Pharmazie* 1990, 45, 443–444.

-
- ³⁰³ Hsu C. Y. H., Chen C. L.: Antimicrobial activities of aporphine alkaloids isolated from heartwood and discolored sapwood of *Liriodendron tulipifera*. *Holzforschung* 1991, 45, 325–331.
- ³⁰⁴ Hoet S., Stevigny C., Block S., Opperdoes F., Colson P., Baldeyrou B., Lansiaux A., Bailly C., Quetin-Leclercq J.: Alkaloids from *Cassytha filiformis* and related aporphines: antitrypanosomal activity, cytotoxicity, and interaction with DNA and topoisomerases. *Planta Med.* 2004, 70, 407–413.
- ³⁰⁵ Kondo Y., Imai Y., Hojo H., Endo T., Nozoe S.: Suppression of tumor cell growth and mitogen response by aporphine alkaloids, dicentrine, glaucine, corydine, and apomorphine. *J. Pharmacobiodyn.* 1990, 13, 426–431.
- ³⁰⁶ Cortijo J., Villagrasa V., Pons R., Berto L., Marti-Cabrera M., Martinez-Losa M., Domenech T., Beleta J., Morcillo E. J.: Bronchodilator and anti-inflammatory activities of glaucine: in vitro studies in human airway smooth muscle and polymorphonuclear leukocytes. *Brit. J. Pharmacol.* 1999, 127, 1641–1651.
- ³⁰⁷ Ivanovska N., Philipov S.: Immunosuppressive activity of isoquinoline alkaloids. *Pharm. Pharmacol. Lett.* 1996, 6, 79–81.
- ³⁰⁸ Cassels B. K., Asencio M., Conget P., Speisky H., Videla L. A., Lissi E. A.: Structure-antioxidative activity relationships in benzyloisoquinoline alkaloids. *Pharmacol. Res.* 1995, 31, 103–107.
- ³⁰⁹ Loza I., Orallo F., Verde I., Gil-Longo J., Cadavid I., Calleja J. M.: A study of glaucine-induced relaxation of rat aorta. *Planta Med.* 1993, 59, 229–231.
- ³¹⁰ Asencio M., Delaquerriere B., Cassels B. K., Speisky H., Comoy E., Protais P.: Biochemical and behavioral effects of boldine and glaucine on dopamine systems. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 1998, 62, 7–13.
- ³¹¹ Campos M., Loza I., Fernandez A. A.; Orallo F., Longo J., Calleja J. M.: Antiserotonergic activity of glaucine on rat vas deferens and aorta without endothelium. *Ars Pharm.* 1992, 33, 578–583.
- ³¹² Boustie J., Stigliani J. L., Montanha J., Amoros M., Payard M., Girre L.: Antipoliiovirus structure-activity relationships of some aporphine alkaloids. *J. Nat. Prod.* 1998, 61, 480–484.
- ³¹³ Feng T., Xu Y., Cai X. H., Du Z. Z., Luo X. D.: Antimicrobially active isoquinoline alkaloids from *Litsea cubeba*. *Planta Med.* 2009, 75, 76–79.
- ³¹⁴ Lemos V. S., Thomas G., Barbosa F. J. M.: Pharmacological studies on *Aristolochia papillaris* Mast. (Aristolochiaceae). *J. Ethnopharmacol.* 1993, 40, 141–145.
- ³¹⁵ Philipov S., Ivanovska N., Nikolova P.: Glaucine analogs as inhibitors of mouse splenocyte activity. *Pharmazie* 1998, 53, 694–698.
- ³¹⁶ Ivanovska N., Philipov S.: Comparative study on the immunological activity of a series of isoquinoline alkaloids. *Phytother. Res.* 1996, 10, 62–65.
- ³¹⁷ Ito C., Itoigawa M., Tokuda H., Kuchide M., Nishino H., Furukawa H.: Chemopreventive activity of isoquinoline alkaloids from *Corydalis* plants. *Planta Med.* 2001, 67, 473 – 475.

-
- ³¹⁸ Matsuda H., Shiimoto H., Naruto S., Namba K., Kubo M.: Antithrombic action of methanol extract and alkaloidal components from *Corydalis tuber*. *Planta Med.* 1988, *54*, 27–33.
- ³¹⁹ Liu S., Xing J., Zheng Z., Song F., Liu Z., Liu S.: Ultrahigh performance liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry inhibitors fishing assay: A novel method for simultaneously screening of xanthine oxidase inhibitor and superoxide anion scavenger in a single analysis. *Anal. Chim. Acta* 2012, *715*, 64–70.
- ³²⁰ Zhao F. R., Mao H. P., Zhang H., Hu L. M., Wang H., Wang Y. F., Yanagihara N., Gao X. M.: Antagonistic effects of two herbs in Zuojin Wan, a traditional chinese medicine formula, on catecholamine secretion in bovine adrenal medullary cells. *Phytomedicine* 2010, *17*, 659–668.
- ³²¹ Fu Y., Hu B., Tang Q., Fu Q., Xiang J.: Hypoglycemic activity of Jatrorrhizine. *J. Huazhong Univ. Sci. Technol., Med. Sci.* 2005, *25*, 491–493.
- ³²² Kong L. D., Cheng C. H. K., Tan R. X.: Monoamine oxidase inhibitors from rhizoma of *Coptis chinensis*. *Planta Med.* 2001, *67*, 74–76.
- ³²³ Luo T., Zhang H., Zhang W. W., Huang J. T., Song E. L., Chen S. G., He F., Xu J., Wang H. Q.: Neuroprotective effect of jatrorrhizine on hydrogen peroxide-induced cell injury and its potential mechanisms in PC12 cells. *Neurosci. Lett.* 2011, *498*, 227–231.
- ³²⁴ Virtanen P., Lassila V., Njimi T., Mengata D. E.: Natural protoberberine alkaloids from *Enantia chlorantha*, palmatine, columbamine and jatrorrhizine for thioacetamide-traumatized rat liver. *Acta Anatom.* 1988, *131*, 166–170.
- ³²⁵ Moody J. O., Hylands P. J., Bray D. H.: In vitro evaluation of *Enantia chlorantha* constituents and derivatives for antiplasmodial and anticandidal activity. *Pharm. Pharmacol. Lett.* 1995, *5*, 80–82.
