

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

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Biologicky aktivní metabolity rostlin

5. Alkaloidy *Zanthoxylum nitidum* a jejich biologická aktivita

Biologically active metabolites of plants.

**5. Alkaloids from *Zanthoxylum nitidum* and their biological
activity**

Vedoucí diplomové práce: Ing. Lucie Cahlíková, Ph.D.

Hradec Králové, květen 2012

Lenka Marková

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že tato diplomová práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně. Veškerá literatura a další zdroje, které byli při vypracování použity, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci jsou řádně citované.

Hradec Králové, květen 2012

Lenka Marková

Děkuji grantům SVV UK 265 002 a FRVŠ 664/2011 za finanční podporu, bez které by tato práce nemohla vzniknout.

Tímto bych chtěla poděkovat Ing. Lucii Cahlíkové Ph.D. za odborné vedení, pomoc při vypracování diplomové práce, poskytnuté materiály a věnovaný čas. Mé díky patří také Ing. Kateřině Macákové za stanovení biologických aktivit sumárních extraktů i izolovaných látek a doc. PharmDr. Jiřímu Kunešovi Ph.D. z Katedry organické a bioorganické chemie Farmaceutické fakulty v Hradci Králové za změření a interpretaci NMR spekter. Poděkovat chci také celé katedře Farmaceutické botaniky a ekologie, za příjemné pracovní prostředí a pomoc při řešení věcných i teoretických problémů.

OBSAH

1. ÚVOD	7
2. CÍL PRÁCE	10
3. TEORETICKÁ ČÁST	12
3.1 DEMENCE	13
3.1.1 Definice demence	13
3.1.2 Epidemiologie demence	13
3.1.3 Dělení demencí.....	13
3.1.3.1 Primárně degenerativní demence (atroficko-degenerativní demence).....	13
3.1.3.2 Sekundární a smíšené demence.....	14
3.2 Alzheimerova nemoc	14
3.2.1 Definice Alzheimerovy nemoci.....	14
3.2.2 Historie Alzheimerovy nemoci	14
3.2.3 Epidemiologie a rizikové faktory	15
3.2.4 Etiopatogeneze	15
3.2.4.1 Makroskopické změny při stárnutí mozku a Alzheimerově nemoci.....	15
3.2.4.2 Mikroskopické změny mozku při stárnutí a Alzheimerově nemoci.....	16
3.2.5 Acetylcholinesteráza, butyrylcholinesteráza	18
3.2.6 Genetické předpoklady.....	19
3.2.7 Klinický obraz	20
3.2.8 Diagnostika.....	21
3.2.9 Terapie Alzheimerovy nemoci	22
3.2.9.1 Inhibitory mozkových cholinesteráz	22
3.2.9.2 Inhibitory NMDA receptorů glutamatergního systému	23
3.2.9.3 Doplnkové postupy v léčbě Alzheimerovy nemoci	24
3.2.9.4 Huperzin A	24
3.3 Rod <i>Zanthoxylum</i>.....	25
3.3.1 Základní charakteristika rodu <i>Zanthoxylum</i>	25
3.3.2 <i>Zanthoxylum nitidum</i> (Rutaceae)	26
3.3.2.1 Taxonomické zařazení.....	26
3.3.2.2 Morgologický popis rostliny	26
3.3.2.3 Použití v tradiční medicíně.....	27
3.4 Látky izolované ze <i>Zanthoxylum nitidum</i>	28
3.4.1 Alkaloidy	28
3.4.2 Isochinolinové alkaloidy	28
3.4.2.1 Benzofenanthridinové alkaloidy	28
3.4.2.2 Protoberberinové alkaloidy	30
3.4.2.3 Aporfinové alkaloidy.....	31
3.4.3 Chinolinové alkaloidy	32
3.4.4 Další látky izolované ze <i>Zanthoxylum nitidum</i>	33
3.4.5 Metody extrakce a izolace benzo[c]fenantridinových alkaloidů ze <i>Zanthoxylum nitidum</i>	33

3.5	Biologická aktivita látek izolovaných ze <i>Zanthoxylum nitidum</i>	34
3.5.1	Analgetické a protizánětlivé účinky	34
3.5.2	Antivirové a antifungální účinky.....	35
3.5.3	Cytotoxická aktivita	35
3.6	Další významné druhy rodu <i>Zanthoxylum</i> a jejich obsahové látky	36
4.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	40
4.1	Všeobecné postupy	41
4.1.1	Destilace a odpařování	41
4.1.2	Tenkvrstvá chromatografie	41
4.2	Materiál a vybavení	41
4.3	Extrakce alkaloidů ze sušené drogy <i>Zanthoxylum nitidum</i> a zpracování výtřepku B	42
4.3.1	Biologický materiál	42
4.3.2	Příprava sumárního extraktu	42
4.3.3	Příprava a získání výtřepku A ze sumárního extraktu.....	42
4.3.4	Příprava a zpracování výtřepku B ze sumárního extraktu.....	42
4.3.5	Zpracování podfrakce B ₂	43
4.4	Stanovení inhibiční aktivity alkaloidních extraktů a čistých alkaloidů vůči erythrocytární AChE a sérové BuChE	44
4.4.1	Chemikálie a materiál použité pro stanovení cholinesterázové inhibiční aktivity ...	44
4.4.2	Přístroj použitý pro stanovení cholinesterázové inhibiční aktivity	45
4.4.3	Podmínky měření	45
4.4.4	Příprava erythrocytárních pouzder	45
4.4.5	Stanovení cholinesterázové inhibiční aktivity (hodnoty IC ₅₀)	45
4.5	Stanovení antioxidační aktivity alkaloidních extraktů a čistých alkaloidů	46
4.5.1	Chemikálie a materiál použité pro stanovení antioxidační aktivity	46
4.5.2	Přístroje použité pro stanovení antioxidační aktivity	46
4.5.3	Stanovení antioxidační aktivity (EC ₅₀)	46
5.	VÝSLEDKY	48
5.1	Strukturní analýza edulininu	49
5.1.1	MS studie (-)-edulininu	49
5.1.2	NMR studie (-)-edulininu	49
5.1.2.1	¹ H-NMR spektrum(-)-edulininu	50
5.1.2.2	¹³ C-NMR spektrum (-)-edulininu	51
5.2	Optická aktivita (-)-edulininu	52
5.3	Výsledky testu vlivu látky na aktivitu AChE a BuChE	52
5.4	Antioxidační aktivita	53

6. DISKUZE	54
7. LITERATURA	57
8. SEZNAM ZKRATEK	65

1. ÚVOD

Zatímco v 19. století byly největší hrozbou infekční nemoci, ve 20. století to byla onemocnění onkologická a kardiovaskulární, tak pro 21. století jsou největším strašákem choroby degenerativní, mezi které patří i nemoci neurodegenerativní, kterou je právě Alzheimerova nemoc (AD). V současné době se téměř všechny rozvinuté státy potýkají s tím, že jejich populace stárne a zvyšuje se průměrný věk jejich obyvatel, a právě věk je jedním z hlavních rizikových faktorů této choroby. AD se řadí mezi nejčastější příčiny demence, provází jí postupné zhoršování kognitivních funkcí jako je pohyb a myšlení, přítomna je porucha paměti, narušeny jsou i citové funkce a orientace¹. Toto onemocnění postihuje hlavně pacienty starší 65 let a s postupujícím věkem se riziko jeho vzniku znásobuje. Choroba nedevasuje jen život nemocného, ale i jeho blízkých a pečovatelů, pro které jsou zvláště pacienti v těžších stádiích onemocnění velkou psychickou zátěží.

V současné době neumíme AD vyléčit, zatím zvládáme pouze oddálit její těžká stádia, ale nemoc jako taková končí smrtí. V terapii se uplatňují dva postupy, jejichž použití je založeno na důkazech. První skupinou jsou léčiva, která patří mezi inhibitory cholinesteráz. Zvyšují obsah neuromediátoru acetylcholinu na nervových spojeních a zlepšují tak nervový přenos v CNS, podporují udržení kognitivních funkcí, zpomalují svým mechanismem účinku progresi onemocnění a podávány jsou především v terapii lehkých a středně těžkých stádií. Dnes používanými látkami z této skupiny jsou rivastigmin, donepezil, a galanthamin. Druhou skupinou látek, která je určena hlavně pro léčbu těžkých stádií AD, jsou inhibitory glutamátových NMDA-receptorů. Z této skupiny se v současné době používá pouze memantin².

Protože se AD stává jednou z nejčastějších příčin úmrtí, stále se pracuje na vývoji nových terapeutických postupů, které by dokázaly tuto nemoc vyléčit nebo by alespoň úplně zastavily její progresy. A právě rostliny by mohly hrát významnou roli při hledání nových látek použitelných pro terapii. Léčivou sílu rostlin znali už naši předkové, kteří používali celé rostliny nebo jejich části k léčbě různých zdravotních obtíží. S rozvojem vědy a techniky bylo zjištěno, že za určité farmakologické vlastnosti rostlin mohou v nich obsažené účinné látky, které bylo díky pokroku možné izolovat. Již osvědčenou léčivou látkou v terapii AD je i výše zmíněný galanthamin, alkaloid izolovaný ze sněženky *Galanthus woronowii* z čeledi Amaryllidaceae³.

Alkaloidy jsou sekundární metabolity rostlin, které ve své struktuře obsahují atom dusíku a jsou syntetizovány z aminokyselin. V jedné rostlině se jich běžně vyskytuje více,

jsou si často strukturně blízké a lze je z pravidla prokázat jen v určitých částech rostlin⁴. Jejich význam pro samotnou rostlinu není přesně znám, ale téměř vždy se vyznačují nějakým farmakologickým účinkem. Do dnešní doby bylo popsáno několik tisíc struktur rostlinných alkaloidů⁵, které se právě podle nich dělí do několika skupin.

Významnou skupinou, z terapeutického hlediska, jsou benzofenthridinové alkaloidy, které patří mezi isochinolinové alkaloidy. Obsaženy jsou nejčastěji v čeledi Rutaceae, Rannunculaceae, Papaveraceae a Fumariaceae⁶. Mají široké spektrum účinku, které zahrnuje antivirovou, antifungální a antimikrobiální aktivitu, dále také protizánětlivý a cytotoxický účinek.

Zdrojem těchto alkaloidů je i druh *Zanthoxylum nitidum* z čeledi Rutaceae, který se vyskytuje hlavně na jihu Asie, v Indii a Číně, ale nalézt ho lze i na severu Austrálie v Queenslandu⁷. Tato rostlina se běžně používá v tradiční medicíně k léčbě širokého spektra onemocnění, jedná se například o bolest zubů, horečku, ale i třeba o pomoc při hadích kousnutích. Účinky látek, které se z ní podařilo izolovat, byly ověřeny v několika studiích. Zkoušena byla jejich antivirová⁸ a antifungální účinnost⁸, dále pak také protizánětlivá⁹ a analgetická aktivita⁹ a testovány byly i cytotoxické účinky¹⁰ v rostlině detekovaných látek.

Předmětem této práce byla izolace alespoň jednoho alkaloidu ze sušené drogy rostliny *Zanthoxylum nitidum* a stanovení jeho biologické aktivity (inhibiční aktivita vůči acetylcholinesteráze a butyrylcholinesteráze, antioxidační aktivita).

2. CÍL PRÁCE

Cíle diplomové práce:

1. Zpracování 9,6 kg suché drogy *Zanthoxylum nitidum* a příprava alkaloidních frakcí dle pH.
2. Chromatografie jedné frakce za účelem izolace alespoň jednoho alkaloidu v čisté formě.
3. Stanovení základních fyzikálně-chemických charakteristik izolovaného alkaloidu.
4. Příprava vzorku pro stanovení biologické aktivity izolované látky (inhibiční aktivita na acetylcholinesterázu, butyrylcholinesterázu, antioxidační aktivita).

3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1 DEMENCE

3.1.1 Definice demence

Demence je onemocnění, při kterém dochází k narušení kognitivních funkcí, jako je paměť, myšlení, orientace, schopnosti řeči, učení se a úsudku, vědomí ale zastřeno není. Jde o chronické progredující onemocnění, které je spojeno se zhoršováním těchto funkcí a je často doprovázeno nebo předcházeno snížením kontroly emocí, sociálního chování a motivace.

Demenci lze také chápat jako získanou poruchu kognitivních funkcí, která je natolik závažná, že má zásadní vliv na život pacienta¹¹.

3.1.2 Epidemiologie demence

S prodlužující se délkou života a s tím souvisejícím obecným stárnutím populace se zvyšuje i počet pacientů s demencí. Ve věku 65 let je riziko vzniku tohoto onemocnění 5%, v 75 letech 10%, v 80 letech až 20% a u osob starších 90 let je riziko vzniku demence až 50%. Narůstá i počet pacientů se středním a těžkým typem demence, proto je důležitým krokem v léčbě osob trpících touto nemocí její rozpoznání již v počátečních stádiích. Největší podíl mezi demencemi zaujímá atroficko-degenerativní typ a to až 60%. Demence vaskulárního typu nepředstavují více jak 20%, nejvíce se mezi nimi objevuje multiinfarktová demence. Sekundární formy jsou zastoupeny z 10% a smíšené typy demence představují dle různých zdrojů 10-15%¹¹.

3.1.3 Dělení demencí

3.1.3.1 Primárně degenerativní demence (atroficko-degenerativní demence)

Mezi tento typ onemocnění patří Alzheimerova nemoc, která je jedním z nejpočetnějších typů demence. Dále lze do této skupiny zařadit korovou nemoc s Lewyho tělísky a demenci frontotemporální, kam patří i Pickova choroba¹¹.

3.1.3.2 Sekundární a smíšené demence

Tuto skupinu představují onemocnění, na jejichž vzniku se může podílet celá řada příčin. Jde například o demence související s cévním postižením mozku, jako je vaskulární demence, kterou lze rozdělit na multiinfarktovou a mikroangiopatickou. Další možnou příčinou vzniku demence jsou poranění mozku, postižení mozkových funkcí následkem jiných chorob, ať už infekčních, metabolických nebo nádorových, a v neposlední řadě mohou mít vliv na vznik onemocnění intoxikace¹¹.

3.2 Alzheimerova nemoc

3.2.1 Definice Alzheimerovy nemoci

Alzheimerova nemoc (AD) se řadí mezi progredující choroby a vyznačuje se charakteristickými klinickými a patofyziologickými příznaky. Jde o primární onemocnění šedé kůry mozkové. Nemoc trvá v průměru 9 let a lze rozlišit 3 stádia, počáteční, střední a těžké¹¹. V současné době není AD vyléčitelnou nemocí a končí smrtí. Při brzkém odhalení lze ale příznivě ovlivnit její průběh a oddálit tak nástup těžších stádií².

Statisticky nejvýznamnějším rizikovým faktorem vzniku AD je věk, vedlejšími rizikovými faktory jsou ženské pohlaví, nízké vzdělání a výskyt AD nebo Downova syndromu v rodině. Toto onemocnění se objevuje především sporadicky, ale jsou popsány familiární případy s autozomálně dominantní dědičností¹².

3.2.2 Historie Alzheimerovy nemoci

Počátek výzkumu AD se obvykle počítá od přednášky Aloise Alzheimerera v roce 1906 v Tübingenu nebo od uveřejnění jeho práce v roce 1907. Jeho přednáška se týkala poznatků, ke kterým dospěl při vyšetřování mozku paní Auguste D, která zemřela s diagnózou těžké demence. V jejím mozku objevil senilní plaky, které byly již dříve popsány Redlichem¹³. On sám se zasloužil o objev neuronálních klubek, jinak také nazývaných „Alzheimerovy změny neurofibril“. Jeho spolupracovníci se shodli na tom, že jde o pozorování odlišné od toho, které je možné vidět při klinicky normálním stárnutí mozku, a navrhli, aby toto onemocnění neslo

jméno právě Aloise Alzheimerera. Vývoj pojmu této choroby, s ohledem na genetické poznatky v současné době, prozatím ukončen není¹⁴.

3.2.3 Epidemiologie a rizikové faktory

AD je příčinou minimálně 60% případů demence a je čtvrtou až pátou nejčastější příčinou smrti¹².

Nemoc je dělena na formu s časným začátkem (early-onset AD), kdy se klinické příznaky objevují do 60 let, a na formu s pozdním začátkem (late-onset AD), u které se první náznaky onemocnění vyskytnou až ve věku 65 let a výše. Choroba s časným začátkem je poměrně vzácná oproti pozdní formě AD, která je mnohem častější. Oba typy mohou být podmíněny familiární dědičností. Od věku 65 let se počet nových případů každých dalších pět let zdvojnásobuje. Incidence i prevalence u této choroby roste s věkem a vzhledem k celosvětovému stárnutí populace představuje výrazný problém¹⁵.

Pokud jde o pohlaví, ve vysokém věku jsou ženy ohroženější než muži. Obecně riziko výskytu jakékoli demence je u žen 1,9krát vyšší než u mužů a u AD je nebezpečí jejího vzniku u žen až 3,1krát vyšší než u mužů. Demograficky standardizovaná míra úmrtnosti na tuto chorobu je u žen 602 případů/100 000 a u mužů je to 285 případů/100 000¹⁴.

Na vzniku choroby se mohou různou měrou podílet také genové mutace, a to na chromozomech 21, 14 a 1, dále pak Downův syndrom a také nosičství alely eta-4 genu pro apolipoprotein E. Dalšími rizikovými faktory pro rozvoj AD jsou poranění hlavy, nižší vzdělání a kouření cigaret¹⁴.

3.2.4 Etiopatogeneze

3.2.4.1 Makroskopické změny při stárnutí mozku a Alzheimerově nemoci

Během klinicky normálního stárnutí se snižuje hmotnost i velikost mozku, kromě tohoto jevu s věkem klesá i jeho objem a dochází k úbytku jak mozkové kůry, nejvíce ve frontální oblasti, tak i bílé hmoty¹⁴.

Při Alzheimerově nemoci můžeme pozorovat podobné změny jako při stárnutí. Ty jsou podstatně nápadnější u presenilních onemocnění, u nichž může pokles hmotnosti mozku v porovnání s mozky kontrolními dosáhnout 200 až 300g¹⁶.

3.2.4.2 Mikroskopické změny mozku při stárnutí a Alzheimerově nemoci

1. Neuron

V průběhu klinicky normálního stárnutí dochází k poklesu počtu neuronů, jejich numerické atrofii. Tento děj lze odhalit jen v některých oblastech mozku a v různém stupni. Ze studií vyplývá, že čelní a spánkové laloky jsou postiženy více než například lalok temenní¹⁵ a snížení počtu neuronů se týká také hipokampu a amygdaly¹⁷. Mimo to klesá objem hemisfér mozečku a hustota Purkyňových buněk¹⁸, velkých buněk hruškovitého tvaru, které se nachází v kůře mozečku.

V průběhu Alzheimerovy nemoci se numerická atrofie projevuje mnohem masivněji, než je tomu u procesu normálního klinického stárnutí, a to jak v mozkové kůře, tak i v podkorových oblastech. Snižování počtu buněk se objevuje také v cholinergním systému, noradrenergním, dopaminergním (oblast substantia nigra), serotoninergním i peptidergním systému, v hypotalamu a ve striatu¹⁷. Nejnápadnější pokles cholinergních vláken byl při Alzheimerově nemoci zjištěn ve spánkové asociační kůře, zatímco v primární zrakové, somatosenzorické i motorické kůře jsou cholinergní vlákna početně relativně zachována¹⁹.

Mechanismus, kterým neuron v průběhu onemocnění zanikají, není přesně znám. Zatím nebylo objasněno, do jaké míry se na mechanismu zániku neuronů při Alzheimerově nemoci uplatňuje právě apoptóza, řízená a naprogramovaná buněčná smrt.

Apoptóza neuronů může také souviset s množstvím genu Bcl-2, ten se podílí na regulaci molekulárních reakcí vedoucích k programované buněčné smrti. Gen Bcl-2 je považován spíše za inhibitor apoptózy, oproti tomu Bax protein (Bcl-associated X protein) je považován za její spouštěč. Je možné, že poměr množství Bax k množství Bcl-2 a dalším antiapoptoticky účinným členům proteinové skupiny Bcl-2 určuje přežití nebo zánik neuronů, které jsou vystaveny podnětům, jež buněčnou smrt spouštějí²⁰.

Vývoj onemocnění provázejí také změny počtu synapsí a dendritických systémů. Tyto změny odpovídají stupni postižená kognitivních funkcí a demence je tím závažnější, čím je počet synapsí nižší. Ani postižení synapsí v průběhu AD není v mozkové kůře rovnoměrné. Nejvíce poškozena je čelní kůra, nejméně zasažena je kůra týlní²¹. K regresivním změnám dochází také v oblasti hipokampu, u Purkyňových buněk mozečku a v mozkové kůře čelního laloku.

2. Senilní plaky

Senilní plaky se skládají z extracelulárního jádra, které je tvořeno amyloidem a toto jádro je obklopeno abnormálními neurity. V histologických řezech se obvykle jeví jako nepravidelně okrouhlé, heterogenní útvary velké asi 10-200 μ . Po zobrazení barvicími technikami se dají odhalit jak v mozkové kůře, tak v podkorové šedi a kůře mozečku²².

Při Alzheimerově nemoci se v mozku objevuje větší počet senilních plak než je tomu u klinicky normálního stárnutí mozku²³. Různými druhy barvení lze histologicky rozlišit celkem osm typů senilních plak a struktur, které jsou si patogeneticky blízké.

Přítomnost i malého počtu senilních plak může vyvolat zánět, který poškozuje normální funkce neuronů v okolí a ty nakonec zanikají²⁴.

3. Neuronální klubka

Neuronální klubka jsou synonymem pro Alzheimerovy změny neurofibril, jež jsou právě objevem Aloise Alzheimerera. Po impregnaci stříbrem se v mikroskopu jeví jako chomáče hrubších vláken, případně jako plamének, který prostupuje cytoplazmu neuronu. Přesnější popis neuronálních klubek umožnily až nové technologie¹⁴.

Tato klubka se nachází uvnitř neuronů, jejich součástí je hyperfosforylovaný τ -protein, který je v asociaci s neuronálními mikrotubuly. Hyperfosforylace τ -proteinu vede k jeho polymerizaci a tvorbě párových spirálních vláken, právě ty jsou základní stavební jednotkou nitrobuněčných neuronálních klubek. Takto postižené neurony podléhají apoptóze²⁵.

4. A- β -protein

Ukládání abnormálních vláknitých proteinů extra- i intracelulárně se obecně nazývá amyloidóza. Bílkovina, která má vlastnosti amyloidu se objevuje v průběhu vlastního stárnutí i během Alzheimerovy nemoci v mozku v senilních placích a cévních stěnách.

Amyloidový prekurzorový protein (APP) je běžný integrální protein, který je součástí membrán neuronů. Ve zdravém mozku dochází k jeho štěpení pomocí enzymu α -sekretázy na neškodné fragmenty, které jsou rozpustné. V důsledku mutace se ale objevuje specifický enzym, beta- a gama-sekretáza, štěpící APP za vzniku amyloidového peptidu, který se spojuje do neurotoxických řetězců. Další polymerizací se tvoří nepohyblivé shluky a právě ty jsou

známé jako patologický protein β -amyloid. Předpokládá se, že tento protein narušuje přenos signálu na synapsi. Důsledkem je přerušení přenosu informací mezi neurony a poruchy metabolismu uvnitř neuronu, kdy dochází k nadměrné fosforylaci τ -proteinu. Shluky β -amyloidu tvořené fibrilami, známé jako senilní nebo amyloidové plaky, se kumulují ve zvýšené míře vně nervových buněk, vyvolávají zánětlivou reakci a zánik okolních nervových buněk²⁴.

A- β -protein je tedy dalším klíčovým patogenetickým článkem degenerativních procesů při Alzheimerově nemoci. K zvýšení tvorby A- β -proteinu dochází díky mutacím genu pro amyloidový prekurzorový protein na 21. chromozomu, genu kódujícím presenilin 1 na 14. chromozomu a genu kódujícím tvorbu presenilinu 2 na 1. chromozomu¹⁴.

5. *Apolipoprotein E*

Apolipoproteiny slouží jako cholesterol transportující proteiny a zajišťují také navázání lipoproteinů na specifická vazebná místa. Prostřednictvím apolipoprotien E se lipoproteiny vážou na své receptory v játrech.

Přítomnost apolipoproteinu E (ApoE) lze mimo jater detekovat také v mozku, kde má vliv na reparaci neuronů, růst dendritů a popsán je i jeho protizánětlivý vliv. Gen pro ApoE se nachází na 19. chromozomu, je polymorfní a v současné době byly rozpoznány tři alely $\epsilon 2$, $\epsilon 3$, a $\epsilon 4$, které kódují tři různé izoformy lipoproteinu ApoE2, ApoE3 a ApoE4. Nejčastější formou je ApoE3, která se vyskytuje přibližně u 77-78% populace. Přítomnost alely pro tvorbu ApoE4 zvyšuje riziko vzniku Alzheimerovy nemoci, není ale podmínkou pro vznik tohoto onemocnění²⁶.

ApoE ovlivňuje patogenezi Alzheimerovy nemoci několika mechanismy. Zvyšuje toxicitu senilních plak, v nichž byla přítomnost ApoE prokázána imunoreaktivními metodami. Jako další byl také popsán vliv ApoE na cholesterol, na aktivitu acetylcholinesterázy a β -sekretázy, která hraje výraznou roli ve vzniku β -amyloidu²⁶.

3.2.5 **Acetylcholinesteráza, butyrylcholinesteráza**

V mozku člověka se nachází dva typy cholinesteráz, acetylcholinesteráza (AChE) a butyrylcholinesteráza (BuChE). Jsou to enzymy, které hydrolyticky štěpí neuromediátor acetylcholin a tlumí tak cholinergní přenos signálu na synapsi.

AChE je hlavní enzym, který degraduje acetylcholin na nervovém spojení. Další enzym, BuChE, se ve zdravém mozku nachází v nižší míře a na rozkladu acetylcholinu se tak podílí pouze okrajově. U osob trpících AD je však nově vytvářena gliovými buňkami amyloidních plaků a zvyšuje se tak její podíl na odbourávání acetylcholinu²⁷. Právě tato aktivita BuChE spojená s plaky, se zdá být vlastností, jež odlišuje patologii AD od jedinců, v jejichž mozku se plaky v určité míře nachází také, ale demencí netrpí²⁸.

3.2.6 Genetické předpoklady

Alzheimerova nemoc patří mezi heterogenně dědičná onemocnění. Rozlišují se dvě základní podoby dle fenotypu: raná forma (early-onset AD) a pozdní forma (late-onset AD).

Raná forma AD je podmíněna genovými poruchami na třech různých chromozomech. Na chromozomu 21 byl detekován gen, který kóduje APP a v současné době je popsáno pět jeho různých mutací které se podílí na vzniku a progresi onemocnění. V roce 1992 byla objevena další genetická vazba a to mezi 14. chromozomem a AD s raným začátkem²⁹. Odhalený gen, jež tuto souvislost způsobuje, kóduje protein tvořený 467 aminokyselinami a byl pojmenován presenilin 1 (PS1). V rodinách, které jsou postiženy ranou formou Alzheimerovy nemoci, bylo odhaleno několik desítek patogenních mutací tohoto genu pro PS1 a onemocnění u takto postižených osob začíná mezi 35. až 50. rokem věku¹⁴. Také na 1. chromozomu byl objeven gen, který vykazuje velkou podobnost s genem pro PS1 z hlediska sekvence bází a byl nazván presenilin 2 (PS2). Zatím byly popsány dvě jeho patogenní změny, které se mohou zúčastnit na vzniku choroby³⁰.

Genová mutace pro APP jsou odpovědné asi za 5 % případů rané familiární AD. Oproti tomu mutace genů PS1 a PS2 jsou společně zodpovědné přibližně za 70-80% jejich případů¹⁴.

Pozdní forma choroby je podmíněna změnami genu pro apolipoprotein E na 19. chromozomu a také pravděpodobně souvisí s mutacemi mitochondriální DNA³¹.

Mezi další genetické poruchy, jež mohou vést k AD, patří Downův syndrom, ten ve většině případů souvisí s trizomií na 21. chromozomu. Téměř u všech jedinců s Downovým syndromem starších 35 let lze najít v mozku změny charakterizující Alzheimerovu nemoc. Přičemž rozložení neuropatologických změn mozku u těchto pacientů odpovídá jejich rozmístění u pacientů s Alzheimerovou nemocí, ale bez Downova syndromu. Převažuje u nich také postižení hipokampu, amygdaly a asociační kůry čelní, temenní a spánkové oblasti¹⁵.

3.2.7 Klinický obraz

Alzheimerova nemoc je zhoršující se onemocnění, které zpočátku probíhá bezpříznakově, takže si okolí nemocného počátečních projevů nemusí všimnout. Prvními signály bývají drobné změny osobnosti, návyků a chování. S postupem chorobného procesu se ale objevují kognitivní poruchy a snižuje se funkční výkonnost. Poměrně časně se také vyskytují obtíže s orientací v prostoru a to i v místech, která jsou pro nemocného důvěrně známá. Tyto problémy už si začíná uvědomovat sám pacient, nebo jeho blízké okolí, a nemocní se často snaží své obtíže maskovat.

Kromě zhoršení paměťových funkcí se objevují také poruchy řeči a zrakoprostorové orientace. S postupem onemocnění dochází ke snižování soběstačnosti pacienta, jsou zaznamenány změny osobnosti, objevují se emoční poruchy a změny v chování.

Jednotlivá stádia AD lze dělit podle toho, jak postupuje ztráta paměti a zvyšuje se závislost nemocného na pomoci okolí.

1. Počáteční stádium

- demence mírného stupně, porucha učení se novým informacím, ale vybavování starších údajů zůstává zachováno, obtíže s vybavováním běžných informací, časová a prostorová dezorientace, zapomínání na výkon rutinních denních činností a časté hledání odložených věcí, nedochází k omezení soběstačnosti.
- toto stádium trvá od začátku onemocnění 1-4 roky.

2. Střední stádium

- stádium s již silně progredující poruchou paměti, uchovávané zůstávají jen hluboce vštípené informace, nové informace si pacient zapamatuje jen na velmi krátkou dobu, nemocný se ztrácí i ve známém prostředí, je silně dezorientovaný, soběstačnost je významně narušena, nápadně se zhoršují i řečové funkce.
- doba trvání tohoto stádia je od 2 do 10 let od počátku nemoci.

3. Těžké stádium onemocnění

- téměř úplná ztráta paměti bez schopnosti zapamatovat si novou informaci, vybavení si pouze již dříve vštípené informace, ale v nesouvislých útržcích, neschopnost rozpoznat své blízké, naprostá nesoběstačnost a závislost na péči okolí, výrazné poruchy chování, končí smrtí pacienta.
- nástup tohoto stádia lze pozorovat po 7 až 14 letech od počátku AD¹².

3.2.8 Diagnostika

Průkazu Alzheimerovy nemoci předchází diagnostika demence, ke které vedou klinická vyšetření, údaje získané z anamnézy a dále nejrůznější testy. Jako screeningový test v diagnostice demence je nejčastěji používán test MMSE (Mini-Mental State Examination)³². Ten je pouze orientační, protože je ovlivněn řadou faktorů, jako např. verbální úroveň pacienta, jeho vzdělání a další prvky, které nezohledňuje, a může proto poskytovat falešně pozitivní výsledky. Zaměřuje se hlavně na kognitivní funkce, které jsou zprostředkované pomocí řeči a nezahrnuje tak tedy další oblasti mozkové kůry.

Dalším metodou je test kreslení hodin (Clock Drawing Test, CDT), který je pro Alzheimerovu nemoc specifitější. Během tohoto testu má pacient za úkol nakreslit ciferník hodin se všemi čísly a ručičky tak, aby naznačovaly konkrétní čas. Takto se zkouší zrakově-prostorové vnímání pacienta².

Pro diagnostiku Alzheimerovy nemoci se využívají kritéria NINCDS-ADRDA (National Institute of Neurologic, Communicative Disorders and Stroke – Alzheimer's disease and Related Disorders)³³ a DSM – IV (Diagnostic and Statistical Manual, 4. revize). Společným znakem vývoje demencí je prohlubující se porucha paměti společně se zhoršujícími se pracovními a sociálními funkcemi. K určení diagnózy přispívá také hodnocení denních aktivit a odhalení poruch chování a nálady během rozhovoru s pacientem.

Provádí se také neurologická vyšetření pomocí počítačové tomografie a magnetické rezonance, během nich mohou být odhaleny atrofie mediálních temporálních struktur, amygdaly a hippocampu, zobrazeno může být i rozšíření komorového systému, hlavně v oblasti temporálních rohů postranních komor.

Další možností je provedení laboratorních vyšetření mozkomíšního moku, ve kterém se prokazují tři konkrétní biomarkery. Fosfo- τ -protein, který se podílí na vzniku neuronálních

klubek, a β -amyloid, který je součástí senilních plaků. Tyto dvě látky patří mezi specifické znaky pro diagnostiku Alzheimerovy nemoci. Dále pak lze prokázat přítomnost τ -proteinu, jež slouží jako nespecifický identifikační znak a jeho hladina se mění s věkem³⁴.

3.2.9 Terapie Alzheimerovy nemoci

Terapeutické postupy léčby Alzheimerovy nemoci zatím vedou pouze ke zpomalení progresu onemocnění a modulaci choroby, k vyléčení onemocnění však nedochází. Terapie zahrnuje farmakoterapii kognitivních a nekognitivních funkcí, léčbu přidružených somatických poruch, psychoterapii, sociální terapii a práci s pečovateli a blízkými příbuznými pacientů, pro které je tato choroba také vysokou zátěží a to nejen emoční, ale i ekonomickou a pracovní².

V současnosti existují dva farmakoterapeutické postupy, které jsou založeny na důkazech, a patří mezi ně použití inhibitorů mozkových cholinesteráz, tzv. kognitiv, a inhibitorů NMDA receptorů, které lze vzájemně kombinovat, jde však o léčbu finančně nákladnou.

3.2.9.1 Inhibitory mozkových cholinesteráz

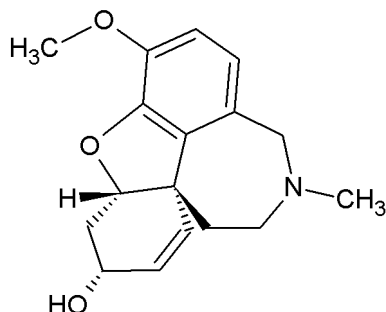
Inhibitory mozkových cholinesteráz blokují enzymy, které v synaptické štěrbině odbourávají acetylcholin. Tím dochází ke zvýšení hladiny acetylcholinu a úpravě cholinergního přenosu na nervových synapsích, což má za následek zlepšení paměťových funkcí a pozornosti².

V současnosti jsou v naší republice používány tři inhibitory mozkových cholinesteráz, které jsou určeny k terapii lehké až střední demence vzniklé na podkladě AD.

Donepezil je piperidinový derivát, který patří mezi reverzibilní inhibitory acetylcholinesterázy. Jedná se o dobře tolerovanou látku bez významných nežádoucích účinků a povolenými léčivy, které ji obsahují, jsou Aricept®, Yasnal®.

Terciární alkaloid získaný z některých druhů sněženek a narcisů čeledi Amarillidaceae, který byl poprvé izolován z cibulí sněženky *Galanthus woronowi*³, je galanthamin (Obr. 1), který působí jako inhibitor acetylcholinesterázy a zároveň modulátor presynaptických i postsynaptických nikotinových receptorů, což také zesiluje cholinergní nervový přenos a právě tato vlastnost galanthaminu je v terapii AD výhodou. Galanthamin, v registrovaných

léčivých přípravcích Reminylu® a Apo-Galantu®, je dobře snášen, má minimum nežádoucích účinků a k dispozici jsou i lékové formy s prodlouženou délkou uvolňování léčivé látky.



Obr. 1: Struktura galanthaminu

Další látkou využívanou v terapii AD je rivastigmin (Exelon®), karbamátový derivát, který účinkuje jako duální inhibitor, blokuje tedy nejen funkci acetylcholinesterázy ale i butyrylcholinesterázy. Mezi jeho výhodné vlastnosti patří schopnost pozitivně ovlivňovat psychotické příznaky, které AD provázejí. Rivastigmin je dostupný také v podobě transdermálních náplastí. Tato léková forma má stejnou účinnost jako tablety a současně se tak lze vyhnout častým nežádoucím účinkům na gastrointestinální trakt.

Kontraindikací pro podání všech tří těchto účinných látek je aktivní gastroduodenální vředová choroba a závažnější poruchy převodního systému srdce³⁵.

3.2.9.2 Inhibitory NMDA receptorů glutamatergního systému

U nemocných s AD dochází k nadměrnému uvolňování excitačních aminokyselin, tzv. excitotoxicitě, ta ve svém důsledku vede k zvýšené aktivitě NMDA receptorů a tím způsobené vyšší hladině kalciových iontů vstupujících do neuronů. Právě zvýšený obsah kalciových iontů v neuronech může být spouštěčem jejich apoptózy. Excitotoxicita také narušuje proces učení a hlavně dlouhodobé paměti. Ve skupině inhibitorů NMDA receptorů je zatím dostupná pouze jedna účinná látka, memantin (Ebixa®), který je parciálním inhibitorem NMDA receptorů a snižuje tak škodlivé působení nadměrné excitace na neurony. Tato látka se používá hlavně k léčbě středního a těžkého stádia onemocnění³⁵.

3.2.9.3 Doplnkové postupy v léčbě Alzheimerovy nemoci

Tyto postupy nejsou založeny na výsledcích z klinických studií, ale lze u nich pozorovat mírné ovlivňování jak kognitivních tak i nekognitivních funkcí a jsou vhodné do kombinace s inhibitory cholinesteráz a memantinem. Právě extrakt z ginkgo biloba náleží mezi takovéto látky, používána jsou také nootropní farmaka, jako je piracetam a pyrytinol, u kterých ale nebyl efekt v léčbě demencí prokázán.

Dalšími léčivy, která se v terapii Alzheimerovy nemoci také uplatňují, jsou látky ovlivňující alespoň symptomaticky poruchy chování, emocí, cyklus bdění a spánku. Jedná se o antipsychotika, antidepresiva 3. generace, selektivní inhibitory zpětného vychytávání serotoninu (SSRI), a také antidepresiva 4. generace, ovlivňující zpětné vychytávání serotoninu i noradrenalinu (SNRI). Vždy je nutné vyhýbat se látkám, které by mohly mít anticholinergní vlastnosti a zhoršovaly by tak kognitivní deficit³⁶.

Jako doplňková léčiva je možné použít také scavengery, neboli vychytávače volných radikálů jako je vitamin E, retinol a beta-karoten, dále pak i nesteroidní antirevmatika procházející hematoencefalickou bariérou, ke kterým se řadí kyselina acetylsalicylová, ibuprofen a nimesulid. Využívány jsou také vitamínové přípravky obsahující vitamin B 12, koenzym Q 10 a kyselinu listovou³⁷.

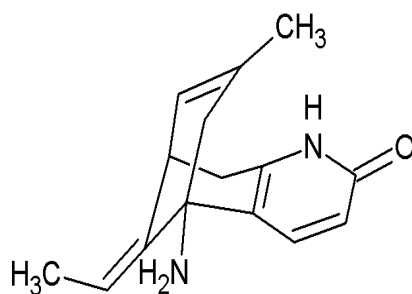
K léčbě Alzheimerovy nemoci se řadí i nefarmakologické postupy, jako je psychoterapie a sociální pomoc. Důležitá je stimulace pacienta a neustálé opakování a reedukace denních činností vhodnou formou a se zaměřením na činnosti, které si pacient je schopen sám vybavit a pamatuje si je, nikdy není vhodné snažit se nemocného novým činnostem naučit a to vše spolu s citlivým přístupem k nemocnému, aby nedocházelo ke zbytečnému zvyšování jeho úzkosti ve strachu z neúspěchu. Neméně významná je také edukace pečovatelského personálu a rodinných příslušníků, pro které nemocný představuje extrémní zátěž².

3.2.9.4 Huperzin A

Huperzin A (Obr. 2) je látka získaná z plavuně *Huperzia seratta*³⁸. Jedná se o alkaloid se silným reverzibilním inhibičním účinkem na acetylcholinesterázu. V současné době je využíván k léčbě Alzheimerovy choroby pouze v Číně, kde jsou již klinické testy ve své 4. fázi a vstoupil tedy do běžné klinické praxe a sledovány jsou jeho vedlejší a nežádoucí

účinky. Tato látka je také testována v USA, kde jsou klinické testy teprve ve 2. fázi, zkouší se tak na omezeném počtu dobrovolníků, kteří jsou chorobou postiženi³⁹.

Tato látka silně inhibuje AChE, má také neuroprotektivní vlastnosti, zlepšuje paměť a procesy učení, navíc snižuje pocit úzkosti. Objevují se u něj obdobné vedlejší účinky jako u galanthaminu, tedy nauzea, rozmazané vidění a pocení, ale intenzita vedlejších účinků je menší. Charakteristická je delší doba účinku v porovnání s donepezilem a rivastigminem, a oproti jiným látkám, které se uplatňují v léčbě AD, rychleji prostupuje skrz hematoencefalickou bariéru a má lepší biologickou dostupnost po perorálním podání⁴⁰.



Obr. 2: Struktura huprezinu A

3.3 Rod *Zanthoxylum*

3.3.1 Základní charakteristika rodu *Zanthoxylum*

Rod *Zanthoxylum* patří do čeledi Rutaceae. Jeho název pochází ze slova *Xanthoxylum*, které je řeckého původu a skládá se ze dvou slov „xanthon xylon“, v českém překladu to znamená „žluté dřevo“, od toho i české pojmenování žlutodřev. Někteří autoři se v používání názvů rozcházel a byly používány oba pojmy, tedy *Zanthoxylum* i *Xanthoxylum*, dnes je upřednostňován pojem *Zanthoxylum*. Mimo to byl v minulosti tento rod odlišován od rodu *Fagara* kvůli odlišné stavbě květních obalů. Až v roce 1966 byly oba rody sjednoceny pod názvem *Zanthoxylum*⁴¹.

Druhů, které spadají pod tento rod, lze v rostlinné říši nalézt více jak 250. Nejvíce rozšířeny jsou v mírném nebo tropickém pásu v Asii, Jižní i Severní Americe a v Austrálii. Většinou se jedná o keře nebo stromy, které dorůstají výšky až 20 m. Charakteristické jsou pro ně pichlavé trny na kmenech a větvích. Listy jsou buď jednoduché, nebo složené, ty

mohou být sudo- i lichozpeřené. Květenstvím je složená lata nebo složený úbor. Květy lze rozdělit více než dvěma rovinami na shodné poloviny, jsou tedy pravidelné. Podle přítomnosti samčích a samičích pohlavních orgánů lze na rostlině odlišit květy jednopohlavné a oboupohlavné, které se nevyskytují u tohoto druhu tak často. Keře i stromy jsou zpravidla jednodomé, takže samčí i samičí květy se nachází na jedné rostlině. Plodem je buď suchý pukavý měchýřek, nebo dvounažka, které obsahují vždy jedno lesklé semeno červené nebo černé barvy, které je jedlé a velmi aromatické⁴². Jednotlivé druhy rodu *Zanthoxylum* nacházejí využití v rozmanitých oblastech, v průmyslu jako suroviny pro dřevovýrobu, v potravinářství jako koření, dále pak i v kosmetice. Důležitým odvětvím je také medicína, kde tyto rostliny a z nich extrahované látky mohou nalézt díky širokému záběru účinných látek své místo v léčbě nádorových onemocnění, malárie, Alzheimerovy nemoci, AIDS, bakteriálních a houbových chorob a dalších nemocí.

3.3.2 *Zanthoxylum nitidum* (Rutaceae)

3.3.2.1 Taxonomické zařazení

Říše:	Plantae (rostliny)
Podříše:	Tracheobionta (cévnaté rostliny)
Nadoddělení:	Spermatophyta (semenné rostliny)
Oddělení:	Magnoliophyta (krytosemenné rostliny)
Třída:	Magnoliopsida (vyšší dvouděložné rostliny)
Podtřída:	Rosidae
Řád:	Sapindales (mýdelníkotvaré)
Čeleď:	Rutaceae (routovité)
Rod:	<i>Zanthoxylum</i> (žlutodřev)
Druh:	<i>Zanthoxylum nitidum</i>

3.3.2.2 Morfologický popis rostliny

Zanthoxylum nitidum (Obr. 3) je morfologicky velmi variabilní druh, který v deštných pralesích roste jako liána, na sušších místech ho pak lze nalézt jako keř. Rozšířen je přes jihovýchodní Čínu do Indie, roste ale také v severním Queenslandu v Austrálii⁷.

Lokální název kořene této rostliny, který se používá v tradiční místní medicíně, je „liang-mian-zhen“⁴³, v asámštině je pak tento druh známý jako „Tez-mui“⁴⁴.



Obr. 3: *Zanthoxylum nitidum*⁴⁴

3.3.2.3 Použití v tradiční medicíně

V tradiční medicíně je *Zanthoxylum nitidum* využíváno k léčbě širokého spektra onemocnění. Kořen je používán k odstranění bolesti zubů nebo břicha, také proti horečce a revmatismu, ke zlepšení cirkulace krve a jako protijed při hadích kousnutích⁴⁵. K léčbě nachlazení, kašle, zvracení, průjmu a jako stimulans se využívá plod. V lidovém léčitelství mají své místo i další části rostliny, jako jsou větvičky a listy, které mohou působit kromě výše zmíněných vlastností i analgeticky⁴⁶.

3.4 Látky izolované ze *Zanthoxylum nitidum*

3.4.1 Alkaloidy

Jedná se o organické dusíkaté sloučeniny, které lze nalézt hlavně v rostlinách, mimo ně mohou být také produktem metabolismu mikroorganismů a živočichů. Typická je pro ně přítomnost jednoho nebo více atomů dusíku, jež jsou nositeli zásaditých vlastností⁴⁷.

Alkaloidy byly dle Pelletiera definovány jako cyklické sloučeniny obsahující atom dusíku v záporném oxidačním stavu s omezeným výskytem v živých organismech. Tato definice zahrnuje jak struktury s heterocyklicky vázaným dusíkem, tak ty kde je tento atom vázán mimo cyklus⁴⁸.

Ve většině případů jsou alkaloidy zásadité, neboli alkalické látky, od této vlastnosti se odvozuje i jejich název. Zásaditost se také využívá při izolaci těchto sloučenin, protože v přítomnosti minerálních kyselin dochází ke tvorbě solí, které jsou ve vodě rozpustné.

Tyto sloučeniny se řadí mezi jedny z nejdůležitějších obsahových látek, které lze ze *Z. nitidum* izolovat. Nejčastěji lze po extrakci detekovat alkaloidy isochinolinové a chinolinové.

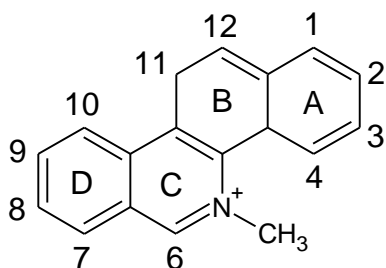
3.4.2 Isochinolinové alkaloidy

Isochinolinové alkaloidy jsou syntetizovány z aminokyseliny tyrosinu, jejímž prekurzorem je jiná aminokyselina, fenylalanin. Isochinolinový skelet lze nalézt v poměrně široké skupině struktur, které se mezi sebou jen mírně liší.

Do této skupiny můžeme zařadit alkaloidy benzofenanthridinové, benzyloisochinolinové, protoberberinové, aporfínové a další. Právě benzofenanthridinové alkaloidy jsou pro *Z. nitidum* typické, stejně jako pro celou čeleď Rutaceae.

3.4.2.1 Benzofenanthridinové alkaloidy

Jsou to kvarterní alkaloidy, jejichž základní strukturu tvoří N-methylbenzo[c]fenanthridinový kationt (Obr. 4) a kladný náboj nese methylovaný dusíkový atom v poloze 5⁴⁹.

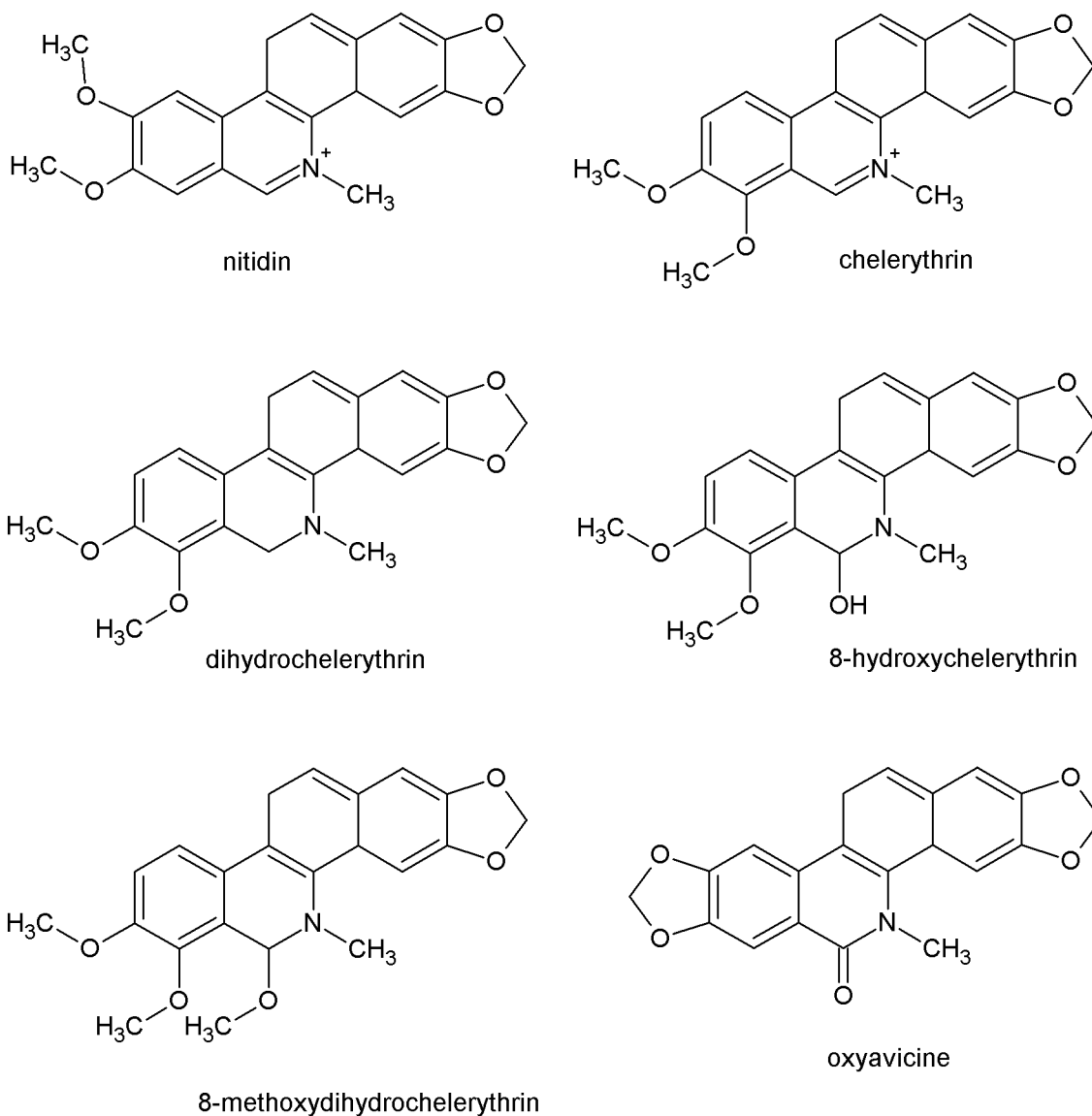


Obr. 4: N-methylbenzo[c]fenathridinový kationt

Při nižších hodnotách pH nese alkaloid kladný náboj, lze tedy detekovat kvarterní dusík a sloučenina je polární, relativně dobře rozpustná ve vodě a výrazně zbarvená. Oproti tomu při vyšším pH, tedy v alkalickém prostředí, přechází kvarterní forma na terciární, která je nepolární, málo rozpustná a nebarevná⁵⁰.

Sloučeniny tohoto typu jsou v *Z. nitidum* široce zastoupeny. Významnými látkami jsou nitidin a chelerythrin (Obr. 5), u kterých byly prokázány protinádorové vlastnosti⁵¹, schopnost inhibovat aktivitu DNA topoisomérázy I⁵², která štěpí vždy jeden ze dvou řetězců DNA a hraje důležitou roli v její replikaci. Dalšími benzofenanthridinovými alkaloidy, které byly v rostlině prokázány jsou oxyvicin, dihydrochelerythrin, 8-methoxychelerythrin, 8-hydroxy-dihydrochelerythrin. Jejich struktury jsou uvedeny na obrázku (Obr. 5).

Tyto alkaloidy lze nalézt v celé čeledi Rutaceae a dále byly identifikovány také v čeledi Papaveraceae, Ranunculaceae a Fumariaceae⁶.

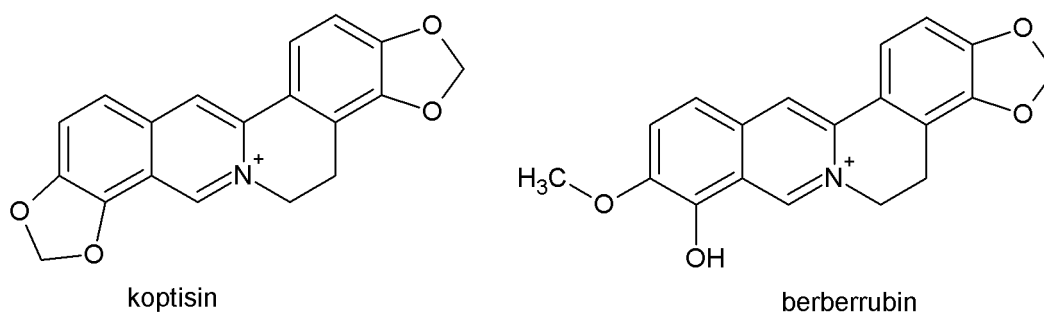


Obr. 5: Struktury benzofenanthridinových alkaloidů

3.4.2.2 Protoberberinové alkaloidy

Dalším typem alkaloidů jsou protoberberinové alkaloidy, které jsou odvozeny od tyrozinu. Jedná se o skupinu sekundárních metabolitů s širokým spektrem biologické aktivity. V *Z. nitidum* byla prokázána přítomnost koptisinu⁵³ (Obr. 6), který má ověřené cytotoxické vlastnosti na lidské nádorové buňky⁵⁴ a reverzibilně inhibuje enzym monoaminoxidázu A⁵⁵. Ta se podílí na degradaci neurotransmiterů obsahujících ve své struktuře aminovou skupinu, jde například o adrenalin, noradrenalin a dopamin. Sloučeninou, která se také řadí do skupiny

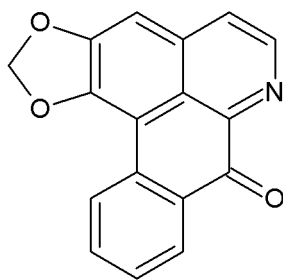
protoberberinových alkaloidů, je i berberrubin⁵⁶ (Obr. 6), u něhož byla pozorována výrazná protinádorová aktivita⁵⁷.



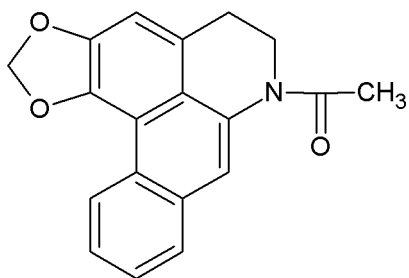
Obr. 6: Struktury protoberberinových alkaloidů

3.4.2.3 Aporfinové alkaloidy

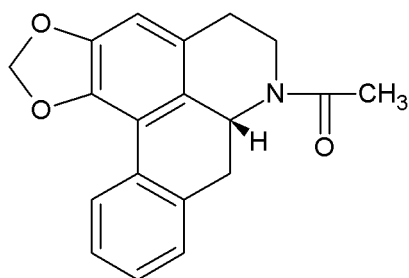
Alkaloidy aporfinového typu (Obr. 7) jsou odvozeny od aporfinu⁵⁸. Z kůry *Z. nitidum* byly izolovány tři sloučeniny, které se řadí do této skupiny. První látkou je liriodenin⁵⁹, který působí jako silný inhibitor na topoizomerázu II⁶⁰, ta je na rozdíl od topoizimerázy I schopná rozštěpit oba řetězce DNA a zvyšuje tak složitost její nadšroubovicové struktury. Dalšími izolovanými sloučeninami jsou N-acetyldehydroanonain⁶¹ a N-acetylanonain⁶², jejichž struktury jsou znázorněny na následujícím obrázku (Obr. 7).



liriodenin



N-acetyldihydroanonain

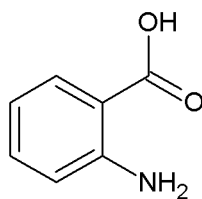


N-acetylanonain

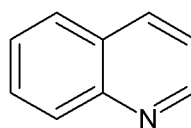
Obr. 7: Struktury aporfinových alkaloidů

3.4.3 Chinolinové alkaloidy

Jde o alkaloidy odvozené od kyseliny anthranilové (Obr. 8), která je jedním z produktů katabolismu aminokyseliny tryptofanu. Celá řada alkaloidů, která ve své struktuře obsahuje chinolinové jádro (Obr. 8), byla identifikována v rostlinách celé čeledi Rutaceae.



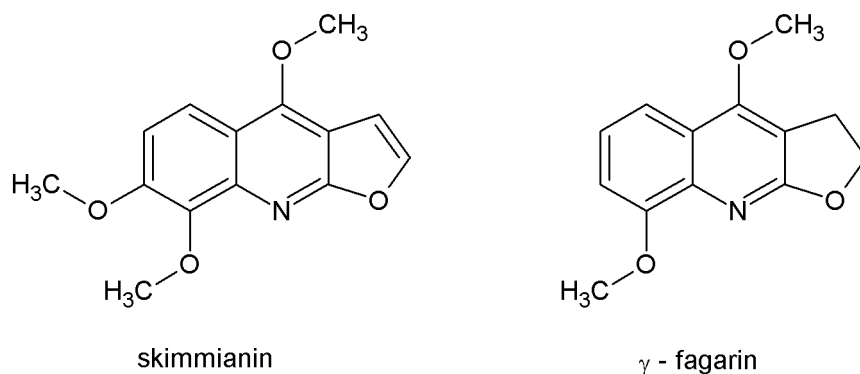
kyselina anthranilová



chinolin

Obr. 8: Základní struktury chinolinových alkaloidů

Mezi tyto látky patří i furanochinolinové alkaloidy, které mají ve své struktuře obsažen furanový cyklus. V *Z. nitidum* byly detekovány dvě takové sloučeniny, skimmianin⁶³ a γ -fagarin⁶⁴ (Obr. 9), které vykazují cytotoxické účinky na nádorové buňky¹⁰.



Obr. 9: Struktury chinolinových alkaloidů

3.4.4 Další látky izolované ze *Zanthoxylum nitidum*

V *Zanthoxylum nitidum* lze identifikovat celou řadu dalších sloučenin kromě alkaloidů. Jsou to například lignany. Látky, v jejichž struktuře lze nalézt fenylypropanový skelet, mají estrogenový efekt a řadí se tak mezi fytoestrogeny, sloučeniny rostlinného původu, které působí podobně jako ženské pohlavní hormony. V *Z. nitidum* byly izolovány tyto čtyři lignany : sesamin⁶³, episesamin⁶⁵, piperitol-3,3-dimethylallyl ether⁶⁶ a savinin⁶⁶. Mimo zmíněné estrogenní vlastnosti mohou lignany působit protinádorově, antivirově nebo mít bakteriostatický efekt⁶⁷.

Z kůry byly také extrahovány dva steroidy, β -sitosterol⁶⁴ a β -sitostenon⁶⁸, dále terpenoidy kadinol⁶⁹, antikopalol⁷⁰ a spathulenol⁷¹.

3.4.5 Metody extrakce a izolace benzo[c]fenantridinových alkaloidů ze *Zanthoxylum nitidum*

Alkaloidy obsažené v *Z. nitidum* se obecně extrahují ze sušené drogy, kterou mohou být rozdrcené kořeny, kůra z nadzemních částí rostliny i listy a větvičky. Extrakce probíhá často v Soxhletově extraktoru nebo v případě potřeby většího množství v perkolátoru. Jako extrakční činidla se používají nejčastěji methanol a ethanol⁷¹, ale také třeba 2% roztok kyseliny sírové⁸. Po ukončení extrakce organickým rozpouštědlem je toto odpařeno a zahuštěný odparek, který obsahuje směs různých látek, je dále zpracováván pomocí filtrace, vytřepáváním, promýváním a může být upraveno pH^{8,72}. Vše probíhá tak, aby bylo možné izolaci získat čisté látky.

Izolace jednotlivých látek se dále uskutečňuje pomocí chromatografických metod (sloupcová chromatografie, preparativní TLC, HPLC). Nejvíce používanou separační metodou je sloupcová chromatografie (CC), kde stacionární fází tvoří silikagel nebo alluminát (Al_2O_3). Další metodou je preparativní tenkovrstvá chromatografie (TLC), kde jsou stacionární fází SiO_2 a Al_2O_3 . U obou způsobů oddělování látek se jako mobilní fáze používají směsi rozpouštědel.

Jednotlivé izolované struktury jsou identifikovány pomocí spektroskopických metod, jako je nukleární magnetická rezonance (NMR), infračervená (IR) a ultrafialová spektroskopie (UV). Významnou roli zastává i hmotnostní spektroskopie (MS)^{43,74,75}.

3.5 Biologická aktivita látek izolovaných ze *Zanthoxylum nitidum*

Zanthoxylum nitidum je rostlina často využívaná v lidové medicíně pro své široké spektrum účinků. Využívají se nadzemní části (plody, lisy, větvičky a kůra), stejně tak je používán i kořen rostliny. V tradičním léčení jí je přisuzována řada účinků, od odstranění bolesti zubů a bolesti v krku, přes léčbu revmatoidní artritidy a hadích uštknutí. Farmakologický výzkum *Z. nitidum* poukázal na protizánětlivé a analgetické účinky. V pozadí by nemělo zůstat ani působení proti houbovým a virovým onemocněním a hlavně cytotoxická aktivita některých izolovaných látek.

3.5.1 Analgetické a protizánětlivé účinky

V práci uveřejněné v roce 2006 byly alkaloidy získané z etanolového extraktu kořene a stonku *Z. nitidum* podrobeny testům, které se zaměřovaly na analgetickou a protizánětlivou účinnost. Jednalo se o těchto 7 látek: (*R*)-8-[(*R*)-1-hydroxyethyl]dihydrochelerythrin, 8-methoxynorchelerythrin, nitidin, dihydrochelerythrin, oxyavicin, 8-methoxychelerythrin a 8-hydroxydihydrochelerythrin⁹.

V případě analgetických zkoušek byla u myši vyvolána bolest pomocí kyseliny octové. Účinnost proti bolesti vykazaly kromě prvních dvou všechny látky a to v porovnání s kontrolní skupinou, ve které byl jako analgetikum použit 2 % roztok hydrokortisonu. U testů na protizánětlivé vlastnosti byl u myši vyvolán zánět ucha indukovaný xylenem. Pozorována byla účinnost extrahovaných látek a to v porovnání s 2 % roztokem hydrokortisonu podaném

v dávce 20 mg/kg. Dobře působily opět kromě prvních dvou všechny izolované sloučeniny. Nejsilnější efekt v tišení bolesti, tak i tlumení zánětů měl nitidin (Obr. 5). Při porovnání jeho struktury s ostatními zkoušenými sloučeninami se zdá, že za jeho výrazný efekt v obou testech je zodpovědná dvojná vazba mezi uhlíkem a dusíkem⁹.

3.5.2 Antivirové a antifungální účinky

U některých látek izolovaných ze *Z. nitidum* bylo testováno jejich působení proti virovým a houbovým onemocněním. O jak významnou účinnost jde, bylo zjišťováno v práci uveřejněné v roce 2008 a jednalo se o těchto pět extrakcí získaných alkaloidů, 5,6-dihydro-6-methoxynitidin, skimmianin, 5-methoxydictamin, dictamnine a γ -fagarin⁸.

Antivirové účinky byly prokázány u prvních tří jmenovaných látek. Zkoušky byly prováděny *in vitro* a testoval se vliv sloučenin na virus hepatitidy B (HBV). Výsledkem byla inhibice sekrece HBsAg, který je povrchovým antigenem tvořeným bílkovinou vnějšího obalu viru. Jeho hladina se, po podání jednotlivých alkaloidů v koncentraci 0,2 $\mu\text{mol/ml}$, snížila o 43,3 až 49,3 % v porovnání s lamivudinem v dávce 1,0 $\mu\text{mol/ml}$, který brzdil sekreci antigenu o 29,6 %. Obdobný inhibiční efekt lze pozorovat také u antigenu HBeAg, který svědčí o aktivní replikaci viru⁸.

Antifungální působení bylo testováno na houbě *Paricularia oryzae*, která byla právě pro tyto účely vyvinuta. Pozorován byl vliv látek na růst hyf a také deformace konidií. Kontrolní látkou byl rhizoxin, jehož minimální inhibiční koncentrace (MIC) měla hodnotu 1,56 $\mu\text{g/ml}$. U dictamninu, γ -fagarinu a 5-methoxydictamninu byla hodnota MIC 6,25 $\mu\text{g/ml}$, u dvou zbylých alkaloidů byla účinnost zanedbatelná. Bylo to poprvé, co byly takovéto účinky u chinolinových alkaloidů popsány⁸.

3.5.3 Cytotoxická aktivita

Cytotoxická aktiva byla sledována v práci, která vyšla v roce 2009. Šlo o široké spektrum látek získaných z metanolového extraktu z kůry *Z. nitidum* a testování jejich působení na nádorové buňky. Testovány byly toxické účinky na buňky linie MCF-7, které způsobují karcinom prsu, dále na buněčnou řadu NCI-H460, která stojí za vznikem nádorového onemocnění plic, a nádorové buňky řady SF-268, které jsou indikátorem glioblastomu, jednoho z nádorových onemocnění centrální nervové soustavy¹⁰.

Účinnost jednotlivých látek byla porovnávána podle jejich inhibiční koncentrace, IC_{50} . To je koncentrace látky, při které dochází k 50 % úhynu nebo poklesu růstu buněk. Nejlepší efekt na testované nádorové buňky měl aporfinový alkaloid liriodenin. Jeho IC_{50} na buněčnou řadu MCF-7 byla $IC_{50} = 3,18 \pm 0,29 \mu\text{g/ml}$, vůči NCI-H460 byla $IC_{50} = 2,38 \pm 0,35 \mu\text{g/ml}$ a pro buňky SF-268 byla naměřena $IC_{50} = 2,19 \pm 0,11 \mu\text{g/ml}$. Kromě liriodeninu byly cytotoxické účinky popsány také u chinolinového alkaloidu skimmianinu a liganu xanthoxy-3,3-dimethylallyl etheru. U benzo[c]fenantridinových alkaloidů byla již dříve zaznamenána inhibice růstu Ehrlichova ascitického tumoru⁷⁶ a blokace aktivity DNA topoizomerázy I⁷⁷. Ale právě tato práce z roku 2009 poukazuje na to, že i další typy sloučenin získané z rostliny *Zanthoxylum nitidum*, mimo benzo[c]fenanthridinové alkaloidy, mohou mít toxický vliv na nádorové buňky¹⁰.

3.6 Další významné druhy rodu *Zanthoxylum* a jejich obsahové látky

Nejen druh *Zanthoxylum nitidum*, ale i další druhy rodu *Zanthoxylum* jsou zkoumány z hlediska jejich obsahových látek, které by se v budoucnu mohly uplatnit jako součást nově vyvíjených léčiv. Důvodem zájmu o tento rod je jeho široké využití v tradiční medicíně, které má hlavně v oblastech jihovýchodní Asie a Jižní Ameriky dlouhou historii. Údaje o některých zajímavých druzích rodu *Zanthoxylum* jsou shrnuty v následující tabulce (Tabulka I). Uvedeno je místo jejich výskytu, oblast použití v lidové medicíně a přehled sloučenin, které byly u daného druhu doposud izolovány.

Tabulka I Vybrané druhy rodu *Zanthoxylum*, jejich místa výskytu, uplatnění v tradiční medicíně a látky, které byly z jednotlivých druhů izolovány.

Název (místo výskytu)	Používaná část rostliny	Oblasti léčby v tradiční medicíně	Izolované obsahové látky
<i>Zanthoxylum ailanthoides</i> (Čína, Japonsko, Taiwan, Korea a Filipíny)	Listy kůra	nachlazení, příprava tradičního pokrmu na Taiwanu ^{52,78} revmatismus, bolesti kloubů, pohmožděnin, hadí kousnutí a povzbuzení krevního oběhu ^{78, 79}	5,7,8-trimethoxykumarin, <i>O</i> -methylcedrelapsin, isopimpinellin, decarin, γ -fagarin, haplopin, 4-methoxy-1-methyl-2-chinolon, β -sitosteryl glukosid, (+)-tetrahydroberberine ⁷⁸
<i>Zanthoxylum americanum</i> (Severní Amerika)	kořen, kůra, dřevo a plod	revmatická onemocnění, toniku, bolest zubů a bolest v krku, popáleniny ^{79, 80}	Dipetalin, alloxanthoxyletin, xanthoxyletin, xynthyletin, seasmin, asarinin ^{79, 80}
<i>Zanthoxylum budrunga</i> (jih Asie, Indie, Malajsie, Bangladéš)	listy kůra	nevolnost, průjmová onemocnění ⁸¹ kašel, bolest hlavy, zvracení, úplavice ⁸¹	lupeol, lupenon, (-)-sesamin, <i>N</i> -methylflindersin, zanthobungeanin, dictamin, rutaecarpin, γ -fagarin, evodiamin, skimmianin, canthin-6-on, syringaresinol ^{81, 82}
<i>Zanthoxylum caudatum</i> (Srí Lanka)	kůra nadzemních částí rostliny	vzhledem ke vzácnému výskytu rostliny není známo její použití v lidovém léčitelství ⁶⁶	Sesamin, savinin, liriodenin, 8- <i>O</i> -desmethyl- <i>N</i> -nornititidin, decarin ⁶⁶

Tabulka I Pokračování

<i>Zanthoxylum davyi</i> (Afrika)	trny	infikované rány	chelerythrin, dihydrochelerythrin, bocconolin, 6-hydroxydihydrochelerythrin,
	listy	bolesti na hrudi	6-methoxy-7-demethyldihydrochelerythrin, <i>meso</i> -sesamin,
	kůra nadzemních částí	opařeniny, zánět pohrudnice, bolest zubů	4-methoxy-1-methyl-2(1 <i>H</i>)-chinolin, sinapaldehyd, lupeol ⁸³
	kořen	afrodisiakum, bolest v krku, vředy v ústech	
<i>Zanthoxylum quinduense</i> (Venezuela, Kolumbie, Peru a Ekvádor)	kůra	není známo	(-)-6-carboxymethyldihydro-chelerythrin, chelerythrin, berberin, <i>N</i> -methyltetrahydrocolumbamin, <i>N</i> -methyltetrahydropalmatin, (-)-xylopinidin, (-)-isotembetarin, lupeol, nornitidin, norchelerythrin, decarin, (-)-6-acetonyldihydro-chelerythrin ⁸⁴
<i>Zanthoxylum piperitum</i> (Japonsko, Čína, Korejský poloostrov)	plod a oplodí	koření	magnoflorin, arbutin, hyperosid, afzelin, kvercitrin, kvercetin, myrcen, limonen, linalool, citronelal, geranio ^{85, 86, 87}
	celá rostlina	bolesti břicha, zvracení, nevolnost, průjem, vředové choroby kůže ^{85,86}	
<i>Zanthoxylum rhoifolium</i> (Peru, Bolívie, Brazílie, Francouzská Guyana)	kořen a kůra	tonikum, antimalarikum, antipyretikum, protizánětlivé a antimikrobiální působení	zanthoxylin, dihydronitidin, skimmianin, 6-oxynitidin, dihydroavicin, oxyavicin, fagaridin, avicin ^{88, 89}

Tabulka I Pokračování

<i>Zanthoxylum simulans</i> (Taiwan, Čína)	kůra a dřevo z kořene, kůra nadzemních částí rostliny	hadí kousnutí a gastrointestinální obtíže ⁹⁰	simulenolin, peroxysimulenolin, simulansin, <i>N</i> -acetyldihydroanain, zanthosimulin, huajiaosimulin, norchelerythrin, bocconolin, decarin, oxychelerythrin, chelerythrin, γ -fagarin, zanthobischinolon, simulanochinolin, elutine, skimmianin, dictamnine, (-)- <i>N</i> -acetylanonain, aesculetin dimethyl eter, β -amyryn, β -sitosterol a β -sitostenon ^{90, 91}
---	---	---	--

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Všeobecné postupy

4.1.1 Destilace a odpařování

Před použitím byla rozpouštědla destilována. Nejprve byl zachycen předek (asi 5 %, většinou s vodným azeotropem), pak bylo destilováno zbylých přibližně 90% rozpouštědla. Rozpouštědla byla uchovávána ve hnědých nádobách.

Odpařování chromatografických frakcí bylo provedeno na vakuové odparce Büchi Rotavapor R 114 vybavené vodní lázní Büchi Waterpath B-480 při 40 °C za sníženého tlaku.

4.1.2 Tenkovrstvá chromatografie

Chromatografie na tenké vrstvě byla provedena v systému normálních komor. Ty byly nasyceny mobilní fází. Sycení komor trvalo 30 minut. V případě komor pro preparativní tenkovrstvou chromatografii 60 minut. Chromatografie byla prováděna vzestupně.

4.2 Materiál a vybavení

Rozpouštědla

Diethylamin, p.a., LACHNER

Diethylether, p.a., PENTA

Ethanol 95%, denaturovaný methanolem, p.a., PENTA

Ethylacetát, p.a., PENTA

Chloroform, p.a., PENTA

Toluen, p.a., PENTA

Chemikálie

Hydroxid sodný, p.a., PENTA

Jodid draselný, p.a., PENTA

Kyselina chlorovodíková 35%, p.a., LACHEMA

Uhlíčan sodný 10%, p.a., PENTA

4.3 Extrakce alkaloidů ze sušené drogy *Zanthoxylum nitidum* a zpracování výtřepku B

4.3.1 Biologický materiál

Sušená droga *Zanthoxylum nitidum* byla získána od komerčního prodejce Pragon s.r.o. (Praha, Česká Republika). Verifikaci vzorku provedl doc. RNDr. Lubomír Opletal CSc. Dokladné vzorky jsou uloženy v herbáři na Katedře farmaceutické botaniky a ekologie Farmaceutické fakulty v Hradci Králové.

4.3.2 Příprava sumárního extraktu

Sušené a rozdrcené dřevnaté části rostliny (9,6 kg) byly extrahovány ethanolem (140 l) pod zpětným chladičem. Poté bylo rozpouštědlo odpařeno. Do odparky bylo přidáno 5l vody a byl odpařen zbytek rozpouštědla. Následně byl vpraven 2% roztok kyseliny chlorovodíkové (1,2 l). Vodný extrakt byl zfiltrován přes plachetku a poté přes křemelinu pomocí vývěvy.

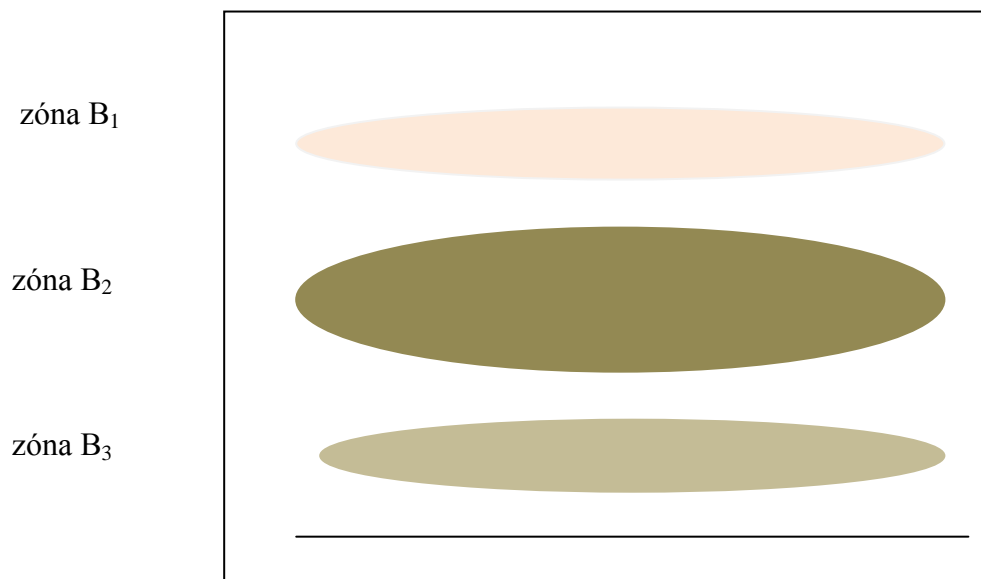
4.3.3 Příprava a získání výtřepku A ze sumárního extraktu

Sumární extrakt (6 l) byl nejdříve upraven na pH 9/10 pomocí uhličitanu sodného a vytřepán (á 1000 ml, čtyřikrát se 350 ml etheru, pro odstranění nepolárních částic, a poté 3x s 250 ml chloroformu). Chloroformové frakce byly spojeny a po odpaření bylo získáno 8,6 g výtřepku A, ten nadále nebyl součástí této práce.

4.3.4 Příprava a zpracování výtřepku B ze sumárního extraktu

Sumární extrakt o pH 9/10 byl dále upraven pomocí hydroxidu sodného 50% na pH 12/13. Takto upravený extrakt (celkem 6 l) byl vytřepán (á 1000 ml) nejdříve etherem (4x á 350ml) a poté chloroformem (3x á 350 ml). Chloroformové frakce byly spojeny a po odpaření bylo získáno 1,59 g výtřepku B. Vzhledem k malému množství frakce byla jako další izolační metoda zvolena preparační TLC. Frakce B byla nanášena na nalité vrstvy silikagelu 15x15cm

(Silikagel 60, Merck). Desky byly dvakrát vyvíjeny v soustavě mobilní fáze toluen: ethanol: diethylamin (85: 15: 4, dvakrát)



Obr. 10: Chromatogram podfrakce B zobrazující zóny B₁, B₂ a B₃

Po vyškrábání byly získány 3 podfrakce B₁ (0,021g)

B₂ (0,100g)

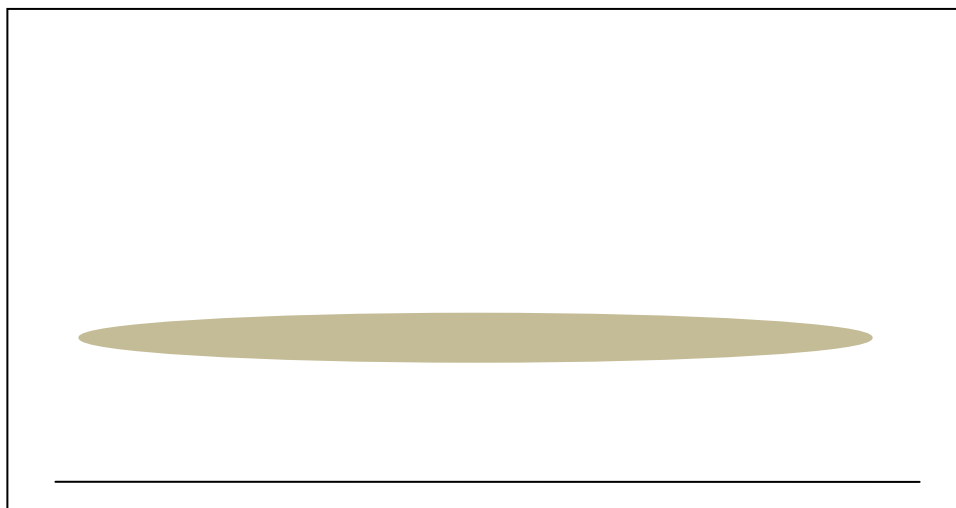
B₃ (0,017g)

Pro izolaci čistých látek byla dále použita pouze podfrakce B₂.

4.3.5 Zpracování podfrakce B₂

Podfrakce B₂ byla přečištěna pomocí TLC v soustavě obsahující pouze chloroform na deskách 20x10 cm (Silikagel 60, F₂₅₄, Merck). Z desek byla získána zóna LM₁.

zóna LM₁



Obr. 11: Chromatogram zóny LM₁

Odparek frakce LM₁ byl rozpuštěn v CHCl₃ a podrobený krystalizaci přidáním etanolu. Vzniklé krystalky byli několikrát promyté etanolem a opětovně rozpuštěné v CHCl₃ a přefiltrované přes tenkou vrstvu Al₂O₃ pro odstranění nečistot.

Získané krystaly byly oddekantované, vysušené v exsikátoru a látka byla odeslána na strukturní analýzu.

4.4 Stanovení inhibiční aktivity alkaloidních extraktů a čistých alkaloidů vůči erythrocytární AChE a sérové BuChE

4.4.1 Chemikálie a materiál použité pro stanovení cholinesterázové inhibiční aktivity

Chemikálie:

10mM acetylthiocholin jodid, (Sigma-Aldrich)

10mM butyrylthiocholin jodid, (Sigma-Aldrich)

0,1 M fosfátový pufr, pH 7,4 (chemikálie pro přípravu pufru: dihydrát dihydrogenfosforečnanu sodného, p.a. (Lachema); dodekahydrát hydrogenfosforečnanu disodného, p.a. (Lachema)

Dimethylsulfoxid, (Sigma-Aldrich)

5 mM 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina, ≥ 98% (Sigma-Aldrich)

Huperzin A, (TAZHONGHUI – Tai'an zhonghui Plant Biochemical Co., Ltd., China)

Galanthamin hydrobromid, (Changsha Organic Haerb Inc., China)

Materiál:

Jako zdroj acetylcholinesterázy byla použita pouzdra lidských erytrocytů. Zdrojem butyrylcholinesterázy byla lidská plazma.

Měření bylo prováděno v mikrotitračních destičkách.

4.4.2 Přístroj použitý pro stanovení cholinesterázové inhibiční aktivity

Reader SynergyTM HT Multi-Detection Microplate Reader (BioTek, USA)

4.4.3 Podmínky měření

Experimenty byly prováděny za těchto podmínek:

- při teplotě 37 °C
- v prostředí fosfátového pufru (pH 7,4)
- při vlnové délce spektrofotometru 436 nm
- v mikrotitračních destičkách

4.4.4 Příprava erytrocytárních pouzder

Erytrocytární pouzdra byla připravena z čerstvě odebrané krve, ke které byl přidán 1 ml citrátu sodného na 10 ml krve podle lehce upravené metody Stecka a Kanta⁹². Plazma (HuBuChE) byla odstraněna z plné krve centrifugací při rychlosti 4000 ot/min za použití centrifugy Boeco U-32R s rotorem Hettich 1611. Erytrocyty byly přemístěny do 50ml zkumavek a třikrát promyté 5mM fosfátovým pufrem (pH 7,4) obsahujícím 150 mM chloridu sodného (12 000 ot/min, Avanti J-301, rotor JA-30.50). Promyté erytrocyty byly míchány s 5mM fosfátovým pufrem (pH 7,4) po dobu 10 minut, čímž došlo k jejich lýze. Následně byly centrifugovány rychlostí 20 000 ot/min a vzniklá pouzdra (HuAChE) byla třikrát promyta fosfátovým pufrem.

4.4.5 Stanovení cholinesterázové inhibiční aktivity (hodnoty IC₅₀)

Pro stanovení hodnoty IC₅₀ byla použita Ellmanova spektrofotometrická metoda s použitím 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoové kyseliny (DTNB)⁹³. Jako substráty se používají

estery thiocholinu, které jsou cholinesterázami štěpeny na thiocholin a příslušnou kyselinu. Stanovuje se SH- skupina thiocholinu, která se naváže na DTNB za vzniku žlutě zbarveného produktu, který se stanovuje spektrofotometricky při vlnové délce 436 nm. Sleduje se nárůst absorbance za 1 minutu. Hodnoty IC_{50} byly vypočítány z naměřených hodnot poklesu aktivity acetylcholinesterázy nebo butyrylcholinesterázy nelineární regresí v programu GraphPad Prism (verze 3.02 pro Windows; výrobce Graph Pad Software, San Diego, CA, USA). Výsledky byly porovnány s hodnotami IC_{50} známých inhibitorů cholinesteráz: galataminem ($IC_{50 \text{ HuAChE}} = 1,710 \pm 0,065 \mu\text{M}$, $IC_{50 \text{ HuBuChE}} = 42,30 \pm 1,30 \mu\text{M}$), huperzinem A ($IC_{50 \text{ HuAChE}} = 0,033 \pm 0,001 \mu\text{M}$, $IC_{50 \text{ HuBuChE}} = >1000 \mu\text{M}$). % I (inhibice) byla počítána dle vzorce $\%I = 100 - (\Delta A_{BL} / \Delta A_{SA}) * 100$, kde ΔA_{BL} je nárůst absorbance slepého vzorku za 1 minutu a ΔA_{SA} je nárůst absorbance měřeného vzorku.

4.5 Stanovení antioxidační aktivity alkaloidních extraktů a čistých alkaloidů

4.5.1 Chemikálie a materiál použité pro stanovení antioxidační aktivity

2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl radikál, (Sigma-Aldrich)

Kvercetin, (Sigma-Aldrich)

Kyselina askorbová, (Sigma-Aldrich)

Trolox, (Sigma-Aldrich)

4.5.2 Přístroje použité pro stanovení antioxidační aktivity

Reader SynergyTM HT Multi-Detection Microplate Reader (BioTek, USA)

4.5.3 Stanovení antioxidační aktivity (EC_{50})

Antioxidační aktivita byla testována *in vitro* DPPH testem. Metoda je založena na reakci stabilního 2,2'-difenyl-1-pikrylhydrazylu (DPPH) se vzorkem. Snížení absorbance DPPH měřené při 525 nm je závislé na koncentraci antioxidantu ve sledovaném vzorku. Antiradikálová aktivita vzorků byla vyjádřena jako 50% účinná koncentrace (EC_{50}), která byla vypočítána pomocí programu GraphPad Prism 3.02, a byla porovnána se známými

antioxidanty: kvercetinem $EC_{50 \text{ DPPH}} = 11,11 \pm 0,25$, troloxem $EC_{50 \text{ DPPH}} = 20,45 \pm 1,31 \mu\text{M}$
a kyselinou askorbovou $EC_{50 \text{ DPPH}} = 51,61 \pm 3,21 \mu\text{M}$.

5. VÝSLEDKY

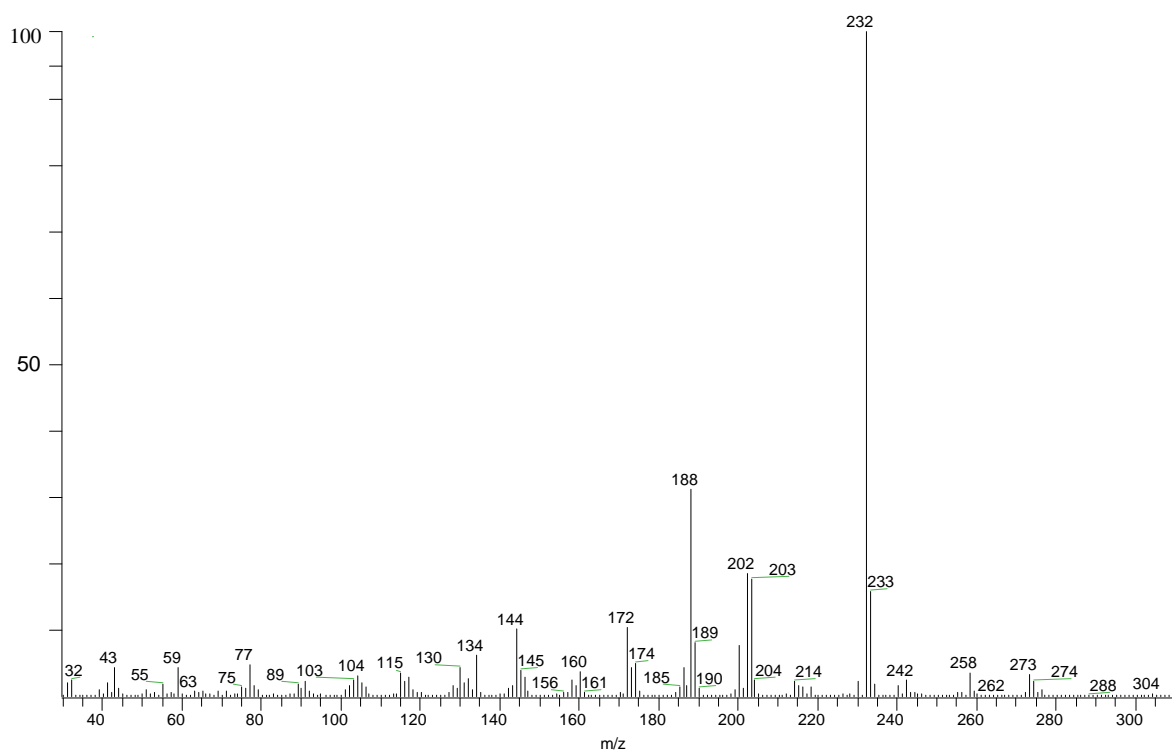
5.1 Strukturní analýza edulininu

Na základě MS a NMR studií a porovnání dat s literaturou byla izolovaná látka identifikována jako (-)-edulinin.

5.1.1 MS studie (-)-edulininu

EI-MS, 70 eV, m/z (rel. int) 291 (0.03); 274 (2); 273 (3); 258 (3); 242 (2); 232 (100); 203 (18); 202 (18); 200 (7); 188 (31); 172 (10); 144 (10).

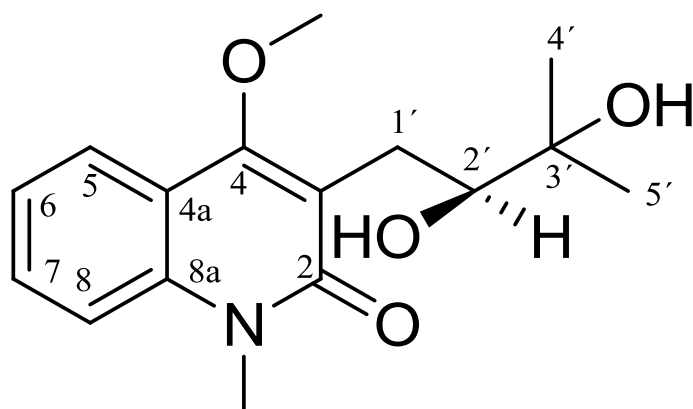
—



Obr. 12: EI-MS spektrum edulininu

5.1.2 NMR studie (-)-edulininu

Struktura izolované látky byla určena na základě interpretace ^1H - a ^{13}C -NMR spekter a jejich porovnání s daty v literatuře.



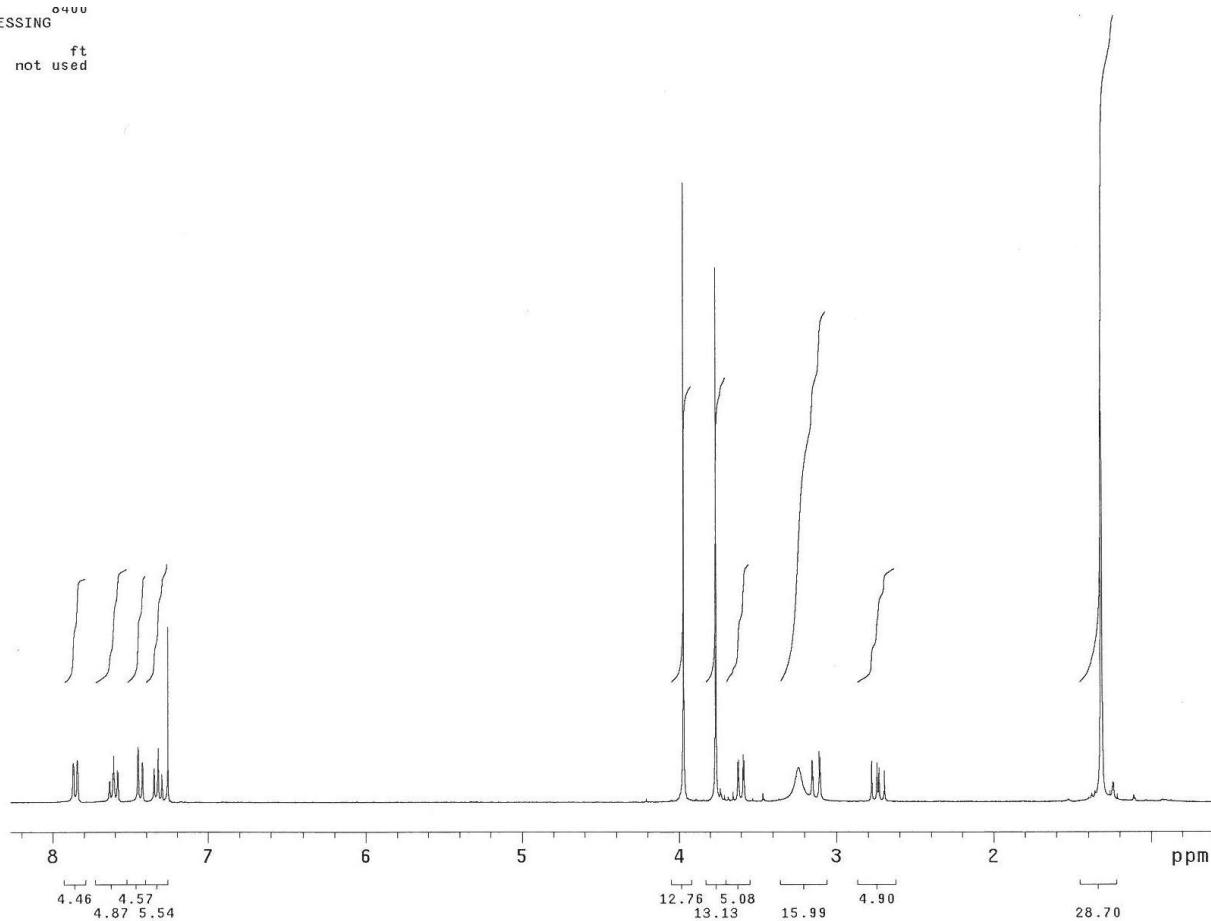
Obr. 13: Struktura (-)-edulininu

5.1.2.1 ^1H -NMR spektrum (-)-edulininu

^1H NMR (499.9 MHz; δ , CDCl_3 , 25°C):

1.31(s, 3H, H-5'); 1.32, (s, 3H, H-4'); 2.74 (dd, 1H, $J=13.7$ Hz; $J=10.2$ Hz, H-1a'); 3.13 (dd, 1H, $J=13.7$ Hz; $J=1.9$ Hz, H-1b'); 3.24 (bs, 2H, OH); 3.60 (1H, dd, $J=10.2$ Hz; $J=1.9$ Hz, H-2'); 3.76 (s, 3H, N- CH_3); 3.97 (s, 3H, OCH_3); 7.29-7.36 (m, 1H, H-6); 7.44 (d, 1H, $J=8.2$ Hz, H-8); 7.57-7.65 (m, 1H, H-7); 7.86 (dd, 1H, $J=8.2$, $J=1.4$ Hz)

PROCESSING 0400
file
not used
ft
3

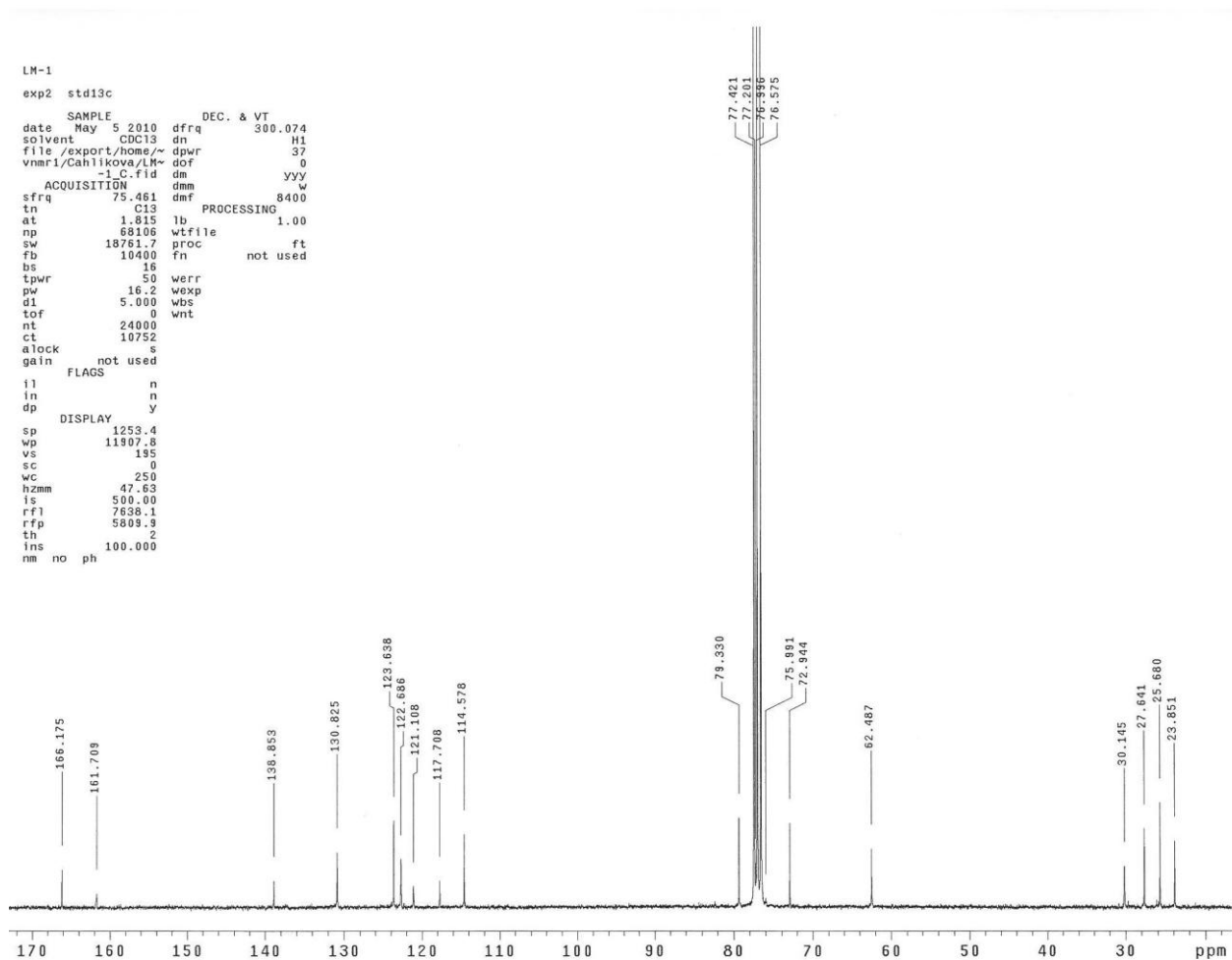


Obr. 14: ¹H-NMR spektrum (-)-edulininu

5.1.2.2 ¹³C-NMR spektrum (-)-edulininu

¹³C NMR (125.7 MHz, δ , CDCl₃, 25°C):

23.9 C-5'; 25.7 C-4'; 27.6 C-1'; 30.1 N-CH₃; 62.5 OCH₃; 72.9 C-3', 79.3 C-2', 114.6 C-8, 117.7 C-3; 121.1 C-4a, 122.7 C-5, 123.6 C-130.7, 130.8 C-6, 138.9 C-8a, 161.7 C-4, 166.2 C-2.



Obr. 15: ^{13}C -NMR spektrum (-)-edulininu

5.2 Optická aktivita (-)-edulininu

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -40,3$ ($c = 0,0124$; EtOH)

5.3 Výsledky testu vlivu látky na aktivitu AChE a BuChE

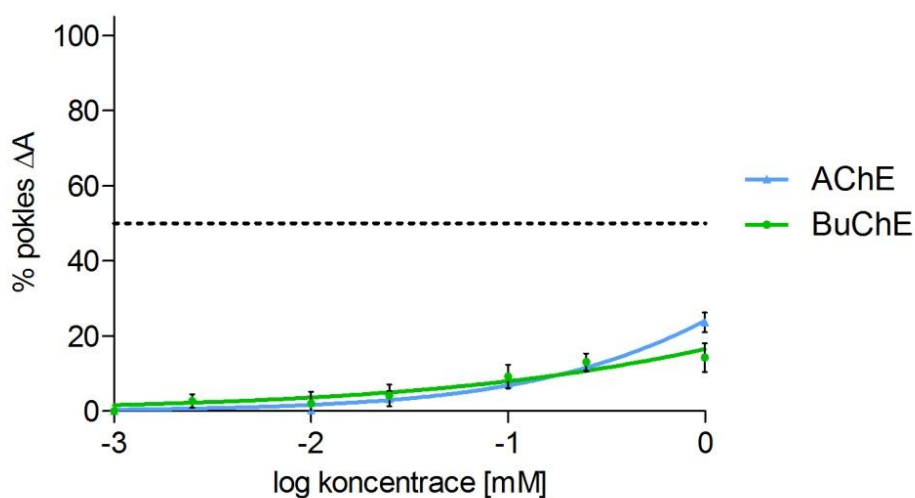
Získaný alkaloid byl testován na svou inhibiční aktivitu vůči erytrocytární acetylcholinesteráze (HuAChE) a sérové butyrylcholinesteráze (HuBuChE). Výsledky jsou uvedeny v následující tabulce (Tabulka II)

Tabulka II *In vitro* inhibiční aktivita izolovaných alkaloidů vůči HuAChE a HuBuChE

Látky	IC ₅₀ , (μM) ^a HuAChE	IC ₅₀ , (μM) ^a HuBuChE
(-)-Edulinin	>1000	>1000
Galanthamine^b	1.71	42.03
Huperzine A^b	0,033	>1000
Eserin^b	0,063	0,13

^aKaždé měření bylo opakováno třikrát, ^bReferenční látka

Inhibiční křivka edulininu



5.4 Antioxidační aktivita

Izolovaný alkaloid byl podroben testování své antioxidační aktivity. Výsledky této studie jsou uvedeny v následující tabulce (Tabulka III).

Tabulka III Antioxidační aktivita alkaloidů (DPPH test)

Látky	EC ₅₀ (μM)
(-)-Edulinin	> 1000
Kvercetrin^b	11,11
Trolox^b	20,45

^aKaždé měření bylo opakováno dvakrát, ^bReferenční látka

6. DISKUZE

V současné době patří mezi nejrozšířenější léčiva využívaná v terapii Alzheimerovy nemoci inhibitory acetylcholinesterázy. Vzhledem k tomu, že se v literatuře v poslední době objevují informace o nezanedbatelné roli BuChE v pokročilejších stádiích tohoto onemocnění, výzkum v oblasti hledání látek potencionálně využitelných v terapii Alzheimerovy choroby se soustřeďuje na sloučeniny s duální inhibiční aktivitou²⁷. Tedy na látky, které budou schopné inhibovat jak acetylcholinesterázu tak butyrylcholinesterázu.

Na základě tohoto faktu se pracovní skupina ADINACO na Katedře farmaceutické botaniky a ekologie soustřeďuje na izolaci takovýchto látek z přírodního materiálu. Velmi významná pozornost je věnována isochinolinovým alkaloidům, které se vyznačují širokou biologickou aktivitou a jsou zastoupeny v celé řadě rostlin čeledí Rutaceae, Ranunculaceae, Papaveraceae a Fumariceae⁶.

Na základě výsledků screeningu rostlin vhodných pro fytochemické práce byla vybrána rostlina *Zanthoxylum nitidum*. Sumární alkaloidní extrakty této rostliny vykazovaly zajímavou inhibiční aktivitu, jak vůči lidské acetylcholinesteráze (HuAChE) tak i sérové butyrylcholinesteráze (HuBuChE).

Cílem této práce bylo zpracování suché drogy *Zanthoxylum nitidum* a izolování alespoň jednoho alkaloidu v čisté formě. Pomocí sloupcové chromatografie a preparativní TLC se podařilo izolovat jeden alkaloid, který byl následně podroben strukturní analýze a testům biologické aktivity. Izolovaný alkaloid byl na základě NMR a MS dat a jejich porovnání s literárními údaji identifikován jako (-)-edulinin. Jedná se o chinolinový alkaloid, který již byl z této rostliny izolován⁹⁴. Tato sloučenina byla také izolována z dalších rostlin čeledi Rutaceae, např. *Casimiroa edulis*⁹⁵ a *Melicope semecarpifolia*⁹⁶. U tohoto alkaloidu bylo provedeno v minulosti několik studií týkající se různých biologických aktivit. V jedné z nich byla testována jeho cytotoxická aktivita vůči buněčným liniím P-388, A549 a HT-29 (edulinin: $ED_{50, P-388} = 27,1 \mu\text{g/mL}$, $ED_{50, A549} = 43,6 \mu\text{g/mL}$, $ED_{50, HT-29} = 25,5 \mu\text{g/mL}$), kde byl jako standard použit mitramycin⁹⁶.

V této práci byl (-)-edulinin podroben studii na inhibiční aktivitu vůči erytrocytární acetylcholinesteráze (HuAChE) a sérové butyrylcholinesteráze (HuBuChE) za použití Ellmanovy spektrofotometrické metody s použitím 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoové kyseliny⁹². Jako referenční látky byly použity galanthamin ($IC_{50, \text{HuAChE}} = 1,71 \mu\text{M}$, $IC_{50, \text{HuBuChE}} = 42,03 \mu\text{M}$), který již patří mezi běžná léčiva Alzheimerovy choroby, huperzin A ($IC_{50, \text{HuAChE}} = 0,033 \mu\text{M}$, $IC_{50, \text{HuBuChE}} > 1000 \mu\text{M}$), který je také významným inhibitorem acetylcholinesterázy, ale zatím je jeho použití v terapii ve fázi klinického testování, a dále eserin ($IC_{50, \text{HuAChE}} = 0,063 \mu\text{M}$, $IC_{50, \text{HuBuChE}} = 0,13 \mu\text{M}$).

Hodnota IC_{50} edulininu stanovená pro HuAChE byla vyšší než 1000 μM a pro HuBuChE byla také vyšší než 1000 μM , takže tento alkaloid byl v porovnání s referenčními látkami shledán jako neaktivní a není vhodný jako látka potenciálně využitelná v terapii Alzheimerovy nemoci.

Vzhledem ke skutečnosti, že v patogenezi Alzheimerovy nemoci hraje významnou roli i oxidativní stres, jsou všechny izolované látky testovány také na jejich antioxidační aktivitu za využití DPPH testu. Bohužel (-)-edulinin nevykázal žádnou antioxidační aktivitu ($EC_{50 \text{ DPPH}} > 1 \text{ mM}$).

Závěrem je možno říci, že (-)-edulinin nebyl zodpovědný za zajímavou inhibiční aktivitu sumárního extraktu a je potřeba izolovat a otestovat jeho další složky.

7. LITERATURA

1. Vokurka M., Hugo J. a kol.: *Velký lékařský slovník*. 5. aktualiz. vyd. Praha: Maxdorf 2005, 1001 s.
2. Jiráček R.: Diagnostika a terapie Alzheimerovy choroby. *Neurol. prax.* 2008, 4, 224-227
3. Proskurina N.F., Yakovleva H.P.: Alkaloids of *Galanthus woronowi*. II. Isolation of a new alkaloid. *Zhur. Obschchei. Khim.* 1952, 22, 1899-1902. Chem. Abstract: 1953:41318.
4. Červinka O., Dědek V., Ferles M.: *Organická chemie*. 1. vyd., VŠCHT v Praze, Praha/Bratislava 1969, 1070 s.
5. Cordell G.A., Quin-Beattie M.L., Farnsworth N.R.: The Potential of Alkaloids in Drug Discovery. *Phytother. res.* 2001, 15, 183-205.
6. Hammerová J., Uldrian S., Táborská E., Slaninová I.: Benzo[c]phenanthridin alkaloids exhibit strong anti-proliferative activity in malignant melanoma cells regardless of their p53 status. *J. Dermatol. Sci.* 2011, 62, 22-35.
7. Kong D.Y., Gray A. I., Hartley T. G., Waterman P. G.: Alkaloids from an Australian accession of *Zanthoxylum nitidum*. *Biochem. Syst. Ecol.* 1966, 24, 87-
8. Yang G., Chen D.: Alkaloids from the Roots of *Zanthoxylum nitidum* and Their Antiviral and Antifungal Effects. 2008, 5, 1718-1722.
9. Hu J., Zhang W.D., Liu R.H., Zhang Ch. et al.: Benzophenanthridine alkaloids from *Zanthoxylum nitidum* (R_{OXB}.) DC, and their analgesic and anti-inflammatory activities. 2006, 3, 990-995.
10. Yang Ch. H., Cheng M. J., Lee S. J., Yang Ch. W. et al.: Secondary metabolites and cytotoxic activities from the stem bark of *Zanthoxylum nitidum*. *Chem. Biodivers.* 2009, 6, 846-857.
11. Pidrman V.: *Demence*. 1. vyd. Praha: Grada. 2007, 183 s.
12. Nevšimalová S., Růžička E., Tichý J.: *Neurologie*. 1.vyd. Praha: Galén. 2002, 367 s
13. Redlich F.: Über miliare Sklerose der Hirnrinde bei senior Atrophie. *J. Psychiatr. Neurol.* 1898, 17, 208-216.
14. Koukolík F., Jiráček R.: *Alzheimerova nemoc a další demence: neurobiologie, klinický obraz, terapie*. 1. vyd. Praha: Grada. 1998, 229 s.
15. Jiráček R., Koukolík F.: *Demence: neurobiologie, klinický obraz, terapie*. 1. vyd. Praha: Galén. 2004, 335 s.
16. Dementia in later life: research and action. Report of a WHO scientific group. *Technical report series*. 730. WHO, Geneva 1986.

17. Coleman P. D., Flood D. G.: Neuron numbers and dendritic extent in normal aging and Alzheimer's disease. A review. *Neurobiol. Aging*. 1978, 8, 521-545.
18. Hall T. C., Miller K. H., Corsellis J. A. N.: Variations in the human Purkinje cell population according to age and sex. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 1975, 1, 267-292.
19. Geula C., Mesulam M. M.: Systematic regional variations in the loss of cortical cholinergic fibers in Alzheimer's disease. *Cereb. Cortex*. 1996, 6, 165-177.
20. Su J. H., Deng G., Cotman C. W.: Bax protein expression is increased in Alzheimer's brain: Correlation with DNA damage, Bcl-2 expression, and brain pathology. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 1997, 56, 86-93.
21. Clinton J., Blackman S. E., Royston M. C., Roberts G. W.: Differential synaptic loss in the cortex in Alzheimer's disease: a study using archival material. *Neuroreport*. 1994, 5, 497-500.
22. Dickson D. W.: The pathogenesis of senile plaques. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 1997, 56, 321-339.
23. Schmidt M. L., Lee V. M. Y., Forman M., Chiu T. S. et al.: Monoclonal antibodies to 100-kd protein reveal abundant A β -negative plaques throughout gray matter of Alzheimer's disease brains. *Am. J. Pathol.* 1997, 151, 69-80.
24. Valeo T.: *Nové poznatky směřování ve výzkumu Alzheimerovy nemoci*. Zpráva o pokrocích ve výzkumu mozku za rok 2009. The European Dana Alliance for the Brain (EDAB), Dana Press, New York, 2009, 104 s. Dostupné na: http://www.dana.org/uploadedFiles/The_Dana_Alliances/European_Dana_Alliance_for_the_Brain/progress-report-2009_en.pdf. Staženo 11. 4. 2012.
25. Fišar Z.: *Vybrané kapitoly z biologické psychiatrie: neurobiologie, klinický obraz, terapie*. 2. přeprac. a dopl. vyd. Praha: Grada. 2009, 383 s.
26. Cibičková L., Palička V.: Alzheimerova choroba, cholesterol a apolipoprotein E – nové souvislosti. *Klin. Biochem. Metab.* 2005, 3, 127-130.
27. Kuhl D. E., Koeppe R. A., Snyder S. E., Minoshima S. et al.: In vivo butyrylcholinesterase activity is not increased in Alzheimer's disease synapses. *Ann. Neurol.* 2006, 59, 13-20.
28. Darvesh S., Cash M. K., Reid G. A., Martin E. et al.: Butyrylcholinesterase is associated with β -amyloid plaques in the transgenic APP_{SWE}/PSEN1^{dE9} mouse model of Alzheimer's disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 2012, 71, 2-14
29. Schellenberg G. D., Bird T. D., Wijsman E. M. et al.: Genetic linkage evidence for a familial Alzheimer's disease locus on chromosome 14. *Science*. 1992, 258, 668-671.

30. Selkoe D. J.: Alzheimer's disease: Genotype, phenotype and treatments. *Science*. 1997, 275, 630-631.
31. Cacabelos R.: Diagnosis of Alzheimer's disease: definic genetic profiles (genotype vs phenotype). *Acta Neurol. Scand.* 1996, 165, 72-84.
32. Folstein M. F., Folstein S. E., McHugh P. R.: Mini-Mental State: A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J. Psychiatr. Res.* 1975, 12, 189-198.
33. American Psychiatric Associations. *Diagnostic an statistical manual of mental disorders, Fourth Edition (DSM-IV)*. Washington: American Psychiatric Associations. 1994, 143 -147.
34. Koudelková M.: Diagnostika Alzheimerovy demence prostřednictvím proteinů tau, fosfo-tau a β -amyloidu mozkomíšním moku. *Labor Aktuell*. 2010, 2, 8-11.
35. Jiráček R.: Terapie Alzheimerovy choroby a příbuzných neurodegenerativních demencí. *Neurol. prax* 2009, 10 (6), 367-372.
36. Rössner P.: Alzheimerova choroba – diagnostika a léčba. *Neurol. prax* 2004, 1, 11-16.
37. Jiráček R.: Současné trendy v biologické terapii Alzheimerovy choroby. *Psychiat. prax*. 2006, 1, 8-11.
38. Liu J. S., Zhu Y. L., Yu C. M., Han Y. Y. et al.: Study on the chemistry of huperzine A and huperzine B. *Acta Chim. Sinica*. 1986, 44, 1035-1040.
39. Martin J., Kršková Z., Dušek J.: Huperzin A a jiné přírodní látky v léčbě Alzheimerovy choroby. *Prakt. lékáren*. 2011, 7(1), 39-41.
40. Wang R., Yan H., Tang X. C.: Progress in studies of huperzine A, a natural cholinesterase inhibitor from Chinese herbal medicine. *Acta Pharmacol. Sin.* 2006, 27, 1-6.
41. Chaaib K. F.: Investigation Phytochimique d'une Brosse à Dents Africaine *Zanthoxylum zanthoxyloides* (Lam.) Zepernick et Timler (syn. *Fagara zanthoxyloides* L.)(Rutaceae). Thèse de doctorat. Faculté des Sciences de l'Université de Lausanne, 11-44.
42. Patiño L. O. J., Prieto R. J. A., Cuca S. L. E.: *Zanthoxylum Genus as Potential Source of Bioactive Compounds*. Bioactive Compounds in Biomedicine, InTech 2012, 218 s. Dostupné na: <http://www.intechopen.com/books/bioactive-compounds-in-phytomedicine>. Staženo 11. 4. 2012.
43. Hu J., Zhang W.D., Shen Y.H., Zhang C., Xu L. et al.: Alkaloids from *Zanthoxylum nitidum* (Roxb.) DC. *Biochem. Syst. Ecol.* 2007, 35, 114-117.

44. <http://taibif.org.tw/flower/detail.php?sc=Zanthoxylum+nitidum>
45. Zhonghua Bencao: *Editorial Committee of the Zhonghua Bencao*. Shanghai Science and Technology Press, Shanghai, China, 1996, 4, 1058-1062.
46. Kanjilal U. N.: *The Flora of Assam*. Vol. I (Part I), New Delhi, Omsons Publications, 1997.
47. Dewick P. M.: *Medicinal Natural Products: a biosynthetic approach*. 2nd ed. New York, NY, USA: Wiley, 2002, 507 s.
48. Roberts M. F., Wink M.: *Alkaloids: Biochemistry, Ecology, and Medicinal Applications*. Plenum Press, New York and London, 1998, 438 s.
49. Dostál J., Slavík J.: Studies in natural products chemistry, *Elsiever Scinece B. V.* 2002, 155-184.
50. Dostál J., Slavík J.: Novější poznatky o sanguinarinu a příbuzných alkaloidch. *Chem. Listy* 2000, 94, 15-20.
51. Del Poeta M., Chen S. F., Von Hoff D., Dykstra C. C. et al.: Antimicrobial agents. *Chemother.* 1999, 43, 5026.
52. Fang S. D., Wang L. K., Hecht S. M., Sidney M.: Inhibitors of DNA topoisomerase I isolated from the roots of *Zanthoxylum nitidum*. *J. Org. Chem.* 1993, 58, 5025-5027.
53. Wang D., Liu Z., Gui M., Liu S.: Structural elucidation and identification of alkaloids coptidis by electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* 2004, 39, 1356-1365.
54. Colombo M. L., Bugatti C., Mossa A., Pescalli N.: Cytotoxicity evaluation of natural coptisine and synthesis of coptisine from berberine. *Il Farmaco* 2001, 56, 403-409.
55. Ro J. S., Lee S. S., Lee K. S., Lee M. K.: Inhibition of type A monoamine oxidase by coptisine in mouse brain. *Life Sci.* 2001, 70, 639-645.
56. Chen W. H., Qin Y., Cai Z., Chan C. L., Luo G. A. et al.: Spectrometric studies of cytotoxic protoberberine alkaloids binding to double-stranded DNA. *Bioorg. Med. Chem.* 2005, 13, 1859-1866.
57. Jeon Y. W., Jung J. W., Kang M., Chung I. K. et al.: NMR studies on antitumor drug candidates, berberine and berberrubine. *Bull. Korean Chem. Soc.* 2002, 23, 391-394.
58. *Farmakognózia: učebnica pre farmaceutické fakulty*. 2. oprav. vyd. Martin: Osveta, 1999, 422 s.
59. Wu Y. C., Lu S. T., Wu T. S., Lu K. H.: Kaufumine, a novel cytotoxic oxoporphine alkaloid from *Fissistigma glaucescens*. *Heterocycles*. 1987, 26, 9-12.

60. Woo S. H., Reynolds M. C., Sun N. J., Cassady J. M. et al.: Inhibition of Topoisomerase II by Liriodenine. *Biochem. Pharmacol.* 1997, *54*, 467-473.
61. Chen I. S., Wu S. J., Leu Y. L., Tsai I. W. et al.: Alkaloids from root bark of *Zanthoxylum simulans*. *Phytochemistry*. 1996, *42*, 217-219.
62. Nonato M. G., Garson M. J., Truscott R. J. W., Carver J. A.: Proton NMR assignments of anonaine and xylopine derivatives from *Talauma gitingensis*. *J. Nat. Prod.* 1990, *53*, 1623-1627.
63. Ishii H., Chen I. S., Akaike M., Ishikawa T. et al.: Studies on the chemical constituents of rutaceous plants. XLIV. The chemical constituents of *Xanthoxylum integrifolium* (Merr) Merr. (*Fagrarra integrifolia* Merr.) 1. The chemical constituents of the root wood. *Yakugaku Zasshi*. 1982, *102*, 182-186. Chem. Abstract: 1982:469240.
64. Tsai I. L., Chang R. G., Fang S. C., Ishikawa T. et al.: Chemical constituents from the root bark of Formosan *Toddalia Asiatica*. *Chin. Pharm. J.* 1996, *48*, 63-75.
65. Yu H. J., Chen C. C., Shieh B. J.: The constituents from the leaves of *Magnolia coco*. *J. Chin. Chem. Soc.* 1998, *45*, 773-778.
66. Nissanka A. P. K., Karunarante V., Ratnayake Bandara B. M., Kumar V. et al.: Antimicrobial alkaloids from *Zanthoxylum tetraspermum* and *caudatum*. *Phytochemistry*. 2001, *56*, 857-861.
67. Moravcová J.: Biologicky aktivní přírodní látky. Interní studijní pomůcka, VŠCHT, Praha, 2006, 108 s. Dostupné na: <http://www.vscht.cz/lam/new/bapl2003-01.pdf>. Staženo 10. 6. 2011.
68. Chen J. J., Huang S. Y., Duh C. Y., Chen I. S. et al.: A new cytotoxic amide from stem wood of *Hibiscus tiliaceus*. *Planta Med.* 2006, *72*, 935-938.
69. Chang S. T., Cheng S. S., Wang S. Y.: Antitermitic activity of essential oils and components from *Taiwania* (*Taiwania cryptomerioides*). *J. Chem. Ecol.* 2001, *27*, 717-724.
70. Yee N. K. N., Coates R. M.: Total synthesis of (+)-9,10-anti-copalol via epoxy trienylsilanecyclizations. *J. Org. Chem.* 1992, *57*, 4598-4608.
71. Cheng M. J., Lee K. H., Tsai I. L., Chen I. S.: Two new sesquiterpenoids and anti-HIV principles from the root bark of *Zanthoxylum ailanthoides*. *Biorg. Med. Chem.* 2005, *13*, 5915-5920.
72. Bhattacharya S., Zaman M. K.: Pharmacognostical Evaluation of *Zanthoxylum nitidum* bark. *Int. J. PharmTech Res.* 2009, *1*, 292-298.

73. Yang C. H., Cheng M. J., Chiang M. Y., Kuo Y. H. et al.: Dihydrobenzo[c]phenanthridine Alkaloids from Stem Bark of *Zanthoxylum nitidum*. *J. Nat. Prod.* 2008, *71*, 669-673.
74. Cai M., Zhou Y., Wang X., Li R. et al.: Rapid structural characterisation of isomeric benzo[c]phenanthridine alkaloids from the roots of *Zanthoxylum nitidum* by liquid chromatography combined with electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2007, *21*, 1931-1936.
75. Moriyasu M., Ichimaru M., Nisshiyama Y., Kato A.: (R)-(+)-Isotembetarine, a quaternary alkaloid from *Zanthoxylum nitidum*. *J. Nat. Prod.* 1997, *60*, 299-301.
76. Huang Z. X., Li Z. H.: Studies on the antitumor constituents of *Zanthoxylum nitidum*. *Huaxue Xuebao* 1980, *38*, 535-542. Chem. Abstract: 1981:99773.
77. Fang S. D., Wang K. L., Hecht S. M.: Inhibitors of DNA topoisomerase I isolated from the roots of *Zanthoxylum nitidum*. *J. Org. Chem.* 1993, *58*, 5025-5027.
78. Chu Y. C., Lee H. J., Chu C. Y., Yin Y. F. et al.: Protective effects of Leaf extract of *Zanthoxylum ailanthoides* on oxidation of low-density lipoprotein and accumulation of lipid in differentiated THP-1 cells. *Food Chem. Toxicol.* 2009, *47*, 1265-1271.
79. Cheng J. M., Tsa I. L., Chen I. S.: Chemical Constituents from the Root Bark of Formosan *Zanthoxylum ailanthoides*. *J. Chin. Chem. Soc-Taipei.* 2003, *50*, 1241-1246.
80. Ju Y., Still C. S., Sacalis J. N., Li J. et al: Cytotoxic Coumarins and Lignans from Extracts of the Northern Prickly Ash (*Zanthoxylum americanum*). *Phytother. Res.* 2001, *15*, 441-443.
81. Bafi-Yebo N. F. A., Arnason J. T., Baker J., Smith M. L.: Antifungal Constituents of Northern Prickly Ash, *Zanthoxylum americanum* Mill. *Phytomedicine.* 2005, *12*, 370-377.
82. Islam A., Sayeed A., Bhuiyan M. S. A., Islam M. U. A. et al.: Antimicrobial activity and cytotoxicity of *Zanthoxylum budrunga*. *Fitoterapia.* 2001, *72*, 428-430.
83. Rahman M. M., Islam M. A., Khondkar P., Gray A. I.: Alkaloids and lignans from *Zanthoxylum budrunga*. *Bioch. Syst. Eco.* 2005, *33*, 91-96.
84. Tarus P. K., Coombes P. H., Crouch N. R., Mulholland D. A.: Benzo[c]phenanthridine alkaloids from stem bark of the Forest Knobwood, *Zanthoxylum davyi* (Rutaceae). *S. Afr. J. Bot.* 2006, *72*, 555-558.
85. Patiño Ladino O. J., Suárez L. E. C.: Isoquinoline alkaloids of *Zanthoxylum quinduense*. *Bioch. Syst. Ecol.* 2010, *38*, 853-856.

86. Hatano T., Inada K., Ogawa T., Ito H. et al.: Aliphatic acid amides of the fruits of *Zanthoxylum piperitum*. *Phytochemistry*. 2004, *65*, 2599-2604.
87. Yamazaki E., Inagaki M., Kurita O., Inoue T.: Antioxidant activity of Japanese pepper (*Zanthoxylum piperitum* DC.) fruit. *Food Chem.* 2007, *100*, 171-177.
88. Jeong H. C., Kwak J. H., Kim J. H., Choi N. G. Et al.: Neuronal cell protective and antioxidant effects of phenolics obtained from *Zanthoxylum piperitum* leaf using in vitro model system. *Food Chem.* 2011, *125*, 417-422.
89. Pereira S. S., Lopes L. S., Marques R. B., Figueiredo K. A. et al.: Antinociceptive effect of *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. (Rutaