

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

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Biologická aktivita obsahových látek rostlin XIX. Alkaloidy *Peumus boldus* MOL.

Biological activity of plants metabolites. XIX. Alkaloids of *Peumus boldus* MOL.

Vedoucí katedry: Prof. RNDr. Luděk Jahodář, CSc.

Vedoucí diplomové práce: Doc. RNDr. Lubomír Opletal, CSc.

Hradec Králové, 2012

Matej Bakyta

Prohlášení

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpal, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Tato práce vznikla za podpory Specifického vysokoškolského výzkumu SVV 265 002.

Hradec Králové, 2012

.....

podpis

Poděkování

Ďakujem doc. RNDr. Lubomírovi Opletalovi, CSc. za pomoc, trpezlivosť a všetky rady poskytnuté pri vypracovávaní mojej diplomovej práce. Ďakujem tiež doc. PharmDr. Jiřímu Kunešovi, CSc. za zmeranie NMR spektier a ich interpretáciu, Mgr. Anne Hošťálkovej za pomoc so stĺpcovou chromatografiou, zmeranie MS spektier a pomoc s interpretáciou výsledkov, Ing. Kateřine Macákovej za stanovenie anticholínesterázovej a antioxidačnej aktivity a všetkým, ktorí mi akokoľvek pomohli s vypracovaním diplomovej práce. Napokon ďakujem svojim rodičom a priateľom za všemožnú podporu.

Matej Bakyta

ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické botaniky a ekologie

Kandidát: Matej Bakyta

Konzultant: Doc. RNDr. Lubomír Opletal, CSc.

Názov diplomovej práce: Biologická aktivita obsahových látok rastlin XIX. Alkaloidy *Peumus boldus* MOL.

Z listov *Peumus boldus* Mol. bol pripravený chloroformový extrakt (pH 9-10, terciárne alkaloidné bázy). Spracovanie extraktu stĺpcovou chromatografiou a následná kryštalizácia spojených frakcií 34-39 viedli k izolácii látky označenej MB-1, ktorá bola na základe výsledkov spektrálnej analýzy (MS a NMR štúdií) a porovnania výsledkov s literatúrou identifikovaná ako aporfínový alkaloid (+)-izokorydín (t. t. 183-184 °C). Izolovaný alkaloid bol testovaný na inhibičnú aktivitu voči ľudskej erytrocytarnej acetylcholinesteráze (AChE) a plazmatickej butyrylcholinesteráze (BuChE) a na antioxidačnú aktivitu (DPPH test). (+)-Izokorydín neprejavil v porovnaní s referenčnými látkami významnú inhibičnú aktivitu voči ľudským cholinesterázam (AChE: $IC_{50} > 1000 \mu M$; BuChE: $IC_{50} = 657,1 \mu M$) a v porovnaní s referenčnými antioxidantami neprejavil významný antioxidačný účinok ($EC_{50} > 1000 \mu M$).

Kľúčové slová: *Peumus boldus*, (+)-izokorydín, acetylcholinesteráza, butyrylcholinesteráza, antioxidačná aktivita

ABSTRACT

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmaceutical Botany and Ecology

Candidate: Matej Bakyta

Consultant: Doc. RNDr. Lubomír Opletal, CSc.

Title of Diploma Thesis: Biological activity of plants metabolites. XIX. Alkaloids of *Peumus boldus* MOL.

A chloroform extract (pH 9-10, tertiary alkaloidal bases) was prepared from the leaves of *Peumus boldus* Mol. Processing of this extract by column chromatography and subsequent crystallization of fractions 34-39 led to the isolation of a compound named MB-1. The compound was identified as an aporphine alkaloid (+)-isocorydine (m. t. 183-184 °C) on the basis of results of spectral analysis (MS and NMR studies) and their comparison with literature. The isolated compound was tested for human blood acetylcholinesterase (AChE) and human plasma butyrylcholinesterase (BuChE) inhibition activity and for antioxidative activity (DPPH test). (+)-Isocorydine did not show significant human cholinesterase inhibition activity (AChE: $IC_{50} > 1000 \mu M$; BuChE: $IC_{50} = 657,1 \mu M$) in comparison with reference compounds and did not show significant antioxidative effect in DPPH test ($EC_{50} > 1000 \mu M$) in comparison with reference antioxidants.

Key words: *Peumus boldus*, (+)-isocorydine, acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase, antioxidative activity

OBSAH

Obsah	1
Zoznam použitých skratiek	3
1 Úvod	5
2 Cieľ práce	8
3 Teoretická časť	9
3.1 Alzheimerova choroba	9
3.1.1 Epidemiológia	9
3.1.2 Patofyziológia	10
3.1.2.1 Cholínergná hypotéza	11
3.1.3 Etiológia	12
3.1.3.1 Dedičnosť, vek	12
3.1.3.2 Oxidačný stres	13
3.1.3.3 Mitochondriálna dysfunkcia	13
3.1.3.4 Infekcie	13
3.1.3.4.1 Vírus herpesu simplex typu 1	14
3.1.3.4.2 Chlamydophila pneumoniae	14
3.1.4 Farmakoterapia	14
3.1.4.1 Inhibítory cholinesteráz (kognitíva)	15
3.1.4.1.1 Syntetické látky	15
3.1.4.1.1.1 Donepezil	15
3.1.4.1.1.2 Rivastigmín	15
3.1.4.1.2 Látky prírodného pôvodu	15
3.1.4.1.2.1 Galantamín	16
3.1.4.1.2.2 Huperzín A	16
3.2 Peumus boldus Mol.	16
3.2.1 Popis rastliny	16
3.2.2 Boldo folium (boldovníkový list)	17
3.2.3 Obsahové látky	18
3.2.3.1 Silica	18
3.2.3.2 Fenolické látky	19
3.2.3.3 Alkaloidy	19
3.2.3.3.1 Obsah	21
3.2.3.3.2 Metódy izolácie	21
3.2.3.3.3 Biologická aktivita	22
3.2.3.3.3.1 Antioxidačná aktivita	22
3.2.3.3.3.2 Účinky súvisiace s antioxidačnou aktivitou	23
3.2.3.3.3.3 Aktivita na receptoroch pre neurotransmitery	25
3.2.3.3.3.4 Vplyv na hladkú a srdcovú svalovinu	25
3.2.3.3.3.5 Neurologická aktivita	26
3.2.3.3.3.6 Vplyv na pôvodcov infekčných ochorení, antineoplastická aktivita	26
3.2.3.3.3.7 Vplyv na imunitný systém	26
3.2.3.3.3.8 Ďalšie biologické účinky	27
3.2.4 Účinok a použitie	27
4 Experimentálna časť	28
4.1 Všeobecné postupy	28
4.1.1 Príprava a uchovávanie rozpúšťadiel	28
4.1.2 Odparovanie rozpúšťadiel z roztokov	28

4.1.3 Sušenie látok.....	28
4.1.4 Tenkovrstvová chromatografia.....	28
4.1.5 Stĺpcová chromatografia	29
4.2 Potreby	29
4.2.1 Rozpúšťadlá.....	29
4.2.2 Chemikálie.....	29
4.2.3 Špeciálne potreby pre štúdie biologickej aktivity.....	29
4.2.3.1 Chemikálie.....	29
4.2.3.2 Pufre	30
4.2.3.3 Cholinesterázy	30
4.2.4 Detekčné činidlá	31
4.2.5 Vyvíjacie sústavy pre tenkovrstvovú chromatografiu	31
4.2.6 Chromatografické adsorbenty.....	31
4.3 Izolácia alkaloidu.....	31
4.3.1 Príprava chloroformového extraktu z listov <i>Peumus boldus</i> Mol.	31
4.3.2 Stĺpcová chromatografia chloroformového extraktu z listov <i>Peumus boldus</i> Mol.	33
4.3.3 Čistenie látky obsiahnutej v spojených frakciách 34-39.....	35
4.4 Určenie štruktúry izolovaného alkaloidu	35
4.5 Stanovenie inhibičného účinku izolovaného alkaloidu na cholinesterázy.....	36
4.6 Stanovenie antioxidačného účinku izolovaného alkaloidu	37
5 Výsledky	38
5.1 Štruktúra izolovaného alkaloidu	38
5.1.1 MS štúdia (+)-izokorydínu	38
5.1.2 NMR štúdia (+)-izokorydínu.....	40
5.1.2.1 ¹ H-NMR štúdia (+)-izokorydínu.....	40
5.1.2.1 ¹³ C-NMR štúdia (+)-izokorydínu.....	42
5.2 Inhibičný účinok izolovaného alkaloidu na cholinesterázy	44
5.3 Antioxidačný účinok izolovaného alkaloidu.....	44
6 Diskusia.....	45
7 Zoznam použitej literatúry	47

ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK

AChE	acetylcholinesteráza
AChEI	inhibítor acetylcholinesterázy
APP	amyloidový prekurzorový proteín
BHA	butylhydroxyanizol
BuChE	butyrylcholinesteráza
CDCl ₃	deuteriochloroform
CNS	centrálny nervový systém
DNA	kyselina deoxyribonukleová
DPPH	2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl
DTNB	kyselina 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoová
EC ₅₀	koncentrácia, pri ktorej nastala 50% redukcia voľných radikálov
ESI-MS	hmotnostná spektrometria využívajúca elektrosprejovú ionizáciu (z anglického <i>electrospray ionization mass spectrometry</i>)
ESI-MS/MS	tandemová hmotnostná spektrometria využívajúca elektrosprejovú ionizáciu (z anglického <i>tandem electrospray ionization mass spectrometry</i>)
FRS	zhášanie voľných radikálov; voľné radikály zhášajúci (z anglického <i>free-radical scavenging</i>)
GABA	kyselina γ -aminomaslová
GLUT2	transportér pre glukózu typu 2
HIV-1	vírus ľudskej imunodeficiencie typu 1
HSV-1	vírus herpesu simplex typu 1
ChNO	chronické nezdierateľné ochorenia
IC ₅₀	koncentrácia, pri ktorej nastala 50% inhibícia
LDL	lipoproteínové častice s nízkou hustotou
MS	hmotnostná spektrometria
NmLT	<i>N</i> -metyl-laurotetanín
NMR	nukleárna magnetická rezonancia (z anglického <i>nuclear magnetic resonance</i>)
PPAR	peroxisome proliferator-activated receptor
SC ₅₀	koncentrácia, pri ktorej zhaslo 50 % voľných radikálov
SGLT1	transportér pre glukózu závislý na sodných katiónoch typu 1
SZO	Svetová zdravotnícka organizácia

t. h. telesná hmotnosť
UV ultrafialová (radiácia)

1 ÚVOD

V posledných rokoch sa v diskusiách o zachovaní, podpore a navrátení zdravia, používa slovné spojenie civilizačné ochorenia alebo civilizačné choroby. Napriek svojej popularite je toto súhrnné označenie pomerne nejasné či zavádzajúce. Môže vyvolávať dojem, že ide o problém, ktorý sa týka predovšetkým vysokopříjmových populácií a rozvinutých krajín. Napriek takejto predstave približne 80 % úmrtí spôsobených týmito ochoreniami sa vyskytuje v krajinách s nízkym a stredným príjmom a vo väčšine krajín je to vôbec najčastejšia príčina smrti. Výnimkou je africký región, očakáva sa však, že do roku 2030 nastane i v tejto oblasti rovnaká situácia.¹

Vhodnejšie je použiť pojem založený na medicínskej terminológii – chronické neinfekčné ochorenia.² Poukazuje sa tým na charakter týchto ochorení. Po prvé, ich vývoj je dlhodobý, k manifestácii dochádza po pretrvávajúcom pôsobení rizikových faktorov. Po druhé, v podstate sú nezdierateľné infekčnou cestou. V niektorých prípadoch je však infekčný agens súčasťou rizikových faktorov – približne 5 % onkologických ochorení je zapríčinených ľudským papilomavírusom, vírusom hepatitídy B a C a *Helicobacter pylori*¹ – alebo je často prítomná chronická infekcia, ktorá môže zohrávať významnú úlohu vo vývoji ochorení, napríklad neurodegeneratívnych³.

Chronické neinfekčné, respektíve nezdierateľné ochorenia (ChNO) sú obsiahlym a nie jednoznačne určeným súborom ochorení. Svetová zdravotnícka organizácia (SZO) uvádza predovšetkým kardiovaskulárne a niektoré onkologické ochorenia, diabetes mellitus druhého typu a chronické pľúcne ochorenia. V širšom rozsahu sú zahrnuté tiež ochorenia gastrointestinálne, renálne a neurologické a mentálne poruchy¹. Uviest' možno i osteoporózu², vekom podmienenú makulárnu degeneráciu⁴ a neurodegeneratívne ochorenie demenciu Alzheimerovho typu⁵.

Podľa SZO bolo v roku 2008 celosvetovo približne 57 miliónov úmrtí, z toho takmer dve tretiny boli zapríčinené ChNO. Väčšina z nich je príčinne spätá so štyrmi konkrétnymi návykmi: s užívaním tabaku čiže tabakizmom, nedostatočnou fyzickou aktivitou, nezdravým stravovaním a škodlivým užívaním alkoholu. Tieto návyky vedú k nasledujúcim metabolicko-fyziologickým stavom, ktoré sú rizikovými faktormi uvedených ochorení: zvýšenému krvnému tlaku, nadváhe a obezite, hyperglykémii a hyperlipidémii¹. V prípade vekom podmienenej makulárnej degenerácie a Alzheimerovej demencie zohráva úlohu špecifického rizikového faktora tiež vek; s vekom totiž stúpa incidencia prípadov^{4,5}.

S ohľadom na zmienené skutočnosti a na fakt, že nárast ChNO v krajinách s nízkym a stredným príjmom je urýchlený negatívnymi dopadmi globalizácie, neplánovanej urbanizácie a rozmáhajúcim sa sedavým spôsobom života (ľudia v rozvojových krajinách vo väčšej miere konzumujú potravu s celkovo vyšším obsahom energie a majú lepší prístup k tabakovým a alkoholickým produktom), javí sa označenie chronických nezdieľateľných ochorení ako chorôb civilizačných do určitej miery oprávnené.¹

Týmto ochoreniam je možné do značnej miery predchádzať.⁶ V závislosti od konkrétneho ochorenia môže podpornú úlohu zohrať použitie preventívnych prostriedkov v podobe doplnkov stravy. Základ prevencie mal by však spočívať v snahe o odstránenie alebo aspoň obmedzenie rizikových okolností, čo je pri ochoreniach, ktoré prevažne vyplývajú zo spôsobu života, pomerne dobre dosiahnuteľné. SZO odporúča v prvom rade redukovať spomenuté hlavné rizikové návyky a potláčať chronické infekcie (napr. formou imunizačných programov), ktoré sú kľúčové pre niektoré typy onkologických ochorení. SZO ďalej uvádza, že je priamy vzťah medzi fyzickou aktivitou a znížením rizika kardiovaskulárnych ochorení, cievnej mozgovej príhody, diabetes mellitus druhého typu a tiež rakoviny prsníka a hrubého čreva. V súvislosti so zdravým stravovaním SZO odporúča dosiahnuť prostredníctvom fyzickej aktivity rovnováhu medzi energetickým príjmom a výdajom a udržanie primeranej telesnej hmotnosti, obmedziť energetický príjem v podobe tukov tak, aby nepresahoval 30 % celkového energetického príjmu, ďalej zvýšiť príjem nenasýtených mastných kyselín, eliminovať mastné kyseliny typu *trans*, obmedziť príjem sodíka a napokon zvýšiť konzumáciu ovocia, zeleniny, strukovín, celozrnných výrobkov a orechov.¹

Ako už bolo zmienené, jednou zo skupín ChNO sú neurodegeneratívneho ochorenia, predovšetkým Parkinsonova choroba⁷ a Alzheimerova choroba⁸, ktorá je najčastejšou príčinou demencie⁹ a ktorej incidencia stúpa s predlžujúcim sa vekom populácie¹⁰. Jednoznačné príčiny tejto choroby nie sú v súčasnej dobe známe⁸; je pravdepodobné, že sa na jej vzniku podieľa niekoľko príčin¹¹, vrátane dedičnosti¹², oxidačného stresu¹³ a niektorí autori uvažujú i o účasti infekcií^{3, 14}. Pri Alzheimerovej chorobe je v určitých oblastiach mozgu pozorovaný nadmerný úbytok neurónov¹⁰, pokles tvorby a výdaja neurotransmiteru acetylcholínu⁵, porucha glutamátergneho systému⁸ a výskyt patologických proteínov, najmä β -amyloidu a hyperfosforylovaného τ -proteínu¹⁰. Súčasná farmakoterapia spočíva v ovplyvňovaní symptomatológie ochorenia a spomaľovaní jeho progresie⁵, k dispozícii je však len obmedzené množstvo účinných látok. Preto pretrváva intenzívna snaha vyvinúť nové predlohové štruktúry. Významný zdroj pri hľadaní nových látok potenciálne uplatniteľných

v liečbe Alzheimerovej demencie sú poznatky ľudových medicín, respektíve látky prírodného pôvodu. Príkladom takej látky, ktorá sa úspešne uplatnila v klinickej praxi, je alkaloid galantamín a v blízkej budúcnosti k nemu snáď pribudne i alkaloid huperzín A¹⁵, respektíve jeho deriváty.

Štúdiom alkaloidov sa zaoberá i pracovná skupina na Katedre farmaceutickej botaniky a ekológie Farmaceutickej fakulty Univerzity Karlovej. Medzi skúmanými účinkami je aj schopnosť ovplyvňovať aktivitu cholinesteráz, kľúčových katabolických enzýmov metabolizmu acetylcholínu, a β -sekretáz, enzýmov podieľajúcich sa na vzniku β -amyloidu. Jedným z cieľov tohto štúdia je tiež vytvorenie knižnice látok pre ďalší výskum, napríklad aktivity na *N*-metyl-D-aspartátových receptoroch.

Peumus boldus Mol. je rastlinný taxón liečebne používaný už pôvodnými obyvateľmi Čile, dnes je súčasťou oficiálnych liekopisov mnohých krajín, uplatňuje sa v liečbe hepatobiliárnych a tráviacich porúch.¹⁶ Medzi jeho obsahové látkami patria benzylocholinolínové alkaloidy¹⁷, ktorých schopnosť ovplyvniť cholinesterázovú aktivitu nebola dodnes dostatočne študovaná.

2 CIEĽ PRÁCE

Cieľom diplomovej práce bolo:

1. Spracovanie prehľadu obsahu alkaloidov v listoch *Peumus boldus* Mol. a ich biologickej aktivity.
2. Chromatografické spracovanie extraktu poskytnutého školiteľom, izolácia jedného alkaloidu v čistom stave.
3. Určenie základných fyzikálno-chemických charakteristík látky.
4. Spolupráca na zistení účinku izolovaného alkaloidu na cholinesterázy (tj. acetylcholin-esterázu a butyrylcholinesterázu) a jeho antioxidačného účinku (DPPH test).
5. Vyhodnotenie výsledkov a spracovanie písomnej práce.

3 TEORETICKÁ ČASŤ

3.1 Alzheimerova choroba

Degeneratívne ochorenia CNS patria medzi chronické neprenosné ochorenia. Neurodegenerácia je situácia, pri ktorej dochádza k úbytku špecifických skupín neurónov a následnému klinickému prejavu.¹⁸ Príkladmi neurodegeneratívneho ochorenia je Parkinsonova⁷ a Alzheimerova choroba⁸. Demencia je syndróm spôsobený chronickým alebo progresívnym poškodením mozgu. Dochádza k poruche vyšších nervových kortikálnych funkcií, napríklad pamäte, myslenia, orientácie, chápania, reči, úsudku a schopnosti učenia sa. Vedomie ale nebýva zastreté.¹² Najčastejšou príčinou demencie je Alzheimerova choroba, tvorí 50-70 % všetkých prípadov.⁹ Okrem porúch kognitívnych funkcií vyskytujú sa u alzheimerovských pacientov tiež poruchy nálad a afektov, správania a spánku a označujú sa ako behaviorálne a psychologické symptómy demencie. Alzheimerovu chorobu možno charakterizovať ako postupne a kradmo rozvíjajúcu sa demenciu s globálnym postihnutím kognitívnych funkcií a aktivít denného života a s častým výskytom behaviorálnych a psychologických symptómov, bez výrazného kolísania, s lineárnym zhoršovaním. Končí smrťou. Ochorenie je veľmi náročné z hľadiska zdravotného, sociálneho i ekonomického a výrazne znižuje kvalitu života opatrovníkov, predovšetkým rodinných príslušníkov.¹²

3.1.1 Epidemiológia

Incidencia je počet nových prípadov ochorenia zaznamenaných v určitom časovom období v populácii s rizikom výskytu ochorenia. Prevalencia je počet prípadov ochorenia v celej skúmanej populácii. Incidencia i prevalencia Alzheimerovej choroby s vekom stúpa, pretrváva však diskusia o tom, či je rastúci výskyt viazaný na vek alebo na proces starnutia. Vo vyššom veku sú ženy ochorením postihnuté častejšie než muži.¹⁰ U ochorenia sú rozlišované dve formy: familiárna (5-10 % všetkých prípadov) a sporadická (90-95 % všetkých prípadov). Okrem toho existuje familárna forma s ranným, skorým začiatkom, keď nástup príznakov nastane do 60. roku života, a familiárna forma Alzheimerovej choroby s neskorým začiatkom, s nástupom príznakov po 60. roku.¹² Incidencia presenilnej formy sa pohybuje vo vekovej skupine 40-60 rokov okolo 2,4/100 000 osôb/rok, u neskoršej formy to je okolo 120-130/100 000 osôb/rok. Počínajúc vekom 62,5 roku zdvojnásobuje sa prevalencia

Alzheimerovej choroby každých 4,5 roka.¹⁰ Ochorenie postihuje približne 5 % populácie vo veku 65 rokov, vo veku nad 85 rokov ním trpí až polovica populácie.⁹ Alzheimerova choroba je teda ochorenie predovšetkým vyššieho veku a s predlžujúcim sa vekom populácie pribúda počet alzheimerovských pacientov.

3.1.2 Patofyziológia

Prirodzený proces starnutia sprevádzajú zmeny mozgu. Tieto zmeny sa prekrývajú do určitej miery so zmenami pozorovanými pri Alzheimerovej chorobe. Dochádza k poklesu hmotnosti a veľkosti mozgu, k rozširovaniu mozgových komôr a k numerickej atrofií neurónov.¹² Numerickej atrofii neurónov v priebehu ochorenia prevyšuje atrofiiu sprevádzajúcu klinicky normálne starnutie. Deje sa tak v mozgovej kôre i podkôrových oblastiach a dôsledkom je poškodenie projekčných oblastí. Mechanizmus zániku neurónov nie je objasnený. Vývoj choroby sprevádzajú tiež zmeny dendritických systémov vrátane synapsí, zmeny zodpovedajú stupňu postihnutia kognitívnych funkcií.¹⁰ Klasické diagnostické znaky Alzheimerovej choroby sú senilné plaky a neuronálne kľbká, anglicky *tangles*.¹² Senilné plaky sa v histologických rezoch javia obvykle ako 10-200 μm veľké, nepravidelne okrúhle, heterogénne útvary obsahujúce amyloid. Vyskytujú sa nenáhodne i v priebehu fyziologického starnutia mozgu, Alzheimerovu chorobu však sprevádzajú vo vyššom počte.¹⁰ Pri Alzheimerovej chorobe sa ukladá v jadrách senilných plakov, ale i v stenách ciev amyloidový β -proteín (tiež: β -amyloid). Vzniká odštiepením z prekursorov súhrnne nazývaných amyloidový prekursorový proteín (APP) činnosťou enzýmov sekretáz.^{10, 12} Pozostáva z 39 až 43 aminokyselín.¹⁰ APP je transmembránový glykoproteín, ktorý sa pravdepodobne podieľa na raste a plasticite neurónov a tým i na procesoch učenia sa a pamätania si.¹² Neuronálne kľbká vyzerajú v optickom mikroskope ako chumáče hrubších vlákien, prípadne pripomínajú plamienok alebo tenisovú raketu, ktoré prestupujú cytoplazmu neurónu. Imunochemické štúdie dokázali, že ich podstatnou zložkou je τ -proteín, proteín s nízkou molekulárnou hmotnosťou asociovaný s mikrotubulmi; väzba τ -proteínu na tubulín štartuje jeho polymerizáciu a defosforylovaný proteín sa zúčastňuje na stabilizácii mikrotubulov. V kľbkách sa τ -proteín objavuje v jednoduchšej izoforme a má vyššiu molekulovú hmotnosť, ktorá je podmienená hyperfosforyláciou. Okrem hyperfosforylácie môže sa na vzniku kľbiek zúčastňovať aj glykozylácia a ubikvitinizácia.¹⁰

Nie je jasné, ktorá udalosť je z pohľadu zániku neurónov a rozvoja Alzheimerovej choroby rozhodujúca, ale do popredia sa dostávajú dve hypotézy. Prvá považuje za kľúčovú

udalosť poruchu metabolizmu APP. APP podlieha aktivite β - a následne γ -sekretázy, produktom štiepenia je β -amyloid₄₀ a β -amyloid₄₂ (indexy vyjadrujú počet aminokyselín v reťazci). Tie po agregácii vytvárajú jadro neuritických plakov. Nasleduje reťazec neurotoxických javov (tzv. amyloidová kaskáda), napríklad oxidačný stres, excitotoxické a imunologické deje, ktorých dôsledkom je zánik neurónov a rozvoj demencie. Vznik neuronálnych klbk má byť až druhotná udalosť. Naopak, druhá hypotéza považuje za rozhodujúci vznik neuronálnych klbk: pri Alzheimerovej chorobe amyloid zvyšuje mieru fosforylácie τ -proteínu, nastáva porucha výstavby mikrotubulov a agregácia τ -proteínu do *tangles*. Dôsledkom je opäť zánik neurónov a demencia. Výskum naznačuje spojitosť oboch javov prostredníctvom zmien v určitých signálnych kaskádach.¹²

3.1.2.1 Cholínergná hypotéza

Prvá teória, ktorá sa pokúsila o vysvetlenie biochemickej podstaty Alzheimerovej choroby, bola tzv. cholínergná hypotéza.¹⁹ Podľa nej je za jeden z najdôležitejších nálezov súvisiacich s ochorením považovaný deficit cholínergnej (tj. acetylcholín využívajúcej) neurotransmisie a predpokladá, že kognitívny rozvrat v priebehu ochorenia je vo vzťahu k nedostatočnosti centrálnych cholínergných funkcií.¹¹ Pri Alzheimerovej chorobe je patologicky znížená tvorba i výdaj acetylcholínu.⁵

Acetylcholín pôsobí v organizme ako neurotransmitter centrálného i periférneho nervového systému. V mozgu pôsobí stimulačne, prostredníctvom tzv. muskarínových a nikotínových receptorov. Nikotínové receptory sa uplatňujú vo veľkej miere ako heteroreceptory na glutamátergných, serotonínergných, GABA-ergných i dopamínergných neurónoch, ich stimulácia zvyšuje uvoľňovanie príslušných transmiterov. Acetylcholín je významne zapojený v procesoch súvisiacich s pamäťou, učením sa, pozornosťou, motorikou.^{11, 20}

V cholínergných neurónoch je syntetizovaný acetyláciou cholínu acetylkoenzýmom A prostredníctvom enzýmu cholínacetyltransferázou. Degradáciu na cholín a acetát zabezpečujú hydrolytické enzýmy cholínesterázy. V neurónoch a v okolí synapsií to je predovšetkým substrátovo špecifickejšia acetylcholínesteráza, v plazme, pečeni a za normálnych okolností len v obmedzenej miere tiež v neurónoch butyrylcholínesteráza (tiež: pseudocholínesteráza).²⁰ Aktivita butyrylcholínesterázy je ale pri Alzheimerovej chorobe v CNS patologicky zvýšená.⁵

V druhej polovici 70. rokov 20. storočia bolo zistené, že v mozgoch pacientov trpiacich Alzheimerovou chorobou je obvyklý pokles cholinergnej aktivity. Tento fakt sa spolu s experimentálnymi štúdiami, ktoré skúmali poruchy pamäte u mladých ľudí navodené látkou s centrálnym anticholinergným pôsobením a schopnosť zvrátiť túto poruchu nepriamym cholinomimetikom fyzostigmínom, stal základom cholinergnej hypotézy.¹⁹

Uvedené skutočnosti viedli k vývoju látok označovaných ako inhibítory cholinesteráz, prípadne inhibítory acetylcholinesterázy (AChEI), a k ich zavádzaniu do klinickej praxe v nádeji, že zabránia kognitívnemu úpadku alzheimerovských pacientov. Klinické skúsenosti viedli k poznatku, že AChEI síce poskytujú určité symptomatické zlepšenie stavu, no z dlhodobej perspektívy nezabránia postupu ochorenia. Navyše, nie všetci pacienti vykazujú pozitívnu odozvu na liečbu v porovnaní s placebom. Preto myšlienka, že nedostatočnosť cholinergnej neurotransmisie je sama o sebe príčinou ochorenia, nie je dnes všeobecne uznávaná.¹⁹

Craig et al.¹⁹ však majú na význam poklesu cholinergnej aktivity iný pohľad. Predpokladajú, že acetylcholín sprostredkúva kompenzačné mechanizmy (napríklad neurogenézu, produkciu neurotrofných faktorov, zmeny v dendritickom vetvení), ktoré sú súčasťou procesov učenia, pamäte a funkčnej obnovy po poškodení. Deficit cholinergnej neurotransmisie by tak obmedzoval možnosti mozgu vyrovnat' sa s rizikovými faktormi, ktoré sa vo zvýšenej miere vyskytujú počas starnutia.

3.1.3 Etiológia

V súčasnej dobe nie sú známe jednoznačné príčiny Alzheimerovej choroby.⁸ Pravdepodobná je multifaktoriálna etiológia, na ktorej sa podieľajú genetické i environmentálne činitele.¹¹

3.1.3.1 Dedičnosť, vek

Overenými rizikovými faktormi pre vznik Alzheimerovej choroby sú vek a familiárna agregácia prípadov ochorenia. Predpokladá sa, že familiárna agregácia spojená s vysokým relatívnym rizikom je podmienená kombináciou genetických vplyvov s vplyvmi vonkajšieho prostredia. Je popísaných niekoľko mutácií génov pre APP a proteíny presenilín 1 a 2. Takmer u všetkých nositeľov týchto mutácií dôjde k vývoju ochorenia. Tieto gény sa preto označujú ako deterministické. Štvrtým genetickým faktorom, ktorý ovplyvňuje vývoj ochorenia, je gén pre apolipoproteín E. Polymorfizmus génu kódujúceho apolipoproteín E je

dedičný rizikový faktor ovplyvňujúci vnímavosť pre neskorú formu ochorenia; nositelia rôznych genotypov sú vystavení rôznej miere rizika ochorenia. Alzheimerova choroba je geneticky komplexné a heterogénne ochorenie. Deterministické gény spolu s génom pre apolipoproteín E vysvetľujú asi 30 % genetického rozptylu choroby.¹²

3.1.3.2 Oxidačný stres

Nerovnováha medzi vznikom látok (peroxidovej a radikálovej povahy), ktoré majú oxidačnú aktivitu, a antioxidačnými procesmi, ktorá je vychýlená na stranu oxidantov, vedie k poškodzovaniu bunkových štruktúr, najmä proteínov, lipidov a DNA. Takúto situáciu označujeme ako oxidačný stres.¹³

Cai et al.¹³ poukazujú na úlohu oxidačného stresu v patogenéze Alzheimerovej choroby. Oxidačný stres je javom, ktorý podnecuje, sprevádza a prepája navzájom ďalšie patogenetické procesy, predovšetkým tvorbu a ukladanie neurotoxického β -amyloidu, rozvoj chronického neuronálneho zápalu a rozsiahlu apoptózu. Vzťah oxidačného stresu k uvedeným procesom má charakter „začarovaného kruhu“. Ich súčasťou je totiž produkcia ďalších látok s oxidačnými vlastnosťami. Napriek tomu, že stále nie je isté, či je oxidačný stres základnou príčinou vzniku a rozvoja Alzheimerovej choroby, jeho zásadný význam je pravdepodobný. Preto je potenciálnym cieľom pre terapeutický zásah.

3.1.3.3 Mitochondriálna dysfunkcia

Zdá sa, že mitochondrie by mohli zohrávať kľúčovú úlohu v rozvoji Alzheimerovej choroby. Somatické mutácie mitochondriálnej DNA môžu spôsobiť poruchy energetického metabolizmu, vzostup oxidačného stresu a hromadenie β -amyloidu. Úvahy o úlohe mitochondriálnej dysfunkcie by mohli vysvetliť mnohé biochemické, genetické a patologické rysy sporadickej formy ochorenia. No napriek dôkazom o poruchách funkcií mitochondrií pri Alzheimerovej chorobe a dôkazom o poškodení kognitívnych funkcií u pacientov s mutáciami mitochondriálnej DNA, nebola žiadna mutácia s ochorením spojená kauzálna.²¹

3.1.3.4 Infekcie

V posledných desaťročiach sa zvažuje možnosť, že infiltrácia mozgu infekčnými organizmami môže vyústiť do vývoja Alzheimerovej choroby. Z množstva predpokladaných

pôvodcov CNS infekcií najviac zvažované sú vírus herpesu simplex typu 1 (HSV-1), *Chlamydomphila pneumoniae* a niekoľko typov spirochét.¹⁴ Skúmaný je i význam *Helicobacter pylori*.²² V súvislosti s iniciáciou ochorenia alebo dokonca urýchlením progresie vzbudzujú záujem i periférne infekcie.¹⁴

3.1.3.4.1 Vírus herpesu simplex typu 1

V populácii staršej ako 50 rokov až 100 % jedincov je nositeľom latentnej formy vírusu.¹⁴ Prepokladá sa, že v spojitosti s určitými genetickými faktormi nositeľa mohol by HSV-1 migrovať do niektorých oblastí mozgu a po reaktivácii spôsobiť lokalizovanú encefalítidu zodpovednú za patologické zmeny pozorované pri Alzheimerovej chorobe.^{14, 23}

3.1.3.4.2 Chlamydomphila pneumoniae

Chlamydomphila pneumoniae je intracelulárny patogén, ktorý spôsobuje množstvo rôznych akútnych i chronických infekcií.²⁴ Práca Balina et al.²⁵ poukázala na možný vzťah *Chlamydomphila pneumoniae* a Alzheimerovej choroby; u 90 % vzoriek mozgov postihnutých ochorením bol pozitívny nález patogénu. Holmes a Cotterell¹⁴ uvádzajú, že bola popísaná schopnosť patogénu viesť neurón do stavu chronického zápalu a nepodliehať apoptóze. Predpokladaným dôsledkom je vzostup produkcie amyloidu.

3.1.4 Farmakoterapia

Pretože nie je známy jednoznačný kľúčový faktor, ktorý by bol zodpovedný za vznik ochorenia⁸, a dnešný stav poznania skôr naznačuje, že etiológia ochorenia je komplexná, neexistuje zatiaľ kauzálna liečba. Terapia sa zameriava na zásah do možných patogenetických mechanizmov.⁵ Efektívnejšiu liečbu umožní až objasnenie ich prepojenosti a vzájomných vzťahov.⁸ Súčasná farmakoterapia Alzheimerovej choroby spočíva v ovplyvňovaní symptomatológie a priebehu ochorenia s cieľom spomaliť progresiu a zlepšiť kognitívne i nekognitívne funkcie.^{5, 26, 27} K dispozícii sú dve hlavné skupiny látok, ktorých používanie je založené na dostatočných dôkazoch: inhibítory cholinesteráz a antagonisty *N*-metyl-D-aspartátových receptorov (jedinou prakticky používanou látkou je memantín).⁸

3.1.4.1 Inhibítory cholínesteráz (kognitíva)

Využitie inhibítorov cholínesteráz vychádza z cholínergnej hypotézy.²⁷ V prípade Alzheimerovej choroby sú dnes liekom prvej voľby²⁸, a to predovšetkým pre štádia ľahkej a stredne ťažkej demencie, ale štúdie dokázali účinky aj pri ťažkých demenciách.^{8,26} Priaznivo ovplyvňujú kognitívne aj behaviorálne symptómy ochorenia²⁶. Základným mechanizmom účinku je inhibícia enzýmov katabolizujúcich acetylcholín, tj. inhibícia acetylcholínesterázy, prípadne i butyrylcholínesterázy. Tým dochádza k zvýšeniu aktivity acetylcholínu v synaptickej štrbine a posilneniu cholínergnej neurotransmisie. Jednotlivé látky odlišuje navzájom podrobnejšia farmakologická a klinická charakteristika.²⁸ V súčasnej dobe sú v Českej republike k dispozícii tri látky: donepezil, rivastigmín a galantamín.^{8,28}

3.1.4.1.1 Syntetické látky

3.1.4.1.1.1 Donepezil

Donepezil je po chemickej stránke derivát piperidínu. Vyvoláva reverzibilnú a nekompetitívnu inhibíciu acetylcholínesterázy. Pôsobenie na butyrylcholínesterázu je relatívne slabé, má teda malý účinok v oblasti periférie. Je obvykle dobre znášaný.²⁹

3.1.4.1.1.2 Rivastigmín

Rivastigmín, ktorého chemická štruktúra vychádza z kyseliny karbámovej³⁰, je duálny inhibítor, súčasne blokuje obe formy cholínesterázy. Blokáda má pseudoreverzibilný charakter (látka je do svojej metabolizácie viazaná na enzým niekoľko desiatok minút, inhibícia však pretrváva až 12 hodín), čo prispieva k minimu nežiadúcich účinkov.²⁸

3.1.4.1.2 Látky prírodného pôvodu

Prírodné látky sa ukázali byť perspektívnym zdrojom štruktúr s terapeutickým potenciálom. Inhibičný účinok na cholínesterázy prejavili napríklad niektoré alkaloidy.

3.1.4.1.2.1 Galantamín

Galantamín je benzoazepínový alkaloid³¹, po prvý raz bol izolovaný z *Galanthus woronowi* z čeľade Amaryllidaceae.¹⁵ Bol zistený i v iných čeľadiach (napríklad Agavaceae), rastliny z Amaryllidaceae sú ale najbohatším prírodným zdrojom. Galantamín reverzibilne a prakticky selektívne inhibuje acetylcholinesterázu. Okrem toho pôsobí ako alosterický modulátor na nikotínových receptoroch. Modulácia zahŕňa zvýšenie afinity acetylcholínu k väzbe na receptor a zvýšenie priepustnosti jeho iónového kanálu. To podporuje uvoľňovanie acetylcholínu i ďalších neuromediátorov a priaznivo ovplyvňuje kognitívne funkcie i behaviorálne a psychologické symptómy choroby.³² Slúži tiež ako štandard pri posudzovaní inhibičnej aktivity voči acetylcholinesteráze.¹⁵

3.1.4.1.2.2 Huperzín A

Huperzín A je seskviterpénový alkaloid³³, po prvý raz izolovaný z *Huperzia serrata*¹⁵ z čeľade Huperziaceae³⁴. *H. serrata* má uplatnenie v tradičnej čínskej medicíne pri liečbe horúčky, zápalov, schizofrénie. Huperzín A je silný reverzibilný inhibítor acetylcholinesterázy, účinný v nanomolárnych koncentráciách. Okrem toho potláča úbytok neurónov, ktorý je zapríčinený neurotoxicitou sprostredkovanou glutamátom. Výhodné farmakologické vlastnosti a minimum vedľajších účinkov vzbudzujú záujem; v ČLR je klinické vyhodnocovanie už vo štvrtej fáze.³³ Je možné očakávať, že huperzín A sa dostane v dohľadnej dobe na zoznam liečiv určených pre terapiu Alzheimerovej choroby.¹⁵

3.2 *Peumus boldus* Mol.

3.2.1 Popis rastliny

Peumus boldus Mol., slovensky boldovník liečivý³⁵, česky boldovník vonný³⁶, z čeľade Monimiaceae (boldovníkovité) je vždyzelený dvojdomý až 6 metrov vysoký ker alebo malý strom s hustou korunou³⁷. Rastie hojne v centrálnom Čile, medzi 33° a 39° južnej šírky, v oblasti so stredozemskou klímou¹⁷, na suchých a slnečných pahorkatinách, kde spolu s ďalšími krovinami tvorí husté húštiny. Vytvára hroznovité súkvetia bielych alebo žltých výrazne voňavých kvetov s početnými tyčinkami. Plodom sú žltasté aromatické kôstkovice.³⁷

Vo farmácii sa uplatňuje list tvoriaci drogu *Boldo folium*³⁸, okrem toho sa listy v Čile používajú ako korenina a pre garbiarske a farbiarske účely sa využíva tiež kôra s obsahom trieslovín³⁷.

3.2.2 *Boldo folium* (boldovníkový list)

Listy majú šedo-zelené sfarbenie, sú silné, tuhé a krehké³⁸, 3 až 6 cm dlhé a 2 až 4 cm široké³⁷, s krátkou listovou stopkou. Listový vrchol je tupý, slabo zašpicatený alebo hrotitý, na báze sú listy uťaté alebo zaokrúhlené. Listová čepeľ má tvar vajcovitý alebo elipsovité, je celistvookrajová, mierne zvlnená, jej okraj je zhrubnutý a mierne podvinutý. Vrchná strana čepele je drsná, s mnohými malými vyklenutými hrboľčkami a s vpadnutou perovitou žilnatinou, na spodnej strane je žilnatina vyklenutá a hrboľčky sú menej zreteľné³⁸ (obrázok 1).

Mikroskopické pozorovanie upráškovanej drogy ukazuje charakteristický obraz³⁸: pod pokožkou vrchnej strany listu sa nachádza hypoderma pozostávajúca z jedného až troch radov buniek³⁷ s rovnými alebo mierne zvlnenými ružencovito zhrubnutými stenami³⁸; hypoderma je miestami rozšírená do viacvrstvých hrboľčiek nesúcich krycie trichómy³⁷. Po hypoderme nasleduje dvojradý palisádový parenchým a hubovitý parenchým, v ktorom sú prítomné veľké okrúhle silicové bunky; bunky hubovitého parenchýmu obsahujú jemné ihličkovité kryštály. Na spodnej strane listovej čepele sú početné prieduchy, ktoré sprevádza štyri až sedem podporných buniek³⁸, a prítomné trichómy sú zasadené v pokožke bez hrboľčiek³⁷. Krycie trichómy sú jednobunkové, dvojklanné alebo hviezdicovito usporiadané³⁸. Cievne zväzky sprevádzajú sklerenchymatické vlákna³⁷ a zdrevnatelé bodkované parenchymatické bunky³⁸.

Droga má charakteristický pach.³⁸ Je výrazne korenistý, pripomína askaridol a mäta piepornú.³⁷



Obr. 1 Snímka rozdrobeného usušeného listu boldovníka; zreteľný je tuhý a krehký charakter drogy, hrboľčeka lícnej strany a žilnatina vystupujúca na rubovej strane čepele

3.2.3 Obsahové látky

Boldovník, predovšetkým jeho list, v menšej miere i kôra, je z pohľadu sekundárnych metabolitov zaujímavý a využívaný najmä pre obsah silice a fenolických látok *sensu lato* a alkaloidov.

3.2.3.1 Silica

Boldovníkové listy obsahujú približne 2 % silice; Schindler³⁹ uvádza 2 % až 2,6 %, podiel, ktorý získali destiláciou suchých listov s vodnou parou Urzua et al.⁴⁰, predstavoval 2 %. Bruns a Koehler⁴¹ identifikovali s využitím plynovej chromatografie a hmotnostnej spektrometrie 38 zložiek, Miraldi et al.⁴² a Vila et al.⁴³ až 46, Urzua et al.⁴⁰ zmieňujú 18 látok. Podľa Vila et al.⁴³ pozostáva silica prakticky z monoterpénov (90,5 %).

Údaje o jednotlivých zložkách a ich zastúpení sa do značnej miery rôznia. Ako hlavné zložky boli najčastejšie identifikované askaridol (Bruns a Koehler⁴¹ cca 16 %; Miraldi et al.⁴² cca 21 %, resp. 39 %; Urzua et al.⁴⁰ cca 6 %), 1,8-cineol (Bruns a Koehler⁴¹ 16,0 %; Miraldi et al.⁴² a Vila et al.⁴³ cca 12 %; Urzua et al.⁴⁰ cca 27 %) a *p*-cymén (Bruns a Koehler⁴¹ cca 29 %; Vila et al.⁴³ cca 14 %; Urzua et al.⁴⁰ cca 27 %). Podľa Vila et al.⁴³ mal najvyššie percentuálne zastúpenie limonén (17,0 %). Okrem týchto uvádzajú sa tiež sabinén, 4-terpineol, β -pinén⁴⁰, β -felandrén⁴³ a ďalšie.

3.2.3.2 Fenolické látky

Simirgiotis a Schmeda-Hirschmann⁴⁴, ktorí chromatografickými metódami analyzovali vodné nálevy pripravené z boldovníkových listov, zistili v droge viac ako 40 fenolických látok: predovšetkým 26 flavonolových glykozidov (aglykóny ktorých boli kvercetín, izoramnetín a kempferol), (+)-katechín, 20 proantocyanidínov s rôznym stupňom polymerizácie (dimér až tetramér) a fenolické kyseliny (ferulová, hydroxychlorogenová, kávová a syringová). Autori pripúšťajú možnú variáciu obsahu fenolických látok v závislosti od pohlavia a miesta výskytu zdrojovej rastliny.

3.2.3.3 Alkaloidy

Prítomnosť alkaloidov bola zaznamenaná v listoch^{45, 46, 47, 48} i kôre^{49, 50, 51}. Zastúpenie jednotlivých látok a ich množstvo v orgánoch rastliny je do určitej miery rozdielne. Obsah alkaloidov ovplyvňujú tiež niektoré faktory, napríklad intenzita svetla počas rastu listov a obdobie ich zberu.⁵² Podiel alkaloidov v kôre (v súvislosti s ich predpokladanou úlohou v patofyziologických procesoch) môže významne závisieť na stresových podmienkach prostredia, na veku rastliny, okolnostiach skladovania a podobne.¹⁶

Analýza alkaloidných frakcií z listov boldovníka pomocou chromatografických metód odhalila minimálne 17 látok⁴⁶, ktoré sa chemickou štruktúrou radia do rozsiahlej skupiny derivátov benzylizochinolínu^{17 (1)} (tabuľka 1). Za hlavný alkaloid boldovníka – listovej drogy i kôry – je považovaný boldín¹⁶ (obrázok 2).

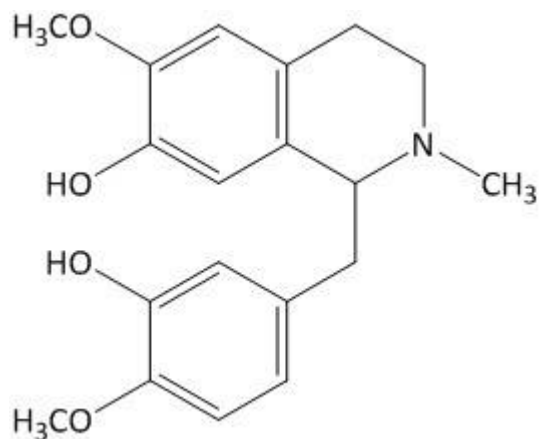
⁽¹⁾ Zaujímavý je údaj o výskyte chinolizidínového alkaloidu sparteínu v listovej droge, ktorý uvádzajú Schindler³⁹ a Valonzuela a Rebolledo⁵⁴. Vzhľadom na to, že neskoršia literatúra sa o sparteíne nezmieňuje³⁷, a na odlišnú biosyntetickú cestu vzniku ako u benzylizochinolínových alkaloidov, je namieste zdržanlivosť k faktu jeho prítomnosti v *Peumus boldus* Mol.

Tab. 1 Niektoré z alkaloidov *Peumus boldus* Mol.; zvýraznené sú tie, ktoré boli podľa dostupných údajov v literatúre identifikované v listovej droge

Alkaloid	Štruktúrny typ
boldín ³⁹	aporfinový
izoboldín ⁴⁶	aporfinový
6a,7-dehydroboldín ⁵⁰	aporfinový
glaucín ⁵³	aporfinový
izokorydín ⁴⁵	aporfinový
norizokorydín ⁴⁵	aporfinový
izokorydín-N-oxid ⁴⁸	aporfinový
laurotetanín ⁴⁷	aporfinový
N-metyllaurotetanín ⁴⁵	aporfinový
larolitsín ⁴⁷	aporfinový
pronuciferín ⁴⁹	proaporfinový
sinoakutín ⁴⁹	morfínanový
retikulín ⁴⁶	benzyltetrahydroizochinolínový
koklaurín ⁵¹	benzyltetrahydroizochinolínový

Alkaloid	Substituenty						
	R ¹	R ²	1	2	3	4	5
boldín	CH ₃	–	OH	OCH ₃	–	OCH ₃	OH
izoboldín	CH ₃	–	–	OCH ₃	–	OH	OCH ₃
izokorydín	CH ₃	–	–	OCH ₃	OH	OCH ₃	OCH ₃
norizokorydín	H	–	–	OCH ₃	OH	OCH ₃	OCH ₃
izokorydín-N-oxid	CH ₃	O ⁻	–	OCH ₃	OH	OCH ₃	OCH ₃
laurotetanín	H	–	OH	OCH ₃	–	OCH ₃	OCH ₃
N-metyllaurotetanín	CH ₃	–	OH	OCH ₃	–	OCH ₃	OCH ₃
larolitsín	H	–	OH	OCH ₃	–	OCH ₃	OH

Obr. 2 Štruktúra aporfinových alkaloidov *Boldo folium* (upravené podľa Blaschek et al.³⁷)



Obr. 3 Štruktúra retikulínu

3.2.3.3.1 Obsah

Celkový obsah alkaloidov v liste sa pohybuje najčastejšie medzi 0,2 % až 0,5 % hmotnosti zdrojovej drogy. Schindler³⁹ udáva 0,25 % až 0,535 %, podľa Rüeeggera⁴⁵ tvoria alkaloidy 0,4 % až 0,5 % hmotnosti materiálu sušených listov. Na alkaloidy bohatá vzorka drogy, s ktorou pracoval Vanhaelen⁴⁸, obsahovala až 0,70 % alkaloidov.

O celkovom obsahu alkaloidov v kôre del Valle et al.¹⁶ tvrdia (s odvolaním na Cassels a Speisky⁵⁵), že približne 75 % kôrových alkaloidov zodpovedá boldínu, a ďalej uvádzajú, že jeho obsah variuje od 2,6 % (s odvolaním na Cassels a Speisky⁵⁵) do 6,3 % (s odvolaním na Urzua a Acuna⁴⁹) hmotnosti.

Údaje o množstve alkaloidov, ktoré uvádza literatúra, môžu závisieť na zvolenej analytickej metóde.¹⁶

3.2.3.3.2 Metódy izolácie

Všeobecný postup izolácie alkaloidných látok z rastlinného materiálu spočíva v získaní sumárneho extraktu, ktorý by obsahoval všetky alkaloidy prítomné v listovej droge, a v jeho následnom prečistení. Pri tom možno s výhodou využiť prítomnosť dusíkového atómu v molekule. U primárnych, sekundárnych a terciárnych alkaloidov disponuje dusíkový atóm voľným elektrónovým párom, ktorý pôsobí ako Lewisova báza. Vhodnými opakovanými úpravami pH extrakčných činidiel dochádza k rozdeleniu alkaloidov medzi nepolárne organické rozpúšťadlá a vodnú fázu. Rüeegger⁴⁵ listovú drogu upravil zvlhčením 5% hydroxidom amónnym a následne extrahoval alkaloidy nepolárnym organickým rozpúšťadlom. Po jeho odparení a rozpustení odparku v metanole získal sumárny extrakt.

Speichert et al.⁵⁶ extrahovali alkaloidy z listov acidifikovanou vodou, z ktorej po alkalizácii reextrahovali alkaloidy trichlóretylénom, následne 10% hydrogénsíranom sodným a chloroformom. Po zahustení previedli alkaloidný extrakt do nepolárneho organického rozpúšťadla (petroléter) a prítomné alkaloidy separovali. Van Hulle et al.⁵⁷ získali extrakty perkoláciou etanolom.

Na separáciu jednotlivých alkaloidov sa najčastejšie používajú chromatografické metódy. Rügger⁴⁵ vykonal kvalitatívnu analýzu pomocou papierovej chromatografie (formamid ako stacionárna fáza, zmesi chloroformu a butanolu ako mobilná fáza), na ďalšie prečistenie použil oxid hlinitý. Vanhaelen⁴⁸ založil separáciu na chromatografii s kyslým oxidom hlinitým a následnej extrakcii eluátov. Jednotlivé alkaloidy identifikoval pomocou tenkovrstvovej chromatografie na silikagéli.

3.2.3.3.3 Biologická aktivita

Alkaloidy sú látky s veľkým potenciálom interagovať so štruktúrami organizmov, ako sú receptorové komplexy či enzýmy. Dôsledkom je široké spektrum ich biologických účinkov. Niektoré alkaloidy sú tiež schopné zasiahnuť do oxidačných procesov sprostredkovaných radikálovými časticami a ovplyvňovať tak určité patologické stavy. Alkaloidy prítomné v listoch boldovníka (tabuľka 1) boli v minulosti i v súčasnej dobe predmetom výskumu, ktorý prakticky u všetkých viedol k popisu biologickej aktivity.

3.2.3.3.3.1 Antioxidačná aktivita

Schmeda-Hirschmann et al.⁵⁸ dokázali, že vodný extrakt boldovníkových listov má schopnosť zhášať voľné radikály (FRS). V teste schopnosti inhibovať peroxidáciu lipidov v erythrocytoch prejavil boldín ($IC_{50} = 12,5 \mu\text{g/ml}$) približne šesťkrát vyššiu aktivitu ako (+)-katechín ($IC_{50} = 75,6 \mu\text{g/ml}$). Napriek tomu, ako vyplynulo z ďalších analýz, FRS účinok extraktu je odvodený najmä od prítomných fenolických látok, predovšetkým (+)-katechínu, keďže stanovený pomer obsahu (+)-katechínu a celkového obsahu alkaloidov, počítaného ako boldín, v droge bol 37:1. K podobným záverom dospeli i Quezada et al.⁵⁹ Zo starších prác dokazujúcich antioxidačné vlastnosti boldínu možno zmieniť štúdiu z roku 1991, v ktorej Valenzuela et al.⁶⁰ popísali jeho schopnosť inhibovať spontánnu i indukovanú oxidáciu rybieho oleja. Okrem boldínu prejavili významné antioxidačné vlastnosti tiež ďalšie alkaloidy. Údaje o schopnosti izoboldínu inhibovať peroxidáciu lipidov prezentovali vo svojej práci Martinez et al.⁶¹ Lee et

al.⁶² stanovili inhibičnú aktivitu izokorydínu voči oxidácii LDL $IC_{50} = 2,4 \mu M$ (pre porovnanie: hodnota aktivity probukolu, ktorý v teste použili pre pozitívnu kontrolu, bola $IC_{50} = 6,8 \mu M$). Podľa výsledkov štúdie autorov Arango et al.⁶³ prejavil *N*-metyllaurotetanín v porovnaní s butylhydroxyanizolom, ktorý použili ako štandard, miernu schopnosť FRS (NmLT: $IC_{50} = 90,6 \mu M$; BHA: $IC_{50} = 44,4 \mu M$). FRS vlastnosti niekoľkých izolovaných alkaloidov vrátane boldínu, norizokorydínu, laurotetanínu, *N*-metyllaurotetanínu, laurólitsínu a retikulínu skúmali Zhao et al.⁶⁴ Všetky menované látky prejavili s rôznou intenzitou pozoruhodnú schopnosť zhasť DPPH radikály, aporfínové alkaloidy boli však všeobecne účinnejšie ako retikulín. Najvyššia aktivita bola stanovená u norizokorydínu ($SC_{50} = 14,1 \mu g/ml$).

3.2.3.3.2 Účinky súvisiace s antioxidačnou aktivitou

Niektoré štúdie uvádzajú cytoprotektívne, antinocicepčné a ďalšie účinky, ktoré vyplývajú z uvedených antioxidačných, respektíve FRS vlastností alkaloidov. V tomto zmysle sa výskum zamerá predovšetkým na hlavný alkaloid boldín.

V devädesiatych rokoch minulého storočia boli uverejnené štúdie, v ktorých autori popisujú *in vitro* protektívne vlastnosti boldínu^{61, 65, 66, 67, 68} i izoboldínu⁶¹ pred oxidačným poškodením hepatocytov, respektíve pečňových mikrozómov navodeným rôznymi chemickými noxami. Fernandez et al.⁶⁹ pozorovali, že nálev z boldovníkových listov významne obmedzil peroxidáciu lipidov v pečeni pokusných myší, ktorým bola podaná cisplatina. Autori predpokladajú, že tento ochranný účinok je odvodený od antioxidantov obsiahnutých v náleve, predovšetkým (+)-katechínu a boldínu.

Na cytoprotektívny efekt antioxidačne pôsobiaceho boldínu na vaskulárny systém poukazujú práce autorov Santanam et al.⁷⁰ a Lau et al.⁷¹. Santanam et al.⁷⁰ študovali *in vitro* a *in vivo* vplyv na tvorbu aterosklerotických zmien. Boldín v závislosti na dávke vyvolal pokles hladiny protilátok proti modifikovaným plazmatickým proteínom a tiež mierne znížil plazmatickú hladinu celkového cholesterolu i LDL a mierne zvýšil hladinu triglyceridov. Výsledný 40% pokles tvorby aterosklerotických zmien u pokusných myší v porovnaní s kontrolnou skupinou prisudzujú autori predovšetkým antioxidačným vlastnostiam alkaloidu. Vplyv boldínu na dysfunkciu endotelu v modeli hypertenzie skúmali Lau et al.⁷¹ Vychádzali z tézy, že sa na jej vzniku podieľa oxidačný stres. Použitie boldínu v skupine spontánne hypertenzných myší endotelialne funkcie zlepšilo. Podľa autorov sa na výsledkoch podieľala inhibícia tvorby superoxidu.

Na základe výsledkov svojej štúdie Youn et al.⁷² vyvodzujú, že boldín prostredníctvom schopnosti inhibovať tvorbu melanínu a oxidáciu tiolových funkcií a zhášať kyslíkové radikály dokáže zmierniť mitochondriálnu dysfunkciu v mozgu, ktorú vyvolala oxidácia katecholamínov. V prípade buniek použitých v experimente prejavil schopnosť obmedziť apoptózu indukovanú dopamínom. Konrath et al.⁷³ vystavili *in vitro* nervové tkanivo hipokampu krysy podmienkam glukózovej a kyslíkovej deprivácie a následnej reoxigenácii. Tieto okolnosti napodobňujúce podmienky ischemie mali významne negatívny dopad na životaschopnosť buniek, autori zaznamenali zvýšený únik laktátdehydrogenázy do inkubačného média a zvýšenú tvorbu voľných radikálov. Vo vzorkách tkaniva, ktoré boli počas expozície uvedeným podmienkam a po nej inkubované v prítomnosti boldínu v koncentrácii 10 μ M, sa prejavila zvýšená životaschopnosť buniek. Autori tiež uvádzajú, že vo vyšších koncentráciách (100 μ M) má boldín prooxidačné účinky a môže spôsobiť tkanivové poškodenie.

Zhao et al.⁶⁴ skúmali v dvoch *in vivo* experimentoch antinocicepčné účinky boldínu, norizokorydínu, laurotetanínu, *N*-metyllaurotetanínu, laurólitsínu a retikulínu. V prvom experimente všetky testované alkaloidy znateľne potlačili u myši v dávke 20 mg/kg t. h. prejavy bolesti (abdominálne kontrakcie) vyvolané intraperitoneálnou aplikáciou roztoku kyseliny octovej. Norizokorydín mal spomedzi testovaných alkaloidov najvyššiu aktivitu, s 83,5% inhibíciou prejavov dokonca prekonal referenčnú látku indometacín, ktorá v dávke 10 mg/kg t. h. navodila 67,8% inhibíciu. Druhý experiment mal ukázať, či sa na pozorovanom antinocicepčnom účinku podieľa centrálné pôsobenie. Autori sledovali, koľko času strávili pokusné myši olizovaním miesta aplikácie po vstreknutí roztoku formaldehydu do zadnej končatiny. Všetky alkaloidy v dávke 20 mg/kg t. h. do určitej miery skrátili v priebehu prvých piatich minút (tj. fáza I; bolesť vyvolaná priamou stimuláciou C vlákien) dobu prejavov v porovnaní s kontrolnou skupinou, čo naznačuje účasť centrálného antinocicepčného pôsobenia. Norizokorydín opäť prejavil najvyššiu aktivitu, navodil 47,5% inhibíciu. Pre porovnanie: referenčná látka morfín (5 mg/kg t. h.) vyvolala 86,7% inhibíciu, indometacín (10 mg/kg t. h.) 9,6% inhibíciu prejavov vo fáze I. Autori na základe výsledkov štúdie predpokladajú, že vyššie zmienená FRS aktivita úzko súvisí s popísanými antinocicepčnými účinkami testovaných alkaloidov.

3.2.3.3.3 Aktivita na receptoroch pre neurotransmitery

Boldín pôsobí na α -adrenergných receptoroch ako antagonist. ^{74, 75, 76} Prejavuje približne 25-krát vyššiu afinitu k podtypu α_{1A} ako k podtypu α_{1B} a 15-krát vyššiu v porovnaní s afinitou k podtypu α_{1D} . Väzbová afinita k podtypom α_{2A} , α_{2B} a α_{2C} dosahuje porovnateľnú úroveň. ⁷⁶ Boldín pôsobí *in vitro* ako antagonist na D_1 a D_2 receptoroch pre dopamín, avšak podľa *in vivo* experimentov prejavuje v mozgu len slabú antidopamínernú aktivitu; jedným z vysvetlení je v tomto smere nepriaznivý charakter jeho farmakokinetiky. ⁷⁷ Chung et al. ⁷⁸ uvádzajú, že boldín prostredníctvom kompetitívnej väzby pôsobí na 5-HT_{2A} receptoroch ako agonista alebo antagonist. Na základe *in vitro* experimentu, v ktorom boldín v závislosti na dávke inhiboval kontrakcie denervovanej myšej bránice navodené acetylcholínom ($IC_{50} = 13,5 \mu\text{M}$), predpokladajú Kang et al. ⁷⁹ schopnosť priamej interakcie medzi boldínom a postsynaptickými nikotínovými receptormi. V centrálnom nervovom systéme hmyzu pôsobí boldín ako špecifický antagonist nikotínových cholínergných receptorov. ⁸⁰

V súvislosti s pozorovaným vazorelaxačným účinkom izokorydínu na izolovanú krysú aortu Sotnikova et al. ⁸¹ pripúšťajú jeho možný antagonizmus na α_1 -adrenergných receptoroch.

3.2.3.3.4 Vplyv na hladkú a srdcovú svalovinu

Viacero štúdií ^{82, 81, 83} uvádza relaxačný efekt izokorydínu na hladkú svalovinu pokusných zvierat. Účinok je pravdepodobne sprostredkovaný aktiváciou guanylátcyklázy ⁸³ a inhibíciou influxu vápenatých katiónov do bunky i uvoľnenia intracelulárnych zásob vápenatých katiónov ^{82, 81}. Izokorydín tiež ovplyvňuje elektrické deje nervového tkaniva a svaloviny srdca. ^{84, 85, 86} Chen et al. ⁸⁷ študovali pôsobenie laurotetanínu na izolovanú krysú aortu. V závislosti od dávky inhiboval laurotetanín kontrakcie vyvolané draselnými a vápenatými katiónmi, inhiboval tiež kontrakcie navodené fenylefrínom. Autori predpokladajú, že vazorelaxačný účinok je sprostredkovaný potlačením influxu vápenatých katiónov kanálmi riadenými napätím i kanálmi spriahnutými s receptormi. I v prípade retikulínu je interakcia s kanálmi pre vápenaté katióny, ktorá vedie k poklesu cytosolickej koncentrácie vápenatých katiónov, pravdepodobne hlavnou príčinou jeho relaxačných účinkov na hladkú svalovinu. ^{88, 89}

3.2.3.3.3.5 Neurologická aktivita

Boldín v experimente na myšiach⁹⁰ inhiboval stereotypické chovanie, ktoré bolo navodené metylfenidátom a apomorfinom, inhiboval stávanie sa na zadné končatiny a navodil pokles očných viečok, katalepsiú a hypotermiu. Predĺžil trvanie anestézie vyvolanej tiopentalom a voči pôsobeniu harmánu a pikrotoxínu účinkoval antikonvulzívne. Autor tiež pozoroval vplyvom boldínu znížené vnímanie bolestivých podnetov. Antinocicepčné účinky boldínu, izokorydínu a niektorých ďalších alkaloidov uvádzajú i Zhao et al.⁶⁴ Izokorydín inhiboval u krýs podmienené únikové reflexy, u mačiek vyvolal saliváciu, lakrimáciu, katalepsiú a poruchu koordinácie. Podobné účinky sa prejavili i na psoch.⁹¹ Watanabe et al.⁹² študovali vplyv retikulínu na dopamínerný systém. V dávke 100 µg/zviera vyvolal u pokusných myší katalepsiú a pokles pohybovej aktivity.

3.2.3.3.3.6 Vplyv na pôvodcov infekčných ochorení, antineoplastická aktivita

Zo štúdie autorov Boustie et al.⁹³ vyplýva, že alkaloid *N*-metyllaurotetanín má inhibičnú aktivitu voči cytopatickému efektu vírusu poliomyelitídy typu 2. U laurilitínu je táto aktivita slabá, podľa Zhanga et al.⁹⁴ ale prejavil výrazný inhibičný efekt na integrázu HIV-1.

Niektoré štúdie^{95, 96} popisali účinok izokorydínu proti kmeňom *Plasmodium falciparum*. Schopnosť boldínu inhibovať rast epimastigotov *Trypanosoma cruzi* študovali Morello et al.⁹⁷ Autori predpokladajú, že látka môže v súvislosti s antioxidačnou aktivitou pôsobiť prostredníctvom blokády transportu elektrónov v mitochondriách trypanozóm. Antiprotozoálnu aktivitu niektorých boldovníkových alkaloidov skúmali i Fournet et al.⁹⁸ a Mollataghi et al.⁹⁹ V práci Mollataghiho et al.⁹⁹ prejavili boldín, izoboldín a laurilitín tiež zaujímavú antifungálnu aktivitu.

Izokorydín disponuje silným antibakteriálnym účinkom na stafylokoky.¹⁰⁰

Gerhardt et al.¹⁰¹ skúmali potenciál boldínu pôsobiť antiproliferatívne na niektoré gliómové bunkové línie. Antineoplastickú aktivitu u laurotetanínu a *N*-metyllaurotetanínu uvádzajú Wang et al.¹⁰²

3.2.3.3.3.7 Vplyv na imunitný systém

Z in vitro štúdie¹⁰³ vyplýva, že boldín je efektívny inhibítor biosyntézy prostaglandínov. To je pravdepodobne v priamej súvislosti s jeho *in vivo* pozorovaným antipyretickým

a protizápalovým účinkom. Protizápalové pôsobenie boldínu pozorovali i Gotteland et al.¹⁰⁴ v experimentálnom modeli akútnej kolitídy. Alkaloid obmedzil edém a tiež zredukoval infiltráciu tkaniva neutrofilmi. Philipov et al.¹⁰⁵ a Zhang et al.⁹⁴ zaznamenali schopnosť izoboldínu potlačiť indukovanú proliferáciu splenocytov.

3.2.3.3.8 Ďalšie biologické účinky

U boldínu bol zaznamenaný protektívny efekt pred UV radiáciou.^{106, 107}

Ishihara et al.¹⁰⁸ a Yadav et al.¹⁰⁹ popisujú gastroprotektívne účinky boldínu, izokorydínu a laurólitsínu.

Po podaní boldínu a *N*-metyllaurotetanínu pozorovali Chi et al.¹¹⁰ od dávky závislý pokles hladiny glukózy v plazme normálnych i diabetických pokusných krýs. Lin et al.¹¹¹ zaznamenali, že boldín, izokorydín, norizokorydín, *N*-metyllaurotetanín a laurólitsín majú určitý inhibičný efekt na intestinálnu absorpciu glukózy, respektíve na glukózové transportéry SGLT1 a GLUT2.

Boldín, laurotetanín, *N*-metyllaurotetanín, laurólitsín a retikulín disponujú antiagregačnou aktivitou.^{112, 113, 114}

Zo štúdií^{115, 116, 117} o genotoxicite boldínu vyplýva, že boldín neprejavil žiadne, alebo prejavil len slabé ovplyvnenie genetickej informácie pokusných organizmov.

Kubinova et al.¹¹⁸ a Salminen et al.¹¹⁹ popisujú schopnosť boldínu, respektíve izokorydínu inhibovať enzýmy, ktoré sa zúčastňujú na metabolizácii xenobiotík. Inhibičné pôsobenie izokorydínu voči butyrylcholínesteráze študovali Ulrichová et al.¹²⁰ a jeho inhibičný efekt voči acetylcholínesteráze Hung et al.¹²¹ V roku 2012 študovali vplyv troch alkaloidov prítomných v *Peumus boldus* Mol. (boldínu, izoboldínu a laurotetanínu) na acetylcholínesterázu Mollataghi et al.⁹⁹ Laurotetanín prejavil výraznú inhibičnú aktivitu ($IC_{50} = 3,2 \mu M$), porovnateľnú s aktivitou huperzínu A ($IC_{50} = 1,8 \mu M$).

3.2.4 Účinok a použitie

Spektrum indikácií pre *Boldo folium* je relatívne široké a nie vždy odôvodnené.¹⁷ Najčastejšie sa uplatňuje v liečbe dyspeptických porúch, hepatobilárnych ochorení a gastrointestinálnych spazmov.⁴⁴ Blaschek et al.³⁷ ďalej zmieňuje účinok anthelmintický, sedatívny, diuretický a antireumatický, priaznivé pôsobenie pri dne, syfílidle a kvapavke. Uplatňuje sa aj v homeopatii. Príliš vysoké dávky drogy pôsobia emeticky a prehŕňavo.

4 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

4.1 Všeobecné postupy

4.1.1 Príprava a uchovávanie rozpúšťadiel

Rozpúšťadlá boli pred použitím prečistené destiláciou. Prvých cca 5 % objemu predestilovaného rozpúšťadla bolo kvôli nožnej prítomnosti vodného azeotropu zachytených a odstránených. Objem hlavnej frakcie predstavoval maximálne 95 %.

Predestilované rozpúšťadlá boli uchovávané v nádobách z hnedého skla.

4.1.2 Odparovanie rozpúšťadiel z roztokov

Rozpúšťadlá z chromatografických frakcií boli odparované pomocou rotačnej vákuovej odparky za zníženého tlaku a pri teplote 40 °C.

Rozpúšťadlá z roztokov alkaloidov, ktoré boli určené k štúdiu biologickej aktivity, boli rýchlo odparené prúdom vzduchu v 5ml injekčných ampuliach vo vodnom kúpeli s teplotou 60 °C. Po vysušení boli ampule s odparkami naplnené argónom, zatavené a uchovávané pri -22 °C.

4.1.3 Sušenie látok

Sušenie látok prebiehalo za zníženého tlaku (1,33 kPa) a izbovej teploty v zatemnenom exsikátore pomocou silikagélu po dobu 24 hodín.

4.1.4 Tenkovrstvová chromatografia

Chromatografia na tenkej vrstve bola vykonaná vzostupne v systéme normálnych komôr. Sýtenie komôr mobilnou fázou prebiehalo 30 minút.

4.1.5 Stĺpcová chromatografia

Stĺpcová chromatografia bola vykonaná s využitím gradientovej elúcie. Stĺpec bol naplnený naliatím suspenzie adsorbentu v rozpúšťadle. Separovaný extrakt bol nanášaný vo forme triturácie s adsorbentom.

4.2 Potreby

4.2.1 Rozpúšťadlá

Benzín, p.a.

Destilovaná voda

Dietylamín, p.a. (Et₂NH)

Dietyléter, p.a. (Et₂O)

Etanol 95%, č. denaturovaný metanolom (EtOH)

Chloroform, p.a. (CHCl₃)

Toluén, p.a. (C₆H₅CH₃)

4.2.2 Chemikálie

Dusičnan bizmutitý zásaditý, p.a.

Jodid draselný, p.a.

Kyselina chlorovodíková, p.a. (HCl)

Kyselina vínna, p.a.

Síran sodný bezvodý, p.a.

Uhličitan sodný, p.a.

4.2.3 Špeciálne potreby pre štúdie biologickej aktivity

4.2.3.1 Chemikálie

Acetyltiocholínium-jodid (Sigma-Aldrich)

Butyryltiocholínium-jodid (Sigma-Aldrich)

Citrát sodný, č. (Biotika)

2,2-Difenyl-1-pikrylhydrazyl (Sigma-Aldrich)
Dihydrogénfosforečnan sodný bezvodý, p.a. (NaH_2PO_4)
Dimetylsulfoxid, p.a.
Galantamínium-bromid (Changsha Organic Herb Inc., ČĽR)
Huperzín A (Tai'an Zhonghui Plant Biochemical Company Ltd., ČĽR)
Chlorid sodný, p.a.
Kvercetín, č. (Sigma-Aldrich)
Kyselina 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoová, č.
Trolox, č. (Sigma-Aldrich)

4.2.3.2 Pufre

P 1: Fosfátový pufer (pH 7,4) 5mM

Roztok *a*: 10mM roztok NaH_2PO_4 : 1,20 g NaH_2PO_4 (alebo 1,38 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ alebo 1,56 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) sa rozpustí v 1000 ml vody.

Roztok *b*: 10mM roztok Na_2HPO_4 : 1,42 g Na_2HPO_4 (alebo 1,78 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ alebo 3,58 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) sa rozpustí v 1000 ml vody.

Zmieša sa 57 ml roztoku *a* s 283 ml roztoku *b* a 300 ml vody.

P 2: Fosfátový pufer (pH 7,4) 5mM

V pufri sa rozpustí toľko chloridu sodného, aby vznikol 150 mM roztok.

P 3: Fosfátový pufer (pH 7,4) 100mM

Roztok *a*: 200mM roztok NaH_2PO_4 : 24,0 g NaH_2PO_4 (alebo 27,6 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ alebo 31,2 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) sa rozpustí v 1000 ml vody.

Roztok *b*: 200mM roztok Na_2HPO_4 : 28,4 g Na_2HPO_4 (alebo 35,6 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ alebo 71,63 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) sa rozpustí v 1000 ml vody.

Zmieša sa 57 ml roztoku *a* s 243 ml roztoku *b* a 300 ml vody.

4.2.3.3 Cholinesterázy

Acetylcholinesteráza použitá k stanoveniu inhibičnej aktivity pochádzala z puzdier ľudských erytrocytov, použitá butyrylcholinesteráza pochádzala z ľudskej plazmy.

Podľa upravenej metódy¹²² bola zdravým dobrovoľníkom odobratá krv, ku krvi bol pridaný citrát sodný (1 ml 10% roztoku na 10 ml krvi) a s použitím centrifúgy (4000 ot./min.; Boeco U-32R, rotor Hettich 1611) bola oddelená plazma.

Erythrocyty, premiestnené do 50ml skúmaviek, boli trikrát premyté pufrom P 2 (12000 ot./min.; Avanti J-301, rotor JA-30.50). Premyté erythrocyty boli následne 10 minút miešané s pufrom P 1, čím došlo k ich rozrušeniu. Lyzát erythrocytov bol centrifugovaný pri 20000 ot./min. Vzniknulé puzdrá erythrocytov boli premyté trikrát pufrom P 1, adjustované do mikroskúmaviek a uchovávané pri teplote -22 °C do doby použitia.

4.2.4 Detekčné činidlá

D 1: Dragendorffovo činidlo podľa Muniera

Roztok *a*: 1,7 g zásaditého dusičnanu bismutitého a 20 g kyseliny vínnej sa rozpustí v 80 ml vody.

Roztok *b*: 16 g jodidu draselného sa rozpustí v 40 ml vody.

Zásobný roztok: roztoky *a* a *b* sa zmiešajú v objemovom pomere 1:1.

Detekčný roztok: 5 ml zásobného roztoku sa pridá k roztoku 10 g kyseliny vínnej v 50 ml vody.

4.2.5 Vytvárajúce systémy pre tenkovrstvovú chromatografiu

S 1: C₆H₅CH₃-CHCl₃-EtOH-Et₂NH 70:20:10:5

4.2.6 Chromatografické adsorbenty

A 1: Oxid hlinitý neutrálny 40-250 µm, deaktivovaný 6 % vody (ACROSS LachNer, Neratovice)

A 2: Silikagel Merck, UV 254 nm ind.

4.3 Izolácia alkaloidu

4.3.1 Príprava chloroformového extraktu z listov *Peumus boldus* Mol.

8,7 kg suchých listov *Peumus boldus* Mol. (Megafyt-R, spol. s r.o., Vrané nad Vltavou, dodávateľ Dr. Kottas, 2010) bolo dvakrát 20 minút extrahovaných päťnásobným množstvom 95% etanolu. Etanolové extrakty boli spojené a zahustené. Vzniknúcim odparokom bol krátkym zahriatím na 80 °C zriedený 2 litrami horúcej destilovanej vody. Po pridaní 2,5 litra 2% HCl

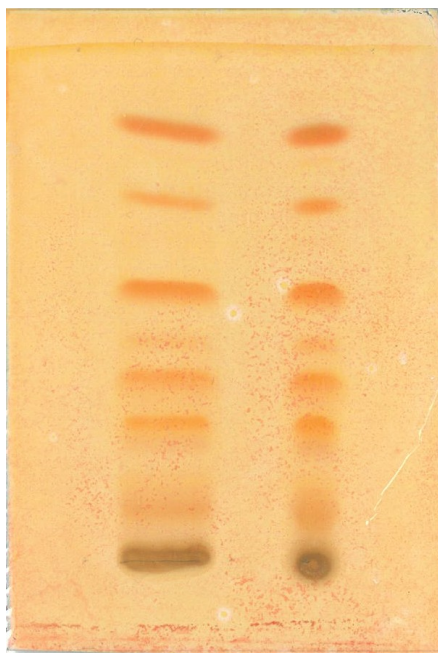
nechal sa roztok schladnúť. Na druhý deň bol hnedý roztok sfiltrovaný cez vlizelín. Zvyšok v banke bol rozohriaty na cca 80 °C a opätovne premytý najprv 1 litrom 0,5% HCl a následne 1,5 litrom horúcej destilovanej vody. Spojený filtrát bol zriedený destilovanou vodou na objem 14 litrov (pH 1,5).

14 litrov pripraveného filtrátu bolo zalkalizovaných 10% roztokom uhličitanu sodného (cca 2,4 litra) na pH 9,5 a vzniknulé suspenzie bola po častiach vytrepaná 3×4 litrami chloroformu. Fázy sa rozdeľovali zle, pretože po pridaní ďalšej vody (resp. roztoku uhličitanu sodného) sa vylúčila veľmi jemná práškovitá látka, ktorá bránila rozdeleniu fáz. Chloroformový výtrepok bol vysušený bezvodým síranom sodným a odparený pri 40 °C. Bolo získaných 48,2 g riedkeho tmavo hnedého extraktu, ktorý silne páchnol silicou boldovníka.

Extrakt bol pri zvýšenej teplote (60 °C) rozpustený v 300 ml 1% HCl, bolo pridaných 200 ml vody a suspenzie bola vytrepaná 3×200 ml Et₂O. Takmer číry kyslý vodný roztok alkaloidov bol zalkalizovaný 10% roztokom uhličitanu sodného na pH cca 9,5 a opäť vytrepán 3×200 ml chloroformu. Chloroformový výtrepok bol vysušený bezvodým síranom sodným a odparený.

Bolo tak získaných 12,5 g tmavo hnedého veľmi viskózneho extraktu, ktorý prakticky nepáchol silicou.

Uvedená príprava extraktu bola vykonaná mimo rámec mojej diplomovej práce; extrakt som dostal od vedúceho diplomovej práce.



Obr. 4 Chromatogram alkaloidov v chloroformovom extrakte z listov *Peumus boldus* Mol.; adsorbent A 2, 50×75 mm, vyvíjacia sústava S 1, komora nasýtená, vyvíjané 2×, detekcia D 1

4.3.2 Stĺpcová chromatografia chloroformového extraktu z listov *Peumus boldus* Mol.

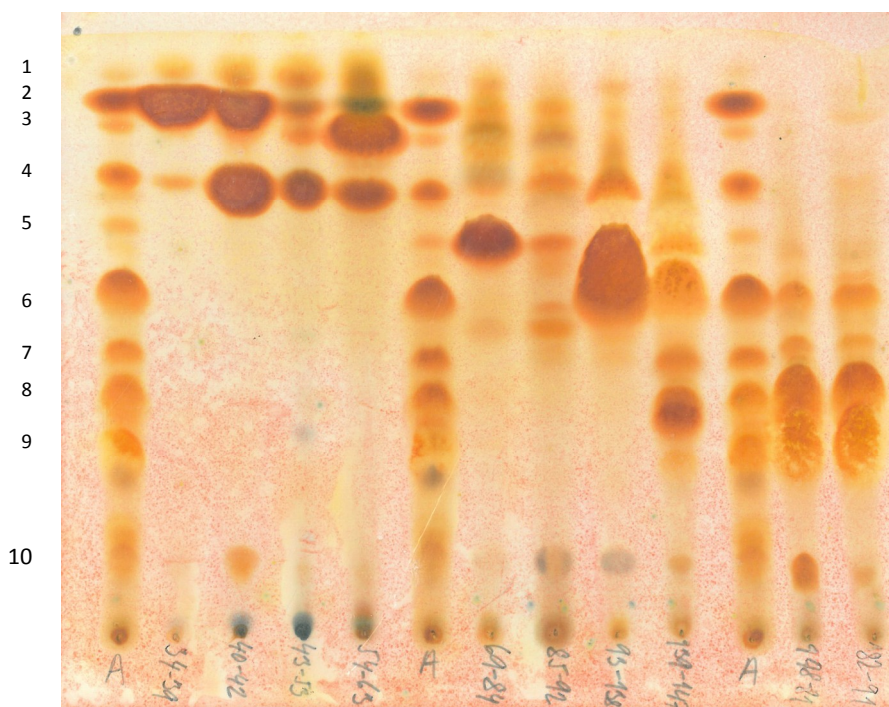
Separácia alkaloidov obsiahnutých v chloroformovom extrakte bola vykonaná za podmienok uvedených v tabuľke 2.

Tab. 2 Podmienky stĺpcovej chromatografie chloroformového extraktu z listov *Peumus boldus* Mol.

Extrakt	12,5 g
Adsorbent pre trituráciu	A 1; 100 g
Rozpúšťadlo	chloroform
Adsorbent	A 1; 420 g
Vrstva s extraktom	3,5×8 cm
Deliaca vrstva	3,5×36 cm
Objem frakcie/doba toku	100 ml/25 minút

Tab. 3 Frakcie zo stĺpcovej chromatografie chloroformového extraktu z listov *Peumus boldus* Mol.;
zvýraznené sú frakcie, ktoré boli zvolené pre ďalšie spracovanie

Spojené frakcie	Frakcia	Zloženie elučnej sústavy	Hmotnosť odparku (g)	Popis odparku
1-33	1-14	30 % CHCl ₃ v benzíne	vylúčené – bez alkaloidov	
	15-33	40 % CHCl ₃ v benzíne		
34-39	34-39	40 % CHCl₃ v benzíne	0,9546	svetlo hnedý, kryštalický
40-42	40-42	40 % CHCl ₃ v benzíne	0,1587	hnedočervený, s kryštálkami
43-53	43-50	40 % CHCl ₃ v benzíne	0,2511	hnedočervený, výrazne s kryštálmi
	51-53	50 % CHCl ₃ v benzíne		
54-63	54-63	50 % CHCl ₃ v benzíne	0,1245	hnedočervený, málo kryštálov
64-68	64-68	50 % CHCl ₃ v benzíne	vylúčené – bez alkaloidov	
69-84	69-74	50 % CHCl ₃ v benzíne	0,1020	hnedočervený, náznaky kryštálov
	75-84	60 % CHCl ₃ v benzíne		
85-92	85-90	60 % CHCl ₃ v benzíne	vylúčené – minimum alkaloidov	
	91-92	70 % CHCl ₃ v benzíne		
93-138	93-114	70 % CHCl ₃ v benzíne	2,0210	tmavo hnedý, veľmi viskózný, nekryštalický
	115-130	85 % CHCl ₃ v benzíne		
	131-136	100 % CHCl ₃		
	137-138	2 % EtOH v CHCl ₃		
139-202	139-147	2 % EtOH v CHCl ₃	1,8974	tmavo hnedý, veľmi viskózný, nekryštalický
	148-160	2 % EtOH v CHCl ₃		
	161-181	5 % EtOH v CHCl ₃		
	182-192	5 % EtOH v CHCl ₃		
	193-202	10 % EtOH v CHCl ₃		



Obr. 5 Sumárny chromatogram jednotlivých spojených frakcií zo stĺpcovej chromatografie chloroformového extraktu z listov *Peumus boldus* Mol. – čísla vľavo označujú jednotlivé alkaloidy; adsorbent A 2, výška 100 mm, vyvíjacia sústava S 1, komora nasýtená, vyvíjané 2×, detekcia D 1

4.3.3 Čistenie látky obsiahnutej v spojených frakciách 34-39

K ďalšiemu spracovaniu (izolácii alkaloidu) boli zvolené spojené frakcie 34-39 (tabuľka 3). Rozpúšťadlá v spojených frakciách 34-39 boli odparené, vzniklo 0,9546 g svetlo hnedého kryštalického odparoku. Odparok bol dvakrát kryštalizovaný z etanolu 95% Svobodovou technikou. Bolo získaných 0,4975 g látky, ktorá dostala označenie MB-1. Boli určené jej základné fyzikálno-chemické charakteristiky: teplota topenia 183-184 °C a špecifická optická otáčavosť $[\alpha]_D^{24} +208^\circ$ (c 1,0; CHCl₃).

4.4 Určenie štruktúry izolovaného alkaloidu

Pre určenie štruktúry izolovaného alkaloidu boli uskutočnené MS a NMR štúdie.

Hmotnostné spektrá (ESI-MS a ESI-MS/MS) boli namerané na prístroji Thermo Finnigan LCQ Duo Spektrometer.

NMR spektrá (¹H-NMR a ¹³C-NMR) boli namerané na prístroji Varian Inova 500 Spectrometer. Pracovná frekvencia v prípade ¹H jadier je 499,9 MHz, v prípade ¹³C jadier 125,7 MHz. Meranie prebiehalo v deuteriochloroforme (CDCl₃) pri teplote 25 °C.

4.5 Stanovenie inhibičného účinku izolovaného alkaloidu na cholínesterázy

Pre stanovenie inhibičného účinku izolovaného alkaloidu voči erytrocytarnej acetylcholínesteráze (AChE) a sérovej butyrylcholínesteráze (BuChE) bola použitá Ellmanova spektrofotometrická metóda¹²³: ako substráty, ktoré podliehajú aktivite cholínesteráz, využívajú sa estery tiocholínu (acetyltiocholín, resp. butyryltiocholín). Ich enzymatickou hydrolýzou vznikajú zodpovedajúce kyseliny a tiocholín, ktorý obsahuje redukovanú tiolovú funkčnú skupinu. Tiolová funkčná skupina tiocholínu reaguje s kyselinou 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoovou (DTNB) za vzniku žltého sfarbeného produktu, ktorý sa spektrofotometricky stanovuje pri vhodnej vlnovej dĺžke; meria sa nárast absorbancie počas 1 minúty.

Príprava slepej vzorky: do jamiek mikrotitračnej doštičky bolo postupne napipetovaných 8,3 µl suspenzie puzdier z ľudských erytrocytov, resp. plazmy, 67,0 µl DTNB (5mM roztok), 8,3 µl rozpúšťadla vzoriek izolovaného alkaloidu (dimetylsulfoxid), 215,0 µl pufru P 3 a 33,5 µl substrátu, tj. acetyltiocholínium-jodidu (10 mM roztok), resp. butyryltiocholínium-jodidu (10 mM roztok).

Príprava študovanej vzorky: do jamiek mikrotitračnej doštičky bolo postupne napipetovaných 8,3 µl suspenzie puzdier z ľudských erytrocytov, resp. plazmy, 67,0 µl DTNB (5mM roztok), 8,3 µl roztoku izolovaného alkaloidu v dimetylsulfoxide s rôznou koncentráciou (napríklad 40,0 až 0,4 µM), 215,0 µl pufru P 3 a 33,5 µl substrátu, tj. acetyltiocholínium-jodidu (10 mM roztok), resp. butyryltiocholínium-jodidu (10 mM roztok).

Meranie prebiehalo pri teplote 37 °C, bola použitá vlnová dĺžka 436 nm, bolo vykonaných 7 meraní a každé meranie bolo opakované trikrát.

Inhibičný účinok bol vyjadrený ako inhibičná koncentrácia IC₅₀, tj. koncentrácia izolovaného alkaloidu, pri ktorej za daných podmienok nastala 50% inhibícia hydrolytickej aktivity acetylcholínesterázy, resp. butyrylcholínesterázy v porovnaní so situáciou, keď nebol prítomný žiadny enzymatický inhibítor.

Hodnoty IC₅₀ boli vypočítané z hodnôt úrovne inhibície pri rôznych koncentráciách študovaného alkaloidu. Tie boli získané podľa vzorca

$$\text{úroveň inhibície (v \%)} = 100 - (\Delta A_{BL} / \Delta A_{SA} \times 100),$$

kde ΔA_{SA} je nárast absorbancie študovanej vzorky a ΔA_{BL} je nárast absorbancie slepej vzorky po jednej minúte merania. Výpočet bol vykonaný programom Graph PaD Prism (verzia 3.02

pre Windows; Graph PaD Software, San Diego, USA). Stanovená hodnota IC_{50} bola následne porovnaná s hodnotami IC_{50} známych inhibítorov cholínesteráz – galantamínom a huperzínom A.

4.6 Stanovenie antioxidačného účinku izolovaného alkaloidu

Pre stanovenie *in vitro* antioxidačného účinku izolovaného alkaloidu bol použitý DPPH test: fialovo sfarbené 2,2-difenyl-1-pikrylhydrazylové (DPPH) radikály reagujú s látkami, ktoré pôsobia ako donor atómu vodíka, vzniká tak ich žltá sfarbená redukovaná forma (difenylnikrylhydrazín) a dochádza k odfarbeniu použitého roztoku, resp. k poklesu jeho absorbancie.

Absorbancia bola meraná spektrofotometricky 40 minút po zmiešaní roztokov izolovaného alkaloidu a DPPH radikálov pri vlnovej dĺžke 525 nm a teplote 37°C, merania boli opakované trikrát. Bolo použitých 100 μ l rôzne koncentrovaných roztokov (napríklad 40,0 až 0,4 μ M) izolovaného alkaloidu v dimetylsulfoxide a 100 μ l 0,2mM roztoku DPPH radikálov v 50% etanole (w/w).

Antioxidačný účinok bol vyjadrený ako efektívna koncentrácia EC_{50} , tj. koncentrácia izolovaného alkaloidu, pri ktorej za daných podmienok nastala 50% redukcia DPPH radikálov v porovnaní so situáciou, keď nebol prítomný žiadny antioxidant.

Hodnota EC_{50} bola vypočítaná z hodnôt úrovne redukcie pri rôznych koncentráciach študovaného alkaloidu. Tie boli získané podľa vzorca

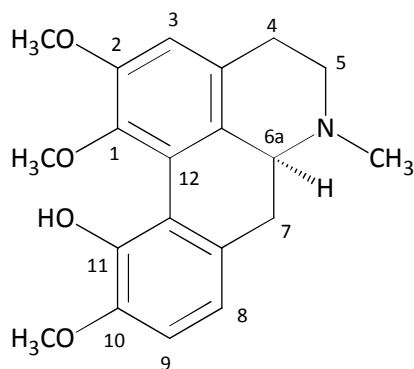
$$\text{úroveň redukcie (v \%)} = [1 - (A_{RA} - A_A) / A_R] \times 100,$$

kde A_{RA} je absorbancia zmesi roztoku DPPH radikálov a roztoku izolovaného alkaloidu, A_A je absorbancia roztoku izolovaného alkaloidu a A_R je absorbancia zmesi roztoku DPPH radikálov a čistého rozpúšťadla (tj. bez izolovaného alkaloidu). Výpočet bol vykonaný programom Graph PaD Prism (verzia 3.02 pre Windows; Graph PaD Software, San Diego, USA). Stanovená hodnota EC_{50} bola následne porovnaná s hodnotami EC_{50} známych antioxidantov – kvercetínom a troloxom.

5 VÝSLEDKY

5.1 Štruktúra izolovaného alkaloidu

Na základe výsledkov MS a NMR štúdií a porovnania získaných údajov s literatúrou bola izolovaná látka identifikovaná ako (+)-izokorydín (CAS 475-67-2) (obrázok 6).

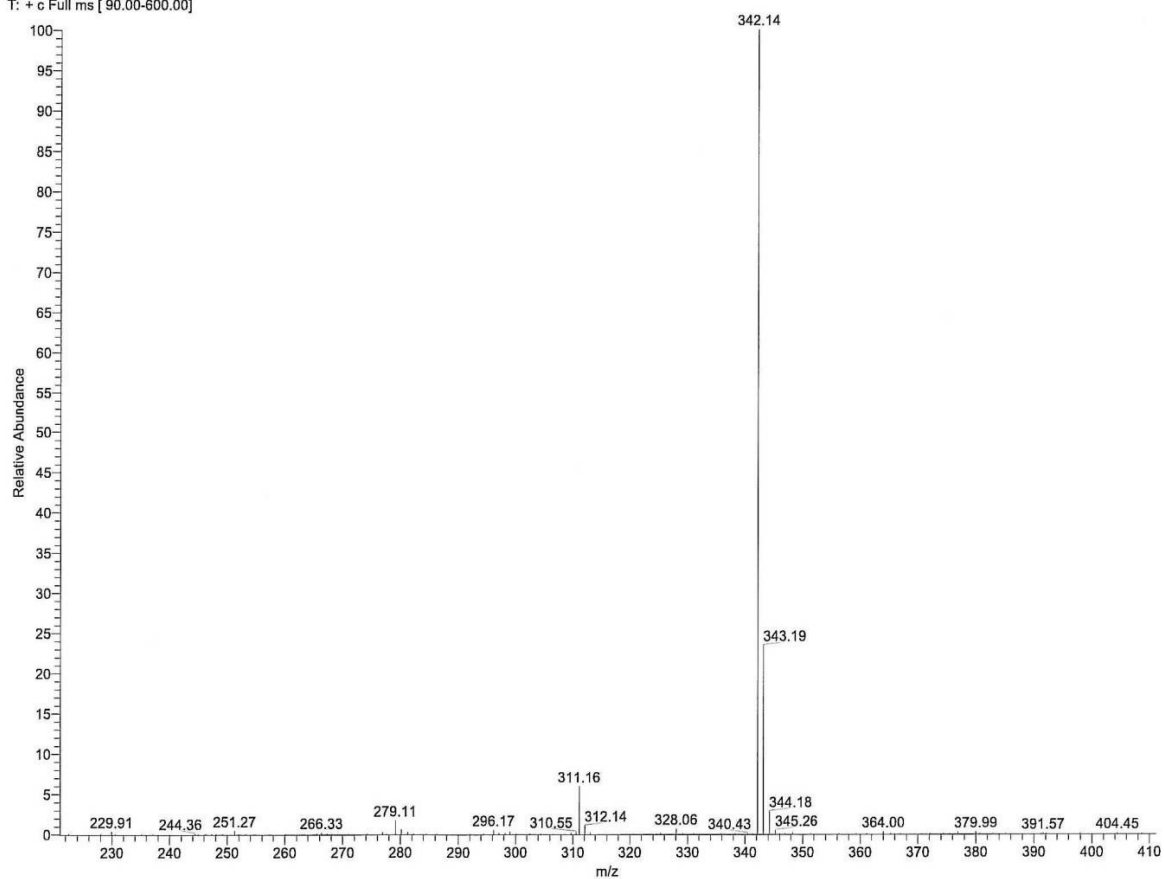


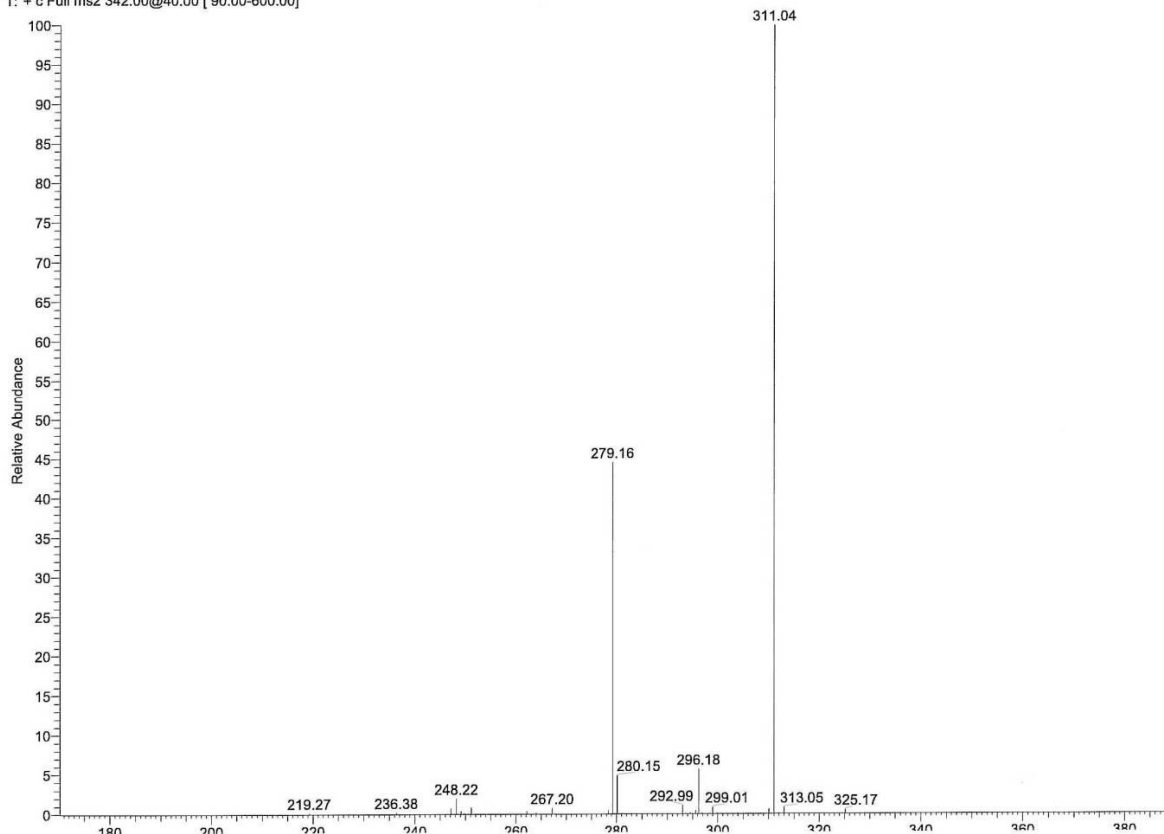
Obr. 6 Štruktúra (+)-izokorydínu

5.1.1 MS štúdia (+)-izokorydínu

ESI-MS m/z 342.14 $[M^+H]^+$ (100).

MS/MS m/z 311.04 (100, $[M-OCH_3]^+$), 296.18 (8, $[M-CH_3,-OCH_3]^+$), 279.16 (46, $[M-2x OCH_3]^+$).

LC 123 #1 RT: 0.01 AV: 1 NL: 4.13E8
T: + c Full ms [90.00-600.00]**Obr. 7 ESI-MS spektrum (+)-izokorydinu**



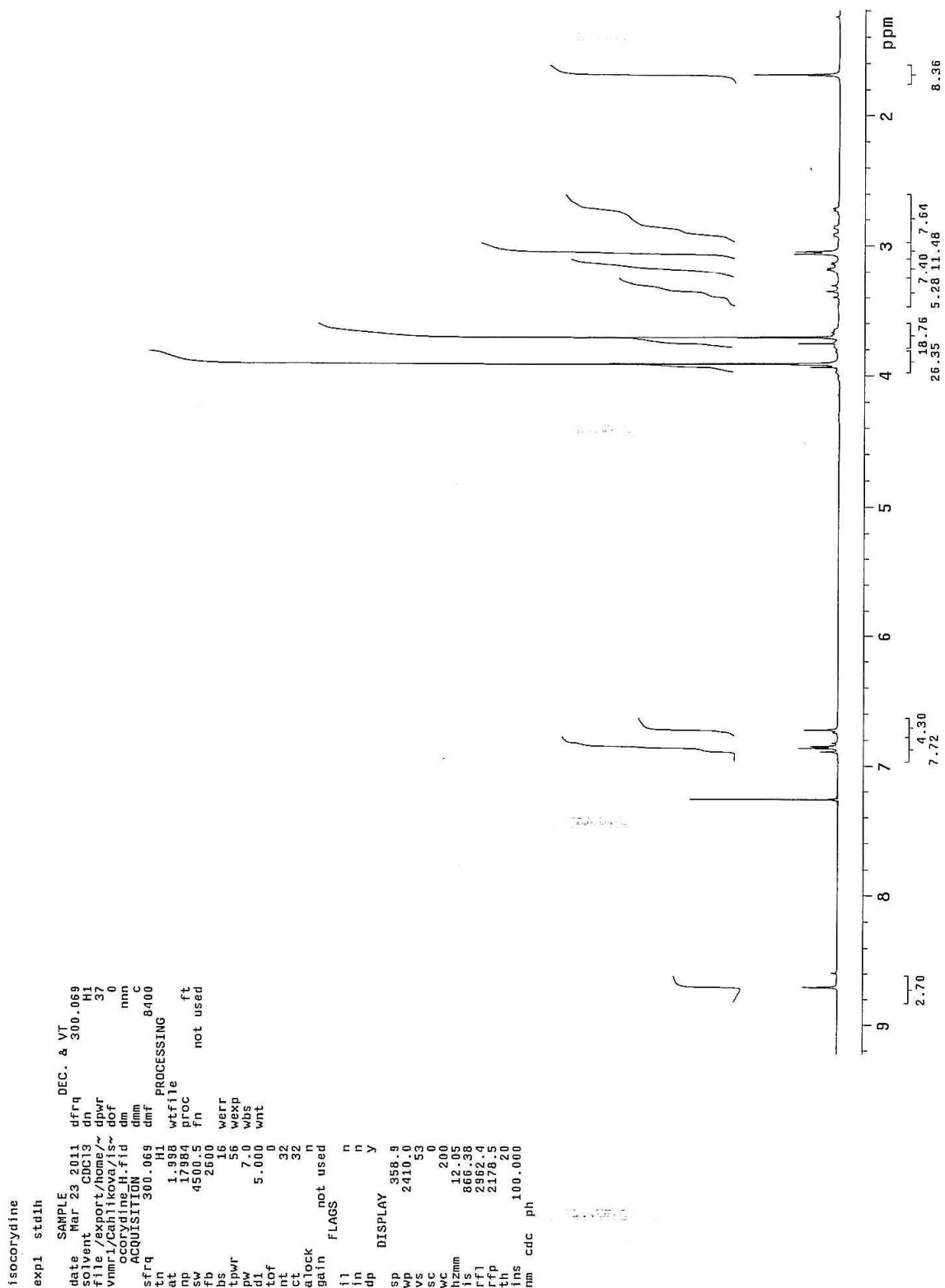
Obr. 8 ESI-MS/MS spektrum (+)-izokorydínu

5.1.2 NMR štúdia (+)-izokorydínu

5.1.2.1 ^1H -NMR štúdia (+)-izokorydínu

^1H -NMR (CDCl_3 , 25 °C):

2.94 (1H, dd, $J = 7.0$ Hz, H-4 α); 3.09-3.13, (3H, br s, N- CH_3); 3.17 (1H, dd, $J = 13.0$ Hz, H-7 α); 3.54-3.61 (1H, m, H-7 β); 3.59-3.66 (1H, m, H-4 β); 3.70-3.77 (1H, m, H-6 $\alpha\alpha$); 3.73 (3H, s, OCH_3 -1); 3.77-3.84 (1H, m, H-5 α); 3.92 (3H, s, OCH_3 -10); 3.92 (3H, s, OCH_3 -2); 4.03-4.10 (1H, m, H-5 β); 6.74 (1H, s, H-3); 6.86 (1H, dd, $J = 8.3$ Hz, H-8); 6.89 (1H, d, $J = 8.3$, H-9 Hz); 8.67 (br s, OH-11).

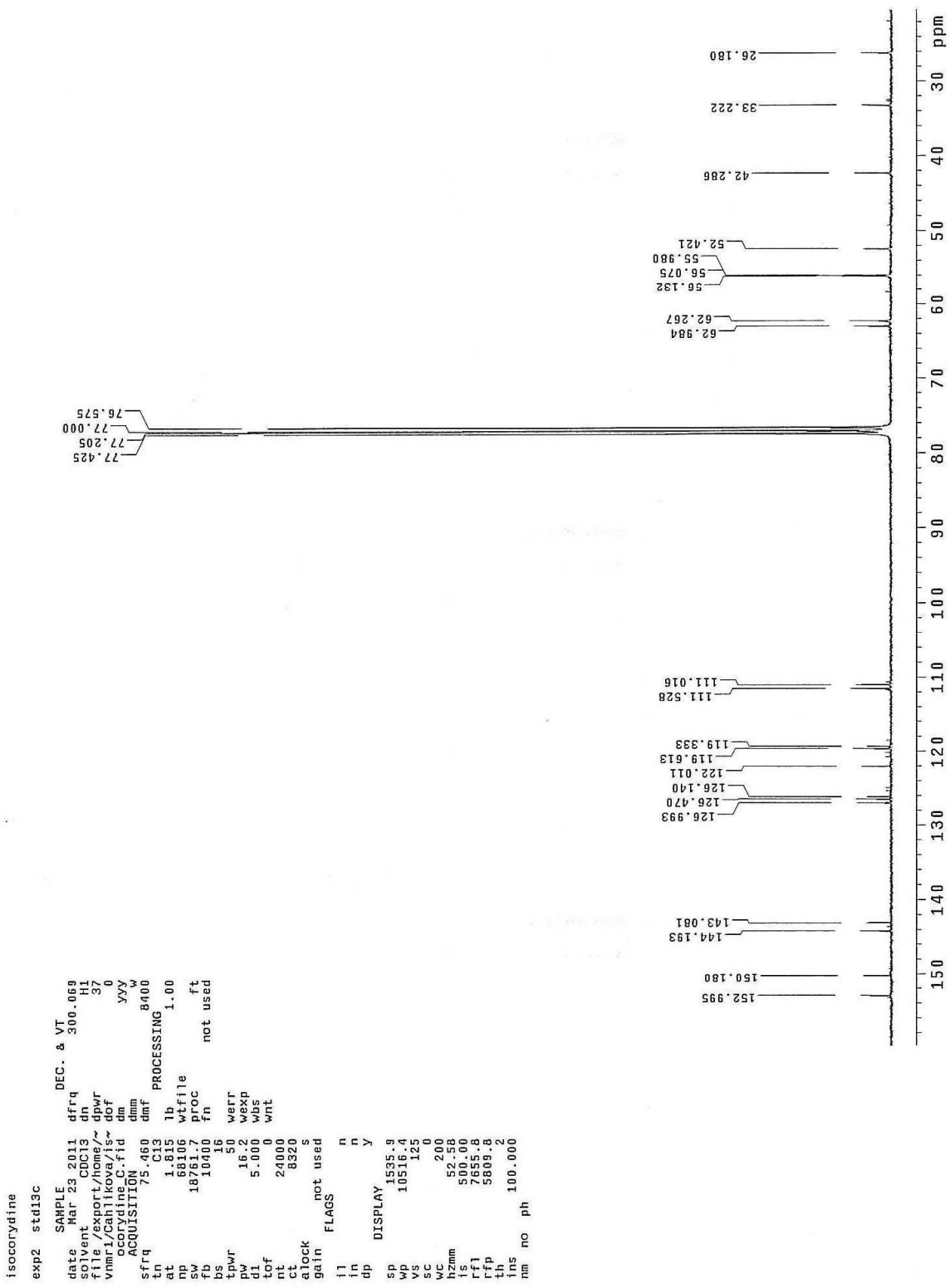


Obr. 9 ^1H -NMR spektrum (+)-izokorydínu

5.1.2.1 ^{13}C -NMR štúdia (+)-izokorydínu

^{13}C -NMR (CDCl_3 , 25 °C):

26.2, C-4; 33.2, C-7; 42.4, N- CH_3 ; 52.8, C-5; 56.0, OCH_3 -2; 56.2, OCH_3 -10; 62.3, OCH_3 -1; 63.3, C-6a; 111.0, C-3; 111.7, C-9; 119.3, C-11a, 119.7, C-8; 122.1, C-1b; 126.2, C-1a; 126.2, C-3a; 143.2, C-1; 144.3, C-11; 150.3, C-10; 153.1, C-2.



Obr. 10 ¹³C-NMR spektrum (+)-izokorydinu

5.2 Inhibičný účinok izolovaného alkaloidu na cholinesterázy

U izolovaného alkaloidu bol študovaný *in vitro* inhibičný účinok na ľudskú erytrocytárnu acetylcholinesterázu a sérovú butyrylcholinesterázu. Výsledky sú zhrnuté v tabuľke 4.

Tab. 4 *In vitro* inhibičný účinok izolovaného alkaloidu a referenčných inhibítorov na ľudské cholinesterázy

Látky	IC ₅₀ (μM)	
	AChE	BuChE
(+)-izokorydín	>1000	657,1±15,5
galantamín	6,9±0,3	156,0±6,9
huperzín A	0,25±0,01	>1000

5.3 Antioxidačný účinok izolovaného alkaloidu

U izolovaného alkaloidu bol študovaný *in vitro* antioxidačný účinok. Výsledky sú zhrnuté v tabuľke 5.

Tab. 5 *In vitro* antioxidačný účinok izolovaného alkaloidu a referenčných antioxidantov

Látky	EC ₅₀ (μM)
(+)-izokorydín	>1000
kvercetín	25,3±1,2
trolox	27,8±0,8

6 DISKUSIA

V rámci mojej diplomovej práce sa podarilo z listov boldovníka izolovať látku označenú ako MB-1. Boli stanovené jej základné fyzikálno-chemické charakteristiky a pomocou spektrálnych metód (MS a NMR) bola identifikovaná ako (+)-izokorydín.

(+)-Izokorydín bol v *Peumus boldus* Mol. zaznamenaný⁴⁵ už v minulosti a jeho výskyt bol popísaný i v iných taxónoch, napríklad *Dicranostigma leptopodum*⁸⁴ (Papaveraceae), *Lindera angustifolia*⁶⁴ (Lauraceae), *Corydalis turtschaninovii* (Fumariaceae)⁶² a *Stephania rotunda* (Menispermaceae)¹²¹.

(+)-Izokorydín je terciárny alkaloid zaraďujúci sa svojou štruktúrou medzi aporfinové alkaloidy. U mnohých z nich bola popísaná výrazná farmakologická aktivita¹¹⁹, okrem iného inhibícia acetylcholinesterázy⁹⁹ alebo antioxidantný efekt⁶⁴. Súčasťou práce preto boli tiež štúdie biologického účinku izolovaného (+)-izokorydínu, konkrétne jeho schopnosti inhibovať enzymatickú aktivitu ľudských cholinesteráz a zhasťovať radikálové častice. V prípade priaznivých výsledkov mohol by (+)-izokorydín potenciálne predstavovať novú predlohovú štruktúru látok uplatniteľných v terapii neurodegeneratívnych ochorení, najmä Alzheimerovej choroby.

Podľa hodnôt IC₅₀, ktoré boli stanovené v tejto práci, neprejavuje (+)-izokorydín v porovnaní s použitými referenčnými látkami významný inhibičný účinok na cholinesterázy. Tieto výsledky sa v podstate zhodujú s prácami iných autorov, podľa ktorých je (+)-izokorydín slabým inhibítorom acetylcholinesterázy¹²¹, resp. butyrylcholinesterázy¹²⁰.

Ani v štúdií antioxidantného účinku, založenej na redukcii DPPH radikálov, nedosiahol (+)-izokorydín v porovnaní s referenčnými antioxidantami významné výsledky. To je v určitom rozpore s prácou autorov Lee et al.⁶², podľa ktorej prejavil alkaloid vysokú schopnosť inhibovať oxidáciu LDL. Vysvetlenie tejto nezrovnalosti môže spočívať v rozličných metódach, ktorými boli antioxidantné vlastnosti (+)-izokorydínu hodnotené.

V zmysle ovplyvnenia deficitnej cholinergnej neurotransmisie či oxidačného stresu ako patogenetického faktora nepovažujem na základe výsledkov štúdií biologickej aktivity uvedených v tejto práci alkaloid (+)-izokorydín za perspektívnu predlohovú štruktúru látok s terapeutickým potenciálom pre neurodegeneratívne ochorenia.

Izolovaný alkaloid však bude podrobený ďalším biologickým testom s cieľom nájsť potenciálne účinné látky, ktoré pri ovplyvňovaní Alzheimerovej choroby pôsobia iným mechanizmom, než je zásah do aktivity acetylcholinesterázy a butyrylcholinesterázy.

Například inhibíciou β -sekretáz a glutaminylyklázy, inhibíciou agregácie β -amyloidu a β -amyloidom indukovanej neurotoxicity alebo agonistickým pôsobením na transkripčných faktoroch PPAR γ ; štúdie týchto mechanizmov sú tiež vykonávané v rámci práce ADINACO Research Group na Katedre farmaceutickej botaniky a ekológie Farmaceutickej fakulty Univerzity Karlovej.

7 ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY

- 1 Global status report on noncommunicable diseases 2010.
http://whqlibdoc.who.int/publications/2011/9789240686458_eng.pdf, stiahnuté 21. augusta 2011.
- 2 Prokop M.: *Diplomová práca*. Masarykova univerzita, Fakulta pedagogická, Brno 2010.
http://is.muni.cz/th/166139/pedf_m/, stiahnuté 21. augusta 2011.
- 3 Nicolson G. L.: Chronic bacterial and viral infections in neurodegenerative and neurobehavioral diseases. *Lab. Med. (Chicago, IL, U. S.)* 39, 291 (2008).
- 4 Sosna T., Netuková M., Sedláčková P., Švancarová R.: Věkem podmíněná makulární degenerace. *Interní Med.* 12, 316 (2010).
- 5 Jiráček R.: Farmakoterapie Alzheimerovy choroby. *Prakt. lékařn.* 5, 176 (2009).
- 6 2008-2013 Action plan for the global strategy for the prevention and control of noncommunicable diseases.
http://whqlibdoc.who.int/publications/2009/9789241597418_eng.pdf, stiahnuté 21. augusta 2011.
- 7 Petřelnicová D., Gmitterová K., Benetin J.: Mechanizmy neurodegenerácie pri Parkinsonovej chorobe. *Ceska Slov. Neurol. Neurochir.* 73/106, 645 (2010).
- 8 Jiráček R.: Farmakoterapie Alzheimerovy choroby. *Remedia.* 19, 342 (2009).
- 9 Rektorová I.: Neurodegenerativní demence. *Ceska Slov. Neurol. Neurochir.* 72/105, 97 (2009).
- 10 Koukolík F., Jiráček R.: *Alzheimerova nemoc a další demence*. Grada Publishing, Praha 1998.
- 11 Hořejší, J. et al.: *Alzheimerova choroba*. Galén, Praha 1999.
- 12 Koukolík F., Jiráček R.: *Demence: Neurobiologie, klinický obraz, terapie*. Galén, Praha 2004.
- 13 Cai Z., Zhao B., Ratka A.: Oxidative Stress and b-Amyloid Protein in Alzheimer's Disease. *NeuroMol. Med.* 13, 223 (2011).
- 14 Holmes C., Cotterell D.: Role of Infection in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease: Implications for Treatment. *CNS Drugs* 23, 993 (2009).
- 15 Martin J., Kršková Z., Dušek J.: Huperzin A a jiné přírodní látky v léčbě Alzheimerovy choroby. *Prakt. lékařn.* 7, 39 (2011).

- 16 del Valle J. M., Godoy C., Asencio M., Aguilera J. M.: Recovery of antioxidants from boldo (*Peumus boldus* M.) by conventional and supercritical CO₂ extraction. *Food Res. Int.* 37, 695 (2004).
- 17 O'Brien P., Carrasco-Pozo C., Speisky H.: Boldine and its antioxidant or health-promoting properties. *Chem.-Biol. Interact.* 159, 1 (2006).
- 18 <http://www.neurodegenerace.cz/odbor.htm>, použité 20. novembra 2011.
- 19 Craig L. A., Hong N. S., McDonald R. J.: Revisiting the cholinergic hypothesis in the development of Alzheimer's disease. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 35, 1397 (2011).
- 20 Lincová D., Farghali H. et al.: *Základní a aplikovaná farmakologie*. Galén, Praha 2007.
- 21 Mancuso M., Calsolaro V., Orsucci D., Siciliano G., Murri L.: Is there a primary role of the mitochondrial genome in Alzheimer's disease?. *J. Bioenerg. Biomembr.* 41, 411 (2009).
- 22 Kountouras J., Boziki M., Gavalas E., Zavos C., Deretzi G., Grigoriadis N., Tsolaki M., Chatzopoulos D., Katsinelos P., Tzilves D. et al.: Increased Cerebrospinal Fluid Helicobacter Pylori Antibody in Alzheimer's Disease. *Int. J. Neurosci.* 119, 765 (2009).
- 23 Dobson C. B., Wozniak M. A., Itzhaki R. F.: Do infectious agents play a role in dementia?. *Trends Microbiol.* 11, 312 (2003).
- 24 Contini C., Seraceni S., Cultrera R., Castellazzi M., Granieri E., Fainardi E.: Chlamydia pneumoniae Infection and Its Role in Neurological Disorders. *Interdiscip. Perspect. Infect. Dis.* 2010, 1.
- 25 Balin B. J., Gerard H. C., Arking, E. J., Appelt D. M., Branigan P. J., Abrams J. T., Whittum-Hudson J. A., Hudson A. P.: Identification and localization of Chlamydia pneumoniae in the Alzheimer's brain. *Med. Microbiol. Immunol.* 187, 23 (1998).
- 26 Vališ M., Kalnická D.: Novinky ve farmakoterapii demencí. *Neurol. praxi.* 12, 33 (2011).
- 27 Sheardová K., Hort J., Rusina R., Bartoš A., Línek V., Rössner P., Rektorová I.: Doporučené postupy pro terapii Alzheimerovy nemoci a ostatních demencí. *Psychiatr. praxi.* 10, 224 (2009).
- 28 Pidrman V.: Farmakoterapie demence. *Psychiatr. praxi.* 8, 202 (2007).
- 29 Jiráček R., Slíva J.: Donepezilum. *Remedia.* 14, 464 (2004).
- 30 Jiráček R., Vnoučková K.: Rivastigminum. *Remedia.* 13, 372 (2003).
- 31 Doležal M. et al.: *Farmaceutická chemie léčiv působících na autonomní nervový systém*. Karolinum, Praha 2009.

- 32 Krejčová G., Ševelová L.: Současné poznatky o galantaminu, reverzibilním inhibitoru acetylcholinesterázy. *Vojen. Zdrav. Listy* 72, 37 (2003).
- 33 Zangara A.: The psychopharmacology of huperzine A: an alkaloid with cognitive enhancing and neuroprotective properties of interest in the treatment of Alzheimer's disease. *Pharmacol., Biochem. Behav.* 75, 675 (2003).
- 34 Opletal L.: *súkromná správa* (2012).
- 35 Kresánek J.: *Atlas léčivých rostlín a lesných plodov*. Osveta, Martin 1988.
- 36 Jahodář L.: *Farmakobotanika: semenné rostliny*. Karolinum, Praha 2006.
- 37 Blaschek W., Ebel S., Hackenthal E., Holtzgrabe U., Kellner K., Reichling J., Schnetz V.: *Hager ROM 2004: Hager's Handbuch der Drogen und Arzneistoffe*. Springer & Info II Uni. Würzburg, Würzburg 2005.
- 38 *Český lékopis 2009: Pharmacopoea Bohemica MMIX*. Grada Publishing, Praha 2009.
- 39 Schindler H.: Peumus boldus, source of folia boldo. *Arzneim. Forsch.* 7, 747 (1957).
- 40 Urzua A., Santander R., Echeverria J., Villalobos C., Palacios S. M., Rossi Y.: Insecticidal properties of Peumus boldus Mol. essential oil on the house fly, *Musca domestica* L. *Bol. Latinoam. Caribe Plant. Med. Aromat.* 9, 465 (2010); *Chem. Abstr.* 154,328808 (2011).
- 41 Bruns K., Koehler M.: Composition of Peumus boldus leaf oil. *Parfuemerie und Kosmetik*. *Parfuemerie und Kosmetik* 55, 225 (1974); *Chem. Abstr.* 82,47617 (1975).
- 42 Miraldi E., Ferri S., Franchi G. G., Giorgi G.: Peumus boldus essential oil: new constituents and comparison of oils from leaves of different origin. *Fitoterapia* 67, 227 (1996).
- 43 Vila R., Valenzuela L., Bello H., Canigual S., Montes M., Adzet T.: Composition and antimicrobial activity of the essential oil of Peumus boldus leaves. *Planta Med.* 65, 178 (1999).
- 44 Simirgiotis M. J., Schmeda-Hirschmann G.: Direct identification of phenolic constituents in Boldo Folium (Peumus boldus Mol.) infusions by high-performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr.* 1217, 443 (2010).
- 45 Ruegger A.: New alkaloids from pneumus boldus Molina. *Helv. Chim. Acta* 42, 754 (1959).
- 46 Hughes D. W., Genest K., Skakum W.: Alkaloids of Peumus boldus. Isolation of (+)-reticuline and isoboldine. *J. Pharm. Sci.* 57, 1023 (1968).

- 47 Hughes D. W., Genest K., Skakum W.: Alkaloids of *Peumus boldus*. Isolation of laurotetanine and laurolicsine. *J. Pharm. Sci.* 57, 1619 (1968).
- 48 Vanhaelen M.: Spectrophotometric determination of alkaloids in *Peumus boldus*. *J. Pharm. Belg.* 28, 291 (1973); *Chem. Abstr.* 79,134317 (1973).
- 49 Urzua A., Acuna P.: Alkaloids from the bark of *Peumus boldus*. *Fitoterapia* 54, 175 (1983).
- 50 Urzua A., Torres R.: 6a,7-Dehydroboldine from the bark of *Peumus boldus*. *J. Nat. Prod.* 47, 525 (1984).
- 51 Asencio M., Cassels B. K., Speisky H., Valenzuela A.: (R)- and (S)-coclaurine from the bark of *Peumus boldus*. *Fitoterapia* 64, 455 (1993).
- 52 Vogel H., Razmilic I., Doll U., Ruiz R.: Variability of some active compounds in boldo (*Peumus boldus* Mol.). *Beitr. Zuechtungsforsch.* 2, 364 (1996).
- 53 Speisky H., Cassels B. K.: Boldo and boldine: An emerging case of natural drug development. *Pharmacol. Res.* 29, 1 (1994). Prevtaté z O'Brien et al. 2006.
- 54 Valonzuela M., Rebolledo L.: Alkaloids of *Boldoa fragans* (*Peumus boldus*). *An. R. Acad. Farm.* 26, 227 (1960); *Chem. Abstr.* 55,34698 (1961).
- 55 Cassels B.K., Speisky H. (1993). Diseño de métodos para la obtención de boldina y glaucina a partir de boldo para su uso en la industria farmacéutica y de alimentos. Technical report. Santiago, Chile: Fontec-CORFO. Citované podl'a del Valle et al. 2004.
- 56 Speichert H., Ciesielski M., Lutomski J., Gorecki P., Popiolek S. (Instytut Przemysłu Zielarskiego): Extraction of alkaloids from the leaves of *Peumus boldus* (Monimiaceae), Patent PL, 116351B1, 1981; *Chem. Abstr.* 99,36160 (1983).
- 57 Van Hulle C., Braeckman P., Van Severen R.: Influence of the preparation technique on the boldine content of Boldo dry extract. *J. Pharm. Belg.* 38, 97 (1983); *Chem. Abstr.* 99,76720 (1983).
- 58 Schmeda-Hirschmann G., Rodriguez J. A., Theoduloz C., Astudillo S. L., Feresin G. E., Tapia A.: Free-radical scavengers and antioxidants from *Peumus boldus* Mol. ("Boldo"). *Free Radical Res.* 37, 447 (2003).
- 59 Quezada N., Asencio M., Del Valle J. M., Aguilera J. M., Gomez B.: Antioxidant activity of crude extract, alkaloid fraction, and flavonoid fraction from boldo (*Peumus boldus* Molina) leaves. *J. Food Sci.* 69, C371 (2004).
- 60 Valenzuela A., Nieto S., Cassels B. K., Speisky H.: Inhibitory effect of boldine on fish oil oxidation. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 68, 935 (1991).

- 61 Martinez L. A., Rios J. L., Paya M., Alcaraz M. J.: Inhibition of nonenzymic lipid peroxidation by benzyloisoquinoline alkaloids. *Free Radical Biol. Med.* *12*, 287 (1992).
- 62 Lee, J.-K., Cho J.-G., Song M.-C., Yoo J.-S., Lee D.-Y., Yang H.-J., Han K.-M., Kim D.-H., Oh Y.-J., Jeong T.-S. et al.: Isolation of isoquinoline alkaloids from the tuber of *Corydalis turtschaninovii* and their inhibition activity on low density lipoprotein oxidation. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* *52*, 646 (2009); *Chem. Abstr.* *153*,613850 (2010).
- 63 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. Biol. (Medellin, Colomb.)* *26*, 105 (2004); *Chem. Abstr.* *143*,241338 (2005).
- 64 Zhao Q., Zhao Y., Wang K.: Antinociceptive and free radical scavenging activities of alkaloids isolated from *Lindera angustifolia* Chen. *J. Ethnopharmacol.* *106*, 408 (2006).
- 65 Lanhers M. C., Joyeux M., Soulimani R., Fleurentin J., Sayag M., Mortier F., Younos C., Pelt J. M.: Hepatoprotective and anti-inflammatory effects of a traditional medicinal plant of Chile, *Peumus boldus*. *Planta Med.* *57*, 110 (1991).
- 66 Cederbaum A.I., Kukielka E., Speisky H.: Inhibition of rat liver microsomal lipid peroxidation by boldine. *Biochem. Pharmacol.* *44*, 1765 (1992).
- 67 Kringstein P., Cederbaum A. I.: Boldine prevents human liver microsomal lipid peroxidation and inactivation of cytochrome P4502F1. *Free Radical Biol. Med.* *18*, 559 (1995).
- 68 Bannach R., Valenzuela A., Cassels B. K., Nunez-Vergara L. J., Speisky H.: Cytoprotective and antioxidant effects of boldine on tert-butyl hydroperoxide-induced damage to isolated hepatocytes. *Cell Biol. Toxicol.* *12*, 89 (1996).
- 69 Fernandez J., Lagos P., Rivera P., Zamorano-Ponce E.: Effect of boldo (*Peumus boldus* Molina) infusion on liporoxidation induced by cisplatin in mice liver. *Phytother. Res.* *23*, 1024 (2009).
- 70 Santanam N., Penumetcha M., Speisky H., Parthasarathy S.: A novel alkaloid antioxidant, Boldine and synthetic antioxidant, reduced form of RU486, inhibit the oxidation of LDL in-vitro and atherosclerosis in vivo in LDLR^{-/-} mice. *Atherosclerosis (Amsterdam, Neth.)* *173*, 203 (2004).
- 71 Lau Y.-S., Machha A., Achike F. I., Murugan D., Mustafa M. R.: The aporphine alkaloid boldine improves endothelial function in spontaneously hypertensive rats. *Exp. Biol. Med. (London, U. K.)* *237*, 93 (2012).

- 72 Youn Y. C., Kwon O. S., Han E. S., Song J. H., Shin Y. K., Lee C. S.: Protective effect of boldine on dopamine-induced membrane permeability transition in brain mitochondria and viability loss in PC12 cells. *Biochem. Pharmacol.* *63*, 495 (2002).
- 73 Konrath E. L., Santin K., Nassif M., Latini A., Henriques A., Salbego C.: Antioxidant and pro-oxidant properties of boldine on hippocampal slices exposed to oxygen-glucose deprivation in vitro. *NeuroToxicology* *29*, 1136 (2008).
- 74 Ivorra M. D., Chulia S., Lugnier C., D'Ocon M. P.: Selective action of two aporphines at α 1-adrenoceptors and potential-operated calcium channels. *Eur. J. Pharmacol.* *231*, 165 (1993).
- 75 Chulia S., Moreau J., Naline E., Noguera M. A., Ivorra M. D., D'Ocon M. P., Advenier C.: The effect of S-(+)-boldine on the α 1-adrenoceptor of the guinea pig aorta. *Br. J. Pharmacol.* *119*, 1305 (1996).
- 76 Eltze M., Grebe T., Michel M. C., Czyborra P., Ullrich B.: Affinity profile at α 1- and α 2-adrenoceptor subtypes and in vitro cardiovascular actions of (+)-boldine. *Eur. J. Pharmacol.* *443*, 151 (2002).
- 77 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.* *62*, 7 (1998).
- 78 Chung L. Y., Lo M. W., Mustafa M. R., Goh S. H., Imiyabir Z.: 5-hydroxytryptamine_{2A} receptor binding activity of compounds from *Litsea sessilis*. *Phytother. Res.* *23*, 330 (2009).
- 79 Kang J.-J., Cheng Y.-W., Fu W.-M.: Studies on neuromuscular blockade by boldine in the mouse phrenic nerve-diaphragm. *Jpn. J. Pharmacol.* *76*, 207 (1998).
- 80 Hue B., Le Corronec H., Kuballa B., Anton R.: Effects of the natural alkaloid boldine on cholinergic receptors of the insect central nervous system. *Pharm. Pharmacol. Lett.* *3*, 169 (1994).
- 81 Sotnikova R., Kettmann V., Kostalova D., Taborska E.: Relaxant properties of some aporphine alkaloids from *Mahonia aquifolium*. *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.* *19*, 589 (1997).
- 82 Mustafa M. R., Mohamad R., Din L., Wahid S.: Smooth muscle relaxant activities of compounds isolated from Malaysian medicinal plants on rat aorta and guinea-pig ileum. *Phytother. Res.* *9*, 555 (1995).

- 83 Jiang Q., Huang X., Sun A., Wu Q., Xie X.: Relation of vasodilative action of isocorydine to cyclic nucleotides. *Zhongguo Yaolixue Yu Dulixue Zazhi.* 15, 251 (2001); Chem. Abstr. 137,27992 (2001).
- 84 Zhao Y., Zhao G., Li X.: Effects of isocorydine on the action potentials of rabbit sinoatrial node and guinea pig ventricular muscles. *Yaoxue Xuebao* 21, 663 (1986); Chem. Abstr. 106,27607 (1987).
- 85 Zhao D., Yang X., Sheng B.: Antiarrhythmic action of d-isocorydine hydrochloride. *Zhongguo Yaoli Xuebao* 7, 131 (1986); Chem. Abstr. 104,179917 (1986).
- 86 Zhao Y., Li G., Zhang D., Zhao G.: Effects of isocorydine on action potentials in isolated canine Purkinje fibers and ventricular muscles. *Zhongguo Yaoli Xuebao* 12, 324 (1991); Chem. Abstr. 115,85119 (1991).
- 87 Chen W.-Y., Ko F.-N., Wu Y.-C., Lu S.-T., Teng C.-M.: Vasorelaxing effect in rat thoracic aorta caused by laurotetanine isolated from *Litsea cubeba* Persoon. *J. Pharm. Pharmacol.* 46, 380 (1994).
- 88 Martin M. L., Sagredo J. A., Morais J. M., Montero M. J., Sanchez M. T., San Roman L.: Uterine inhibitory effect of reticuline. *J. Pharm. Pharmacol.* 40, 801 (1988).
- 89 Medeiros, M. A. A., Nunes X. P., Barbosa-Filho J. M., Lemos V. S., Pinho J. F., Roman-Campos D., Medeiros I. A., Araujo D. A. M., Cruz J. S.: Inhibition of nonenzymic lipid peroxidation by benzyloisoquinoline alkaloids. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 379, 115 (2009).
- 90 Zetler G.: Neuroleptic-like, anticonvulsant and antinociceptive effects of aporphine alkaloids: bulbocapnine, corytuberine, boldine and glaucine. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* 296, 255 (1988); Chem. Abstr. 110,69288 (1989).
- 91 Sadritdinov F., Sultanov M. B., Ismailov Y. F.: Effect of some aporphine alkaloids on the behavior of animals. *Farmakol. Alkaloidov Serdechnykh Glikozidov* 1971, 127.
- 92 Watanabe H., Ikeda M., Watanabe K., Kikuchi T.: Effects on central dopaminergic systems of d-coclaurine and d-reticuline, extracted from *Magnolia salicifolia*. *Planta Med.* 42, 213 (1981).
- 93 Boustie J., Stigliani J.-L., Montanha J., Amoros M., Payard M., Girre L.: Antipoliiovirus Structure-Activity Relationships of Some Aporphine Alkaloids. *J. Nat. Prod.* 61, 480 (1998).
- 94 Zhang Y.-N., Zhong X.-G., Zheng Z.-P., Hu X.-D., Zuo J.-P., Hu L.-H.: Sesquiterpenes and alkaloids from *Lindera chunii* and their inhibitory activities against HIV-1 integrase. *Bioorg. Med. Chem.* 15, 988 (2007).

- 95 Buchanan M. S., Davis R. A., Duffy S., Avery V. M., Quinn R. J.: Antimalarial Benzyloisoquinoline Alkaloid from the Rainforest Tree *Doryphora sassafras*. *J. Nat. Prod.* *72*, 1541 (2009).
- 96 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.* *63*, 1638 (2000).
- 97 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., Part C: Pharmacol., Toxicol. Endocrinol.* *107C*, 367 (1994).
- 98 Fournet A., Ferreira M. E., Rojas de Arias A., Guy I., Guinaudeau H., Heinzen H.: Phytochemical and antiprotozoal activity of *Ocotea lancifolia*. *Fitoterapia* *78*, 382 (2007).
- 99 Mollataghi A., Coudiere E., Hadi A. H. A., Mukhtar M. R., Awang K., Litaudon M., Ata A.: Anti-acetylcholinesterase, anti- α -glucosidase, anti-leishmanial and anti-fungal activities of chemical constituents of *Beilschmiedia* species. *Fitoterapia* *83*, 298 (2012).
- 100 Cosar G., Bilgehan H., Gozler T.: Antibacterial effects of some alkaloids isolated from *Glaucium flavum* Crantz. *Mikrobiyol. Bul.* *15*, 105 (1981); *Chem. Abstr.* *96*,214186 (1982).
- 101 Gerhardt D., Horn A. P., Gaelzer M. M., Frozza R. L., Delgado-Canedo A., Pelegri A. L., Henriques A. T., Lenz G., Salbego C.: Boldine: a potential new antiproliferative drug against glioma cell lines. *Invest. New Drugs.* *27*, 517 (2009).
- 102 Wang R., Tang S., Zhai H., Duan H.: Study on anti-tumor metastatic constituents from *Lindera glauca*. *Zhongguo Zhongyao Zazhi* *36*, 1032 (2011).
- 103 Backhouse N., Delporte C., Givernau M., Cassels B. K., Valenzuela A., Speisky H.: Anti-inflammatory and antipyretic effects of boldine. *Agents Actions* *42*, 114 (1994).
- 104 Gotteland M., Jimenez I., Brunser O., Guzman L., Romero S., Cassels B. K., Speisky H.: Protective effect of boldine in experimental colitis. *Planta Med.* *63*, 311 (1997).
- 105 Philipov S., Ivanovska N., Nikolova P.: Glaucine analogs as inhibitors of mouse splenocyte activity. *Pharmazie* *53*, 694 (1998).
- 106 Varanda E. A., Dos Santos E. C.: Photoprotective activity of boldine alkaloid in enterobacteria cultures. *Rev. Cienc. Farm. (Sao Paulo, Braz.)* *19*, 109 (1998); *Chem. Abstr.* *130*,135927 (1999).

- 107 Rancan F., Rosan S., Boehm K., Fernandez E., Hidalgo M. E., Quihot W., Rubio C., Boehm F., Piazena H., Oltmanns U.: Protection against UVB irradiation by natural filters extracted from lichens. *J. Photochem. Photobiol., B* 68, 133 (2002).
- 108 Ishihara R., Takamatsu A., Norito M., Irino M., Takiguchi Y.: Study of gastrointestinal prokinetic effect and inhibitory effect of gastric mucosal injury of laurolicine and boldine, components of *Lindera* root. *Kenkyu Hokoku - Wakayama-ken Kogyo Gijutsu Senta Date* 2009, 23 (2010); *Chem. Abstr.* 154,149943 (2011).
- 109 Yadav D. K., Singh N., Dev K., Sharma R., Sahai M., Palit G., Maurya R.: Anti-ulcer constituents of *Annona squamosa* twigs. *Fitoterapia* 82, 666 (2011).
- 110 Chi T.-C., Lee S.-S., Su M.-J.: Antihyperglycemic effect of aporphines and their derivatives in normal and diabetic rats. *Planta Med.* 72, 1175 (2006).
- 111 Lin C.-J., Chen C.-H., Liu F.-W., Kang J.-J., Chen C.-K., Lee S.-L., Lee S.-S.: Inhibition of intestinal glucose uptake by aporphines and secoaporphines. *Life Sci.* 79, 144 (2006).
- 112 Chen K.-S., Ko F.-N., Teng C.-M., Wu Y.-C.: Antiplatelet and vasorelaxing actions of some aporphinoids. *Planta Med.* 62, 133 (1996).
- 113 Teng C.-M., Hsueh C.-M., Chang Y.-L., Ko F.-N., Lee S.-S., Liu K. C.-S.: Antiplatelet effects of some aporphine and phenanthrene alkaloids in rabbits and man. *J. Pharm. Pharmacol.* 49, 706 (1997).
- 114 Chen J.-J., Chang Y.-L., Teng C.-M., Chen I.-S.: Anti-platelet aggregation alkaloids and lignans from *Hernandia nymphaefolia*. *Planta Med.* 66, 251 (2000).
- 115 Henriques J. A., Moreno P. R., Von Poser G. L., Querol C. C., Henriques A. T.: Genotoxic effect of alkaloids. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 86 *Suppl.* 2, 271 (1991).
- 116 Moreno P. R. H., Vargas V. M. F., Andrade H. H. R., Henriques A. T., Henriques J. A. P.: Genotoxicity of the boldine aporphine alkaloid in prokaryotic and eukaryotic organisms. *Mutat. Res., Genet. Toxicol. Test.* 260, 145 (1991).
- 117 Tavares D. C., Takahashi C. S.: Evaluation of the genotoxic potential of the alkaloid boldine in mammalian cell systems in vitro and in vivo. *Mutat. Res., Genet. Toxicol.* 321, 139 (1994).
- 118 Kubinova R., Machala M., Minksova K., Neca J., Suchy V.: Chemoprotective activity of boldine: modulation of drug-metabolizing enzymes. *Pharmazie* 56, 242 (2001).
- 119 Salminen K. A., Meyer A., Jerabkova L., Korhonen L. E., Rahnasto M., Juvonen R. O., Imming P., Raunio H.: Inhibition of human drug metabolizing cytochrome P450

- enzymes by plant isoquinoline alkaloids. *Phytomedicine* 18, 533 (2011); Chem. Abstr. 156,91708 (2011).
- 120 Ulrichová J., Walterová D., Preininger V., Šimánek V.: Inhibition of butyrylcholinesterase activity by some isoquinoline alkaloids. *Planta Med.* 48, 173 (1983).
- 121 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.* 76, 1762 (2010).
- 122 Steck T. L., Kant J. A.: Preparation of impermeable ghosts and inside-out vesicles from human erythrocyte membranes. *Methods Enzymol.* 31, 172 (1974).
- 123 Ellman G. L., Courtney K. D., Anders V., Feather-Stone R. M.: A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7, 88 (1961).