- ³²⁶ Subeki M., Hideyuki T., Kosaku Y., Masahiro Y., Osamu M., Yoshimitsu K., Ken S., Mamoru T. C.: Antibabesial activity of protoberberine alkaloids and 20-hydroxyecdysone from *Arcangelisia flava* against *Babesia gibsoni* in culture. *J. Vet. Med. Sci.* 2005, *67*, 223–227.
- ³²⁷ Yan D., Xiao X. H., Jin C., Dong X. P.: Microcalorimetric investigation of the effect of berberine alkaloids from *Coptis chinensis* Franch on *Staphylococcus aureus* growth. *Sci. Chin., Ser. B: Chem.* 2008, *51*, 640–645; *Chem. Abstr.* *149*, 242112 (2008).
- ³²⁸ Nakatani M., Asai H., Mochihara K., Hase T.: Jatrorrhizine chloride and other constituents from *Fagara chalybea* Engl. *Kagoshima Daigaku Rigakubu Kiyo, Sugaku, Butsurigaku, Kagaku* 1990, *23*, 153–157; *Chem. Abstr.* *115*, 228433 (1991).
- ³²⁹ Kong W., Zhao Y., Xiao X., Jin C., Liu Y., Li Z.: Comparison of anti-bacterial activity of four kinds of alkaloids in rhizoma *coptidis* based on microcalorimetry. *Chin. J. Chem.* 2009, *27*, 1186–1190.
- ³³⁰ Yokozawa T., Satoh A., Cho E. J., Kashiwada Y., Ikeshiro Y.: Protective role of *Coptidis* rhizoma alkaloids against peroxynitrite-induced damage to renal tubular epithelial cells. *J. Pharm. Pharmacol.* 2005, *57*, 367–374.
- ³³¹ Parmar V. S., Bracke M. E., Philippe J., Wengel J., Jain S. C., Olsen C. E., Bisht K. S., Sharma N. K., Courtens A., Sharma S. K.: Anti-invasive activity of alkaloids and polyphenolics in vitro. *Bioorg. Med. Chem.* 1997, *5*, 1609–1619.

-
- ³³² Kim J. P., Jung M. Y., Kim J. P., Kim S. Y.: Antiphotooxidative activity of protoberberines derived from *Coptis japonica* Makino in the chlorophyll-sensitized photooxidation of oil. *J. Agric. Food Chem.* 2000, *48*, 1058–1063.
- ³³³ Brezova V., Dvoranova D., Kostalova D.: Oxygen activation by photoexcited protoberberinium alkaloids from *Mahonia aquifolium*. *Phytother. Res.* 2004, *18*, 640–646.
- ³³⁴ Chen W. H., Chan C. L., Cai Z., Luo G. A., Jiang Z. H.: Study on noncovalent complexes of cytotoxic protoberberine alkaloids with double-stranded DNA by using electro-spray ionization mass spectrometry. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2004, *14*, 4955–4959.
- ³³⁵ Yuan J. Y., Zhou J. Y., Hu Z. B., Ji G., Xie J. Q., Wu D. Z.: The effects of jatrorrhizine on contractile responses of rat ileum. *Eur. J. Pharmacol.* 2011, *663*, 74–79.
- ³³⁶ Scazzocchio F., Cometa M. F., Tomassini L., Palmery M.: Antibacterial activity of *Hydrastis canadensis* extract and its major isolated alkaloids. *Planta Med.* 2001, *67*, 561–564.
- ³³⁷ Palmery M., Cometa M. F., Leone M. G.: Further studies of the adrenolytic activity of the major alkaloids from *Hydrastis canadensis* L. on isolated rabbit aorta. *Phytother. Res.* 1996, *10*, 47–49.
- ³³⁸ Cometa M. F., Galeffi C., Palmery M.: Acute effect of alkaloids from *Hydrastis canadensis* L. on guinea pig ileum: structure-activity relationships. *Phytother. Res.* 1996, *10*, 56–58.
- ³³⁹ Liu X., Hu Z., Shi Q., Zeng H., Shen Y., Jin H., Zhang W.: Anti-inflammatory and anti-nociceptive activities of compounds from *Tinospora sagittata* (Oliv.) Gagnep. *Arch. Pharmacol Res.* 2010, *33*, 981–987.
- ³⁴⁰ Chen H. Y., Ye X. L., Cui X. L., He K., Jin Y. N., Chen Z., Li X. G.: Cytotoxicity and antihyperglycemic effect of minor constituents from Rhizoma *Coptis* in HepG2 cells. *Fitoterapia* 2012, *83*, 67–73.
- ³⁴¹ Lee M. K., Lee K. S., Kim H. S., Hong S. S., Ro J. S.: Inhibitory effects of coptisine on monoamine oxidase activity. *Nat. Prod. Sci.* 2000, *6*, 70–72.
- ³⁴² Jung H. A., Yoon N. Y., Bae H. J., Min B. S., Choi J. S.: Inhibitory activities of the alkaloids from *Coptidis* rhizoma against aldose reductase. *Arch. Pharmacol Res.* 2008, *31*, 1405–1412.
- ³⁴³ Hiller K. O., Ghorbani M., Schilcher H.: Antispasmodic and relaxant activity of chelidonine, protopine, coptisine, and *Chelidonium majus* extracts on isolated guinea pig ileum. *Planta Med.* 1998, *64*, 758–760.
- ³⁴⁴ Kong W. J., Zhao Y. L., Xiao X. H., Li Z. L., Jin C., Li H. B.: Investigation of the anti-fungal activity of coptisine on *Candida albicans* growth by microcalorimetry combined with principal component analysis. *J. Appl. Microbiol.* 2009, *107*, 1072–1080.
- ³⁴⁵ Kaminsky V. O., Lootsik M. D.; Stoika R. S.: Correlation of the cytotoxic activity of four different alkaloids, from *Chelidonium majus* (greater celandine), with their DNA intercalating properties and ability to induce breaks in the DNA of NK/Ly murine lymphoma cells. *Centr. Eur. J. Biol.* 2006, *1*, 2–15.
- ³⁴⁶ Hirano H., Tokuhira T., Yokoi T., Shingu T.: Gastric mucous membrane-protective principles of *Coptidis* rhizoma. *Nat. Med.* 1997, *51*, 516–518.

- ³⁴⁷ Suzuki H., Tanabe H., Mizukami H., Inoue M.: Selective regulation of multidrug resistance protein in vascular smooth muscle cells by the isoquinoline alkaloid coptisine. *Biol. Pharm. Bull.* 2010, *33*, 677–682.
- ³⁴⁸ Satou T., Koga M., Matsubara R., Koike K., Tada I., Nikaido T.: Assay of nematocidal activity of isoquinoline alkaloids using third-stage larvae of *Strongyloides ratti* and *S. venezuelensis*. *Vet. Parasitol.* 2002, *104*, 131–138.
- ³⁴⁹ Ogasawara M., Matsubara T., Suzuki H.: Screening of natural compounds for inhibitory activity on colon cancer cell migration. *Biol. Pharm. Bull.* 2001, *24*, 720–723.
- ³⁵⁰ Choi S. Y., Bang M. H., Lee E. J., Kwon O. S., Kang T. C., Lee Y. H., Rho Y. D., Baek N. I.: Human brain GABA-T (γ -aminobutyric acid transaminase) inhibitory alkaloids from *Corydalis tuber*. *Agric. Chem. Biotech.* 2003, *46*, 67–72.
- ³⁵¹ Weniger B., Aragon R., Deharo E., Bastida J., Codina C., Lobstein A., Anton R.: Antimalarial constituents from *Guatteria amplifolia*. *Pharmazie* 2000, *55*, 867–868.
- ³⁵² Goeren A. C., Zhou B. N., Kingston D. G. I.: Cytotoxic and DNA damaging activity of some aporphine alkaloids from *Stephania dinklagei*. *Planta Med.* 2003, *69*, 867–868.
- ³⁵³ Choi S. U., Baek N. I., Kim S. H., Yang J. H., Eun J. S., Shin T. Y., Lim J. P., Lee J. H., Jeon H., Yun M. Y.: Cytotoxic isoquinoline alkaloids from the aerial parts of *Corydalis incisa*. *Arch. Pharmacol Res.* 2007, *30*, 151–154.
- ³⁵⁴ Kamigauchi M., Noda Y., Nishijo J., Iwasaki K., Tobetto K., In Y., Tomoo K., Ishida T.: Cell adhesion inhibitory activity of (d)-corynoline, a hexahydrobenzo[c]phenanthridine-type alkaloid, and its structure-activity relationship, studied by X-ray crystal structure analysis and molecular docking study. *Bioorg. Med. Chem.* 2005, *13*, 1867–1872.
- ³⁵⁵ Wei H., Liu G.: Protective action of corynoline, acetylcorynoline and protopine against experimental liver injury in mice. *Yaoxue Xuebao* *32*, 331–336 (1997); *Chem. Abstr.* *128*, 57420 (1997).
- ³⁵⁶ Fang Z. Z., Zhang Y. Y., Ge G. B., Liang S. C., Sun D. X., Zhu L. L., Dong P. P., Cao Y. F., Yang L.: Identification of cytochrome P450 (CYP) isoforms involved in the metabolism of corynoline, and assessment of its herb-drug interactions. *Phytother. Res.* 2011, *25*, 256–263.
- ³⁵⁷ Haiyan L., Gaoping L., Wang J., Jingwen L.: Corydaline derivatives useful for reducing lipid levels. PCT Int. Appl. WO 2010075469 A1 20100701; *Chem. Abstr.* *153*, 145700 (2010).
- ³⁵⁸ Pavelka S., Kovar J.: Interaction of liver alcohol dehydrogenase with protoberberine alkaloids. *Coll. Czech. Chem. Commun.* 1975, *40*, 753–768.
- ³⁵⁹ Iwasa K., Nishiyama Y., Ichimaru M., Moriyasu M., Kim H. S., Wataya Y., Yamori T., Takashi T., Lee D. U.: Structure-activity relationships of quaternary protoberberine alkaloids having an antimalarial activity. *Eur. J. Med. Chem.* 1999, *34*, 1077–1083.
- ³⁶⁰ Zhang G. Q., Wang K. B.: Anticancer and phytochemical properties of alkaloids from *Caragana microphylla*. *Yaoxue Shijian Zazhi* *28*, 105–106 (2010); *Chem. Abstr.* *156*, 171059 (2010).

- ³⁶¹ Rackova L., Majekova M., Kostalova D., Stefek M.: Antiradical and antioxidant activities of alkaloids isolated from *Mahonia aquifolium*. Structural aspects. *Bioorg. Med. Chem.* 2004, 12, 4709–4715.
- ³⁶² Kupeli E., Kosar M., Yesilada E., Baser K., Husnu C.: A comparative study on the anti-inflammatory, antinociceptive and antipyretic effects of isoquinoline alkaloids from the roots of turkish *Berberis* species. *Life Sci.* 2002, 72, 645–657.
- ³⁶³ Mohamed S. M., Hassan E. M., Ibrahim N. A.: Cytotoxic and antiviral activities of aporphine alkaloids of *Magnolia grandiflora* L. *Nat. Prod. Res.* 2010, 24, 1395–1402.
- ³⁶⁴ Mori H., Fuchigami M., Inoue N., Nagai M., Koda A., Nishioka I.: Principle of the bark of *Phellodendron amurense* to suppress the cellular immune response. *Planta Med.* 1994, 60, 445–449.
- ³⁶⁵ Iwasa K., Moriyasu M., Yamori T., Turuo T., Lee D. U., Wiegrebbe W.: In vitro cytotoxicity of the protoberberine-type alkaloids. *J. Nat. Prod.* 2001, 64, 896–898.
- ³⁶⁶ Iwasa K., Kim H. S., Wataya Y., Lee D. U.: Antimalarial activity and structure-activity relationships of protoberberine alkaloids. *Eur. Med. Chem.* 1998, 33, 65–69.
- ³⁶⁷ Iwasa K., Kamigauchi M., Ueki M., Taniguchi M.: Antibacterial activity and structure-activity relationships of berberine analogs. *Eur. J. Med. Chem.* 1996, 31, 469–478.
- ³⁶⁸ Gafner S., Dietz B. M., McPhail K. L., Scott I. M., Glinski J. A., Russell F. E., McCollom M. M., Budzinski J. W., Foster B. C., Bergeron C.: Alkaloids from *Eschscholzia californica* and their capacity to inhibit binding of [3H]8-hydroxy-2-(di-N-propylamino)tetralin to 5-HT1A receptors in vitro. *J. Nat. Prod.* 2006, 69, 432–435.
- ³⁶⁹ Arango O., Perez E., Granados H., Rojano B., Saez J.: Inhibition of the lipid peroxidation and free radical scavenging capacity of alkaloids isolated from two Annonaceae, *Xylopia amazonica* cf. and *Duguetia vallicola*. *Actual. Biolog.* 2004, 26, 105–110; Chem. Abstr. 143, 241338 (2005).
- ³⁷⁰ Chen K. S., Ko F. N., Teng C. M., Wu Y. C.: Antiplatelet and vasorelaxing actions of some aporphinoids. *Planta Med.* 1996, 62, 133–136.
- ³⁷¹ Nawawi A., Ma C., Nakamura N., Hattori M., Kurokawa M., Shirak K., Kashiwaba N., Ono M.: Anti-herpes simplex virus activity of alkaloids isolated from *Stephania cepharantha*. *Biol. Pharm. Bull.* 1999, 22, 268–274.
- ³⁷² Wu Y. R., Ma Y. B., Zhao Y. X., Yao S. Y., Zhou J., Zhou Y., Chen J. J.: Two new quaternary alkaloids and anti-hepatitis B virus active constituents from *Corydalis saxicola*. *Planta Med.* 2007, 73, 787–791.
- ³⁷³ Yan D., Han Y. M., Wei L., Xiao X. H.: Effect of berberine alkaloids on *Bifidobacterium adolescentis* growth by microcalorimetry. *J. Therm. Anal. Calor.* 2009, 95, 495–499.
- ³⁷⁴ Lyoo Y., Park D., Lee S., Choi Y., Jung J., Jun T., Ahn H., Lee C. H., Lim Y.: Antibacterial compound against *Pasteurella multocida* and *Actinobacillus pleuropneumoniae* causing porcine pneumonia. *J. Microbiol. Biotechnol.* 2001, 11, 350–353.
- ³⁷⁵ Hsieh M. T., Su S. H., Tsai H. Y., Peng W. H., Hsieh C. C., Chen C. F.: Effects of palmatine on motor activity and the concentration of central monoamines and its metabolites in rats. *Jap. J. Pharmacol.* 1993, 61, 1–5.

- ³⁷⁶ Park I. K., Lee H. S., Lee S. G., Park J. D., Ahn Y. J.: Antifeeding activity of isoquinoline alkaloids identified in *Coptis japonica* roots against *Hyphantria cunea* (Lepidoptera: Arctiidae) and *Agelastica coerulea* (Coleoptera: Galerucinae). *J. Econ. Entomol.* 2000, *93*, 331–335.
- ³⁷⁷ Hung T. M., Nguyen H. D., Kim J. C., Jang H. S., Ryoo S. W., Lee J. H., Choi J. S., Bae K. H., Min B. S.: Alkaloids from roots of *Stephania rotunda* and their cholinesterase inhibitory activity. *Planta Med.* 2010, *76*, 1762–1764.
- ³⁷⁸ Wu D. Z., Yuan J. Y., Shi H. L., Hu Z. B.: Palmatine, a protoberberine alkaloid, inhibits both Ca^{2+} - and cAMP-activated Cl^- secretion in isolated rat distal colon. *Brit. J. Pharmacol.* 2008, *153*, 1203–1213.
- ³⁷⁹ Shin J. S., Kim E. I., Kai M., Lee M. K.: Inhibition of dopamine biosynthesis by protoberberine alkaloids in PC12 cells. *Neurochem. Res.* 2000, *25*, 363–368.
- ³⁸⁰ Lee S. S., Kai M., Lee M. K.: Effects of natural isoquinoline alkaloids on monoamine oxidase activity in mouse brain: inhibition by berberine and palmatine. *Med. Sci. Res.* 1999, *27*, 749–751.
- ³⁸¹ Chang Y. L., Usami S., Hsieh M. T., Jiang M. J.: Effects of palmatine on isometric force and intracellular calcium levels of arterial smooth muscle. *Life Sci.* 1999, *64*, 597 – 606.
- ³⁸² Lee H. S.: Rat lens aldose reductase inhibitory activities of *Coptis japonica* root-derived isoquinoline alkaloids. *J. Agric. Food Chem.* 2002, *50*, 7013–7016.
- ³⁸³ Jang M. H., Kim H. Y., Kang K. S., Yokozawa T., Park J. H.: Hydroxyl radical scavenging activities of isoquinoline alkaloids isolated from *Coptis chinensis*. *Arch. Pharmacol Res.* 2009, *32*, 341–345.
- ³⁸⁴ Chang F. R., Wei J. L., Teng C. M., Wu Y. C.: Antiplatelet aggregation constituents from *Annona purpurea*. *J. Nat. Prod.* 1998, *61*, 1457–1461.
- ³⁸⁵ Morello A., Lipchenca I., Cassels B. K., Speisky H., Aldunate J., Repetto Y.: Trypanocidal effect of boldine and related alkaloids upon several strains of *Trypanosoma cruzi*. *Comp. Biochem. Physiol. C: Pharmacol., Toxicol. Endocrinol.* 1994, *107C*, 367–371.
- ³⁸⁶ Chi T. C., Lee S. S., Su M. J.: Antihyperglycemic effect of aporphines and their derivatives in normal and diabetic rats. *Planta Med.* 2006, *72*, 1175–1180.
- ³⁸⁷ Madrero Y., Elorriaga M., Martinez S., Noguera M. A., Cassels B. K., D'Ocon P., Ivorra M. D.: A possible structural determinant of selectivity of boldine and derivatives for the $\alpha 1\text{A}$ -adrenoceptor subtype. *Brit. J. Pharmacol.* 1996, *119*, 1563–1568.
- ³⁸⁸ Shiimoto H., Matsuda H., Kubo M.: Effects of protopine on blood platelet aggregation. III. Effect of protopine on the metabolic system of arachidonic acid in platelets. *Chem. Pharm. Bull.* 1991, *39*, 474–477.
- ³⁸⁹ Taborska E., Bochorakova H., Sousek J., Sedmera P., Vavreckova C., Simanek V.: *Fumaria densiflora* DC. Alkaloids. *Coll. Czech. Chem. Commun.* 1996, *61*, 1064–1072.
- ³⁹⁰ Bhakuni D. S., Chaturvedi R.: The alkaloids of *Corydalis meifolia*. *J. Nat. Prod.* 1983, *46*, 320–324.
- ³⁹¹ Kosina P., Gregorova J., Gruz J., Vacek J., Kolar M., Vogel M., Roos W., Naumann K., Simanek V., Ulrichova J.: Phytochemical and antimicrobial characterization of *Maclaya cordata* herb. *Fitoterapia* 2010, *81*, 1006–1012.

-
- ³⁹² Xiao X., Liu J., Hu J., Zhu X., Yang H., Wang C., Zhang Y.: Protective effects of protopine on hydrogen peroxide-induced oxidative injury of PC12 cells via Ca²⁺ antagonism and antioxidant mechanisms. *Eur. J. Pharmacol.* 2008, *591*, 21–27.
- ³⁹³ Ueno T.: Protopine and related alkaloids as insecticides. *Jpn. Kokai Tokkyo Koho* 2007, JP 2007246484 A 20070927. *Chem. Abstr.* *147*, 379862 (2007).
- ³⁹⁴ Li B., Wu Q., Shi J., Sun A., Huang X.: Effects of protopine on intracellular calcium and the PKC activity of rat aorta smooth muscle. *Shengli Xuebao* 2005, *57*, 240–246; *Chem. Abstr.* *144*, 80902 (2005).
- ³⁹⁵ Morteza-Semnani K., Amin G., Shidfar M. R., Hadizadeh H., Shafiee A.: Antifungal activity of the methanolic extract and alkaloids of *Glaucium oxylobum*. *Fitoterapia* 2003, *74*, 493–496.
- ³⁹⁶ Ma W. G., Fukushi Y., Tahara S., Osawa T.: Fungitoxic alkaloids from Hokkaido Papaveraceae. *Fitoterapia* 2000, *71*, 527–534.
- ³⁹⁷ Wright C. W., Marshall S. J., Russell P. F., Anderson M. M., Phillipson J. D., Kirby G. C., Warhurst D. C., Schiff P. L.: In vitro antiplasmodial, antiamebic, and cytotoxic activities of some monomeric isoquinoline alkaloids. *J. Nat. Prod.* 2000, *63*, 1638–1640.
- ³⁹⁸ Song L. S., Ren G. J., Chen Z. L., Chen Z. H., Zhou Z. N., Cheng H.: Electrophysiological effects of protopine in cardiac myocytes: inhibition of multiple cation channel currents. *Brit. J. Pharmacol.* 2000, *129*, 893–900.
- ³⁹⁹ Barreto M. C., Pinto R. E., Arrabaca J. D., Pavao M. L.: Inhibition of mouse liver respiration by *Chelidonium majus* isoquinoline alkaloids. *Toxicol. Lett.* 2003, *146*, 37–47.
- ⁴⁰⁰ Al-Khalil S.: Inhibition of lens aldose reductase by protopine alkaloids. *Saud. Pharm. J.* 1996, *4*, 45–47; *Chem. Abstr.* *124*, 307486 (1996).
- ⁴⁰¹ Haeberlein H., Tschiersch K. P., Boonen G. H., Karl O.: *Chelidonium majus*. Components with *in vitro* affinity for the GABAA receptor. Positive cooperation of alkaloids. *Planta Med.* 1996, *62*, 227–231.
- ⁴⁰² Lee K. H., Huh J. W., Choi M. M., Yoon S. Y., Yang S. J., Hong H. N., Cho S. W.: Regulation of glutamate level in rat brain through activation of glutamate dehydrogenase by *Corydalis ternata*. *Exp. Mol. Med.* 2005, *37*, 371–377.
- ⁴⁰³ Jagiello-Wojtowicz E., Maciejewska-Kozak H., Chodkowska A.: Effects of acute and 10-day treatment with protopine-type alkaloids from *Chelidonium majus* L. on some biochemical parameters in rats. *Herba Pol.* 2000, *46*, 297–302.
- ⁴⁰⁴ Tokuda M., Kawabe T., Hanamura H., Tien J., Fu X., Ding L.: Protopine-type alkaloids showing δ receptor antagonist activity for treating stress, anxiety, depression, mental disorder, and schizophrenia. *Jpn. Kokai Tokkyo Koho* 2000, JP 2000191530 A 20000711; *Chem. Abstr.* *133*, 94490 (2000).
- ⁴⁰⁵ Tsai T. H., Wang G. J., Lin L. C.: Vasorelaxing alkaloids and flavonoids from *Cassytha filiformis*. *J. Nat. Prod.* 2008, *71*, 289–291.
- ⁴⁰⁶ Bao G. H., Qin G. W., Wang R., Tang X. C.: Morphinane alkaloids with cell protective effects from *Sinomenium acutum*. *J. Nat. Prod.* 2005, *68*, 1128–1130.
- ⁴⁰⁷ Chen J. J., Chang Y. L., Teng C. M., Lin W. Y., Chen Y. C., Chen I. S.: A new tetrahydroprotoberberine N-oxide alkaloid and anti-platelet aggregation constituents of *Corydalis tashiroi*. *Planta Med.* 2001, *67*, 423–427.

-
- ⁴⁰⁸ Chen J. J., Duh C. Y., Chen I. S.: New tetrahydroprotoberberine N-oxide alkaloids and cytotoxic constituents of *Corydalis tashiroi*. *Planta Med.* 1999, 65, 643–647.
- ⁴⁰⁹ Sadritdinov F. S., Rezhepov Z.: Relation between chemical structure and sedative activity of derivatives of diisoquinoline alkaloids. *Dokl. Akadem. Nauk UzSSR* 1982, 10, 34–35; Chem. Abstr. 98, 83240 (1982).
- ⁴¹⁰ Salminen K. A., Meyer A., Jerabkova L., Korhonen L. E., Rahnasto M., Juvonena R. O., Imming P., Raunio H.: Inhibition of human drug metabolizing cytochrome P450 enzymes by plant isoquinoline alkaloids. *Phytomedicine* 2011, 18, 533–538.
- ⁴¹¹ Jin X. L., Shao Y., Wang M. J., Chen L. J., Jin G. Z.: Tetrahydroprotoberberines inhibit lipid peroxidation and scavenge hydroxyl free radicals. *Acta Pharmacol. Sin.* 2000, 21, 477–480.
- ⁴¹² Dong Z. J., Chen L. J., Jin G. Z.: GTP regulation of (–)-stepholidine binding to R_H of D₁ dopamine receptors in calf striatum. *Biochem. Pharmacol.* 1997, 54, 227–232.
- ⁴¹³ Lee J., Shon M. Y., Jang D. S., Ha T. J., Hwang S. W., Nam S. H., Seo E. K., Park K. H., Yang M. S.: Cytotoxic isoquinoline alkaloids from *Chelidonium majus* var. *asiaticum*. *Agric. Chem. Biotech.* 2005, 48, 198–201.
- ⁴¹⁴ Jang S. I., Kim B. H., Lee W. Y., An S. J., Choi H. G., Jeon B. H., Chung H. T., Rho J. R., Kim Y. J., Chai K. Y.: Stylophine from *Chelidonium majus* inhibits LPS-induced inflammatory mediators in RAW 264.7 cells. *Arch. Pharmacol. Res.* 2004, 27, 923–929.
- ⁴¹⁵ Zhao M., Li L., Shen J., Jiang H.: Inhibitory and inductive effects of (–)- and (+)-tetrahydropalmatine on CYP450 in mice. *Zhejiang Daxue Xuebao, Yixueban* 2011, 40, 33–39; Chem. Abstr. 156, 114502 (2011).
- ⁴¹⁶ Sun S., Li L., Huang S., Zhao M., Sun D., Liu Y., Zeng S., Jiang H.: Application of tetrahydropalmatine enantiomer in preparation of P-glycoprotein inhibitor. Faming Zhu-anli Shenqing CN 102100694 A 20110622; Chem Abstr. 155, 84048 (2011).
- ⁴¹⁷ Jin G., Xu S., Yu L.: Different effects of enantiomers of tetrahydropalmatine on dopaminergic system. *Sci. Sin. B* 1986, 29, 1054–1064; Chem. Abstr. 106, 131533 (1987).
- ⁴¹⁸ Wang J. B., Mantsch J. R.: l-tetrahydropalmatine: a potential new medication for the treatment of cocaine addiction. *Fut. Med. Chem.* 2012, 4, 177–186.
- ⁴¹⁹ Wang C., Zhou J., Wang S., Ye M., Jiang C., Fan G., Zou H.: Combined comparative and chemical proteomics on the mechanisms of levo-tetrahydropalmatine-induced antinociception in the formalin test. *J. Proteom. Res.* 2010, 9, 3225–3234.
- ⁴²⁰ Burns J. J., Tsuchitani P. J.: Pharmacological study of tetrahydropalmatine and its analogs. A new type of central nervous system depressant. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* 1962, 139, 318–327.
- ⁴²¹ Rojas R. L., Martinez C. L., Anias J.: Effects of (–)-tetrahydropalmatine on the isolated ileum of guinea-pig. *Pharmacologyonline* 2006, 2, 90–95.
- ⁴²² He L., Liu G. Q.: Effects of various principles from chinese herbal medicine on rhodamine123 accumulation in brain capillary endothelial cells. *Acta Pharmacol. Sin.* 2002, 23, 591–596; PubMed ID 12100750.
- ⁴²³ Huang K., Dai G. Z., Li X. H., Fan Q., Cheng L., Feng Y. B.: Blocking L-calcium current by l-tetrahydropalmatine in single ventricular myocyte of guinea pigs. *Acta Pharmacol. Sin.* 1999, 20, 907–911; Chem. Abstr. 132, 343 (1999).

-
- ⁴²⁴ Oh Y. C., Choi J. G., Lee Y. S., Brice O. O., Lee S. C., Kwak H. S., Byun Y. H., Kang O. H., Rho J. R., Shin D. W., Kwon D. Y.: Tetrahydropalmatine inhibits pro-inflammatory mediators in lipopolysaccharide-stimulated THP-1 cells. *J. Med. Food* 2010, *13*, 1125–1132.
- ⁴²⁵ Yu J., Piao B. K., Pei Y. X., Qi X., Hua B. J.: Protective effects of tetrahydropalmatine against γ -radiation induced damage to human endothelial cells. *Life Sci.* 2010, *87*, 55–63.
- ⁴²⁶ Liao Z. G., Liang X. L., Zhu J. Y., Zhao G. W., Yang M., Wang G. F., Jiang Q. Y., Chen X. L.: Correlation between synergistic action of radix *Angelica dahurica* extracts on analgesic effects of *Corydalis* alkaloid and plasma concentration of dl-THP. *J. Ethnopharmacol.* 2010, *129*, 115–120.
- ⁴²⁷ Bun S. S., Laget M., Chea A., Bun H., Ollivier E., Elias R.: Cytotoxic activity of alkaloids isolated from *Stephania rotunda*. *Phytother. Res.* 2009, *23*, 587–590.
- ⁴²⁸ Lin M. T., Wang J. J., Young M. S.: The protective effect of dl-tetrahydropalmatine against the development of amygdala kindling seizures in rats. *Neurosci. Lett.* 2002, *320*, 113–116.
- ⁴²⁹ Chang C. K., Lin M. T.: DL-Tetrahydropalmatine may act through inhibition of amygdaloid release of dopamine to inhibit an epileptic attack in rats. *Neurosci. Lett.* 2001, *307*, 163–166.
- ⁴³⁰ Chan P., Chiu W. T., Chen Y. J., Wu P. J., Cheng J. T.: Antihypertensive activity of dl-tetrahydropalmatine, an active alkaloid isolated from the tubers of *Corydalis racemosa*. *Planta Med.* 1999, *65*, 340–342.
- ⁴³¹ Chu L. H., Hsu F. L., Chueh F. Y., Niu C. S., Cheng J. T.: Antihypertensive activity of dl-tetrahydropalmatine, an active alkaloid isolated from the tubers of *Corydalis racemosa*. *J. Chin. Chem. Soc.* 1996, *43*, 489–492.
- ⁴³² Lin M. T., Chueh F. Y., Hsieh M. T., Chen C. F.: Antihypertensive effects of DL-tetrahydropalmatine: an active principle isolated from *Corydalis*. *Clin. Exper. Pharmacol. Physiol.* 1996, *23*, 738–742.
- ⁴³³ Leung W. C., Zheng H., Huen M., Law S. L., Xue H.: Anxiolytic-like action of orally administered dl-tetrahydropalmatine in elevated plus-maze. *Progr. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry* 2003, *27*, 775–779.
- ⁴³⁴ Maurya S., Srivastava J. S., Jha R. N., Panday V. B., Singh U. P.: Effect of tetrahydropalmatine, an alkaloid on spore germination of some fungi. *Mycobiology* 2001, *29*, 142–144.
- ⁴³⁵ Hsieh M. T., Peng W. H., Hsieh C. C.: Effects of DL-tetrahydropalmatine on motor activity and the brain monoamine concentration in rats. *Chin. J. Physiol.* 1994, *37*, 79–82; Chem. Abstr. *122*, 46255 (1995).
- ⁴³⁶ Ma W. G., Fukushi Y., Tahara S.: Fungitoxic alkaloids from Hokkaido *Corydalis* species. *Fitoterapia* 1999, *70*, 258–265.
- ⁴³⁷ Fišar Z. (ed.): *Vybrané kapitoly z biologické psychiatrie*. 2. vyd. Grada, Praha 2009.
- ⁴³⁸ Rössner P.: Alzheimerova choroba – diagnostika a léčba. *Neurologie pro praxi* 2004, *1*, 11–16.
- ⁴³⁹ Bartus R. T., Dean L. D., Beer B., Lipa A. S.: The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. *Science* 1982, *217*, 408–417.

-
- ⁴⁴⁰ Jacobsen J. S.: Alzheimer's disease: an overview of current and emerging therapeutic strategies. *Curr. Topics Med. Chem.* 2002, 2, 343–352.
- ⁴⁴¹ Koukolík F.: *Alzheimerova nemoc a další demence*. Grada Publ., Praha 1998.
- ⁴⁴² Robbins T. W., McAlonan G., Muir J. L., Everitt B. J.: Cognitive enhancers in theory and practice. *Behav. Brain Res.* 1997, 83, 15–23.
- ⁴⁴³ Sorbera L. A., Bozzo J., Serradell N.: Alzheimer's disease one century later: The search for effective therapeutic targets continues. *Drugs Fut.* 2007, 32, 625–641.
- ⁴⁴⁴ Hardy J., Selkoe J.: The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: Progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 2002, 297, 353–356.
- ⁴⁴⁵ Terry A. V., Buccafusco J. J.: The cholinergic hypothesis of age and Alzheimer's disease – related cognitive deficits: recent challenges and their implications for novel drug development. *J. Pharmacol. Exp. Ther. B* 2003, 306, 821–827.
- ⁴⁴⁶ Bowen D. M., Palmer A. M., Frances P. T., Procter A. W., Lowe S. L.: Classical neurotransmitters in Alzheimer's disease. In: *Aging and the Brain*. Terry R. D. (ed), Raven Press, New York 1988.
- ⁴⁴⁷ Perry E. K., Perry R. H., Blessed G., Tomlinson B. E.: Changes in brain cholinesterases in senile dementia of Alzheimer type. *Appl. Neurobiol.* 1978, 4, 273–277.
- ⁴⁴⁸ Wisniewski H. M., Narang H. K., Terry R. D.: Neurofibrillary tangles of paired helical filaments. *J. Neurol. Sci.* 1976, 27, 173–181.
- ⁴⁴⁹ Greig N. H., Sambamurti K., Yu Q. S., Perry T. A., Holloway H. W., Haberman F., Brossi A., Ingram D. K., Lahiri D. K. In: *Butyrylcholinesterase: Its function and inhibition*. Giacobini E. (ed.), Martin Dunitz Ltd, London 2003.
- ⁴⁵⁰ Parihar M. S., Hemnani T.: Alzheimer's disease pathogenesis and therapeutic interventions. *J. Clin. Neurosci* 2004, 11, 456–467.
- ⁴⁵¹ Ibach B., Haen E.: Acetylcholinesterase inhibition in Alzheimer's disease. *Curr. Pharm. Design* 2004, 10, 231–251.
- ⁴⁵² Gauthier S., Emíre M., Farlow M. R., Bullock R., Grossberg G. T., Potkin S. G.: Strategies for continued successful treatment of Alzheimer's disease: switching cholinesterase inhibitors. *Curr. Med. Res. Opin.* 2003, 19, 707–714.
- ⁴⁵³ Summers W. K., Majovski L. V., Marsh G. M., Tachiki K., Kling A. N.: Oral tetrahydroaminoacridine in long-term treatment of senile dementia, Alzheimer type. *Eng. J. Med.* 1986, 315, 1241–1245.
- ⁴⁵⁴ Rogers S. L., Farlow M. R., Doody R. S., Mohs R., Friedhoff L. T.: A 24-week, double-blind, placebo-controlled trial of donepezil in patients with Alzheimer's disease. *Neurology* 1998, 50, 136–145.
- ⁴⁵⁵ Rafii M. S., Walsh S., Little J. T., Behan K., Reynolds B., Ward C., Jin S., Thomas R., Aisen P. S., Alzheimer's disease cooperative study. A phase II trial of huperzine A in mild to moderate Alzheimer disease. *Neurology* 2011, 76, 1389–1394.
- ⁴⁵⁶ Ma X., Gang D. R.: The Lycopodium alkaloids. *Nat. Prod. Rep.* 2004, 21, 752–772.
- ⁴⁵⁷ Tang X. C., Han Y. F.: Pharmacological profile of huperzine A, a novel acetylcholinesterase inhibitor from chinese herb. *CNS Drug Rev.* 1999, 5, 281–300.

-
- ⁴⁵⁸ Tang X. C., Kindel G. H., Kozikowski A. P.; Hanin I. J.: Comparison of the effects of natural and synthetic huperzine-A on rat brain cholinergic function in vitro and in vivo. *J. Ethnopharmacol.* 1994, *44*, 147–155.
- ⁴⁵⁹ Camps P., El Achab R., Morral J., Munoz-Torrero D., Badia A., Banos J. E., Vivas N. M., Barril X., Orozco M., Luque F. J.: New tacrine-huperzine A hybrids (huprines): highly potent tight-binding acetylcholinesterase inhibitors of interest for the treatment of Alzheimer's disease. *J. Med. Chem.* 2000, *43*, 4657–4666.
- ⁴⁶⁰ Ou L. Y., Tang X. C., Cai J. X.: Effect of huperzine A on working memory in reserpine- or yohimbine-treated monkeys. *Eur. J. Pharmacol.* 2001, *433*, 151–156.
- ⁴⁶¹ Shu Y. Z.: Recent natural products based drug development: a pharmaceutical industry perspective. *J. Nat. Prod.* 1998, *61*, 1053–1071.
- ⁴⁶² Patocka J.: Huperzine A-an interesting anticholinesterase compound from the chinese herbal medicine. *Acta Med.* 1998, *41*, 155–157.
- ⁴⁶³ Xiao X. Q., Zhang H. Y., Tang X. C.: Huperzine A attenuates amyloid β -peptide fragment 25-35-induced apoptosis in rat cortical neurons via inhibiting reactive oxygen species formation and caspase-3 activation. *J. Neurosci. Res.* 2002, *67*, 30–36.
- ⁴⁶⁴ Yan H., Zhang H. Y., Tang X. C.: Involvement of M₁-muscarinic acetylcholine receptors, protein kinase C and mitogen-activated protein kinase in the effect of huperzine A on secretory amyloid precursor protein-alpha. *Neuroreport* 2007, *18*, 689–692.
- ⁴⁶⁵ Xiao X. Q., Wang R., Han Y. F., Tang X. C.: Protective effects of huperzine A on beta-amyloid (25-35) induced oxidative injury in rat pheochromocytoma cells. *Neurosci. Lett.* 2000, *286*, 155–158.
- ⁴⁶⁶ Park S. Y.: Potential therapeutic agents against Alzheimer's disease from natural sources. *Arch. Pharmacol Res.* 2010, *33*, 1589-1609.
- ⁴⁶⁷ Opletal L., Drašar P.: *Fytochemické metody. Izolace obsahových látek (laboratorní technika)*. Karolinum, Praha 1994.
- ⁴⁶⁸ Keil B.: *Laboratorní technika organické chemie*. Nakladatelství Akademie věd Československé republiky, Praha 1963.
- ⁴⁶⁹ Stahl E.: *Thin-Layer Chromatography. A Laboratory Handbook*. 2nd ed., Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg/New York 1969.
- ⁴⁷⁰ Polášek M., Skála P., Opletal L., Jahodář L.: Rapid automated assay of antioxidant/radical-scavenging activity of natural substances by sequential injection technique (SIA) using spectrophotometric detection. *Anal. Bioanal. Chem.* 2004, *379*, 754 – 758.
- ⁴⁷¹ Molyne P.: The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songkl. J. Sci. Technol.* 2004, *26*, 211–219; Chem. Abstr. *143*, 243117 (2005).
- ⁴⁷² Steck T. L., Kant J. A.: Preparation of impermeable ghosts and inside-out vesicles from human erythrocyte membranes. *Methods Enzymol.* 1974, *31*, 172–180.
- ⁴⁷³ Mancini F., Naldi M., Cavrini V., Andrisano V.: Development and characterization of beta-secretase monolithic micro-immobilized enzyme reactor for on-line high-performance liquid chromatography studies. *J. Chromatogr. A* 2007, *1175*, 217–226.

-
- ⁴⁷⁴ ---: Dictionary of Natural Products: <http://dnp.chemnetbase.com/dictionary-search.do;jsessionid=AB5A70D26CC024E34EB330C67E38605D?method=view&id=5992495&si=>, staženo dne 10. 6. 2012.
- ⁴⁷⁵ Whiteley C. G., Daya S.: Protein ligand interactions. Part 5: Isoquinoline alkaloids as inhibitors of acetylcholinesterase from *Electrophorus electricus*. *J. Enzym. Inhib.* 1995, 9, 285–294.
- ⁴⁷⁶ Khorana N., Markmee S., Ingkaninan K., Ruchirawat S., Kitbunnadaj R., Pullagurla M. R.: Evaluation of new lead for acetylcholinesterase inhibition. *Med. Chem. Res.* 2009, 18, 231–241.
- ⁴⁷⁷ Gleye J., Ahon A., Edouard S.: Canadoline. New alkaloid from *Hydrastis canadensis*. *Phytochemistry* 1974, 13, 675–676.
- ⁴⁷⁸ Galeffi C., Cometa M. F., Tomassini L., Nicoletti M.: Canadinic acid: an alkaloid from *Hydrastis canadensis*. *Planta Med.* 1997, 63, 194.
- ⁴⁷⁹ Wu Y. R., Zhao Y. X., Liu Y. Q., Zhou J.: (2007) Isoquinoline alkaloids from *Corydalis taliensis*. *Z. Naturforsch. B: Biochem. Sci.* 2007, 62, 1199–1202.
- ⁴⁸⁰ Denisenko O. N., Israilov I. A., Yunusov M. S.: (1991) Alkaloids from *Corydalis caucasica*. *Chim. Prir. Sojedin.* 1991, 3, 439–440; Chem. Abstr. 116, 170156 (1992).
- ⁴⁸¹ Zeng W., Liang W., Tu G. Chemical study of alkaloids from *Corydalis bungeana*. *Planta Med.* 1987, 53, 418–420.
- ⁴⁸² Opletal L.: soukromé sdělení.
- ⁴⁸³ Waetjen W., Michels G., Steffan B., Niering P., Chovolou Y., Kampkoetter A., Tran-Thi, Q. H., Proksch P., Kahl R.: Low concentrations of flavonoids are protective in rat H4IIE cells whereas high concentrations cause DNA damage and apoptosis. *J. Nutr.* 2005, 135, 525–531.
- ⁴⁸⁴ Raza H., John A.: Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate differentially modulates oxidative stress in PC12 cell compartments. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2005, 207, 212–220.
- ⁴⁸⁵ Decker E.: Phenolics: prooxidants or antioxidants? *Nutr. Rev.* 1997, 55, 396–398.
- ⁴⁸⁶ Ubeda A., Montesinos C., Payá M., Alcaraz M. J.: Iron-reducing and free-radical-scavenging properties of apomorphine and some related benzyloisoquinolines. *Free Rad. Biol. Med.* 1993, 15, 159–167.
- ⁴⁸⁷ Chen J. J., Chang Y. L., Teng C. M., Chen I. S.: Vasorelaxing and antioxidant constituents from *Hernandia nymphaeifolia*. *Planta Med.* 2001, 67, 593–598.
- ⁴⁸⁸ Lee J. K., Cho J. G., Song M. C., Yoo J. S., Lee D. Y.: Isolation of isoquinoline alkaloids from the tuber of *Corydalis turtchaninovii* and their inhibition activity on low density lipoprotein oxidation. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* 2009, 52, 646–654.
- ⁴⁸⁹ Nenadis N., Tsimidou M.: Observation on the estimation of scavenging activity of phenolic compounds using rapid 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH.) tests. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 2002, 79, 1191–1195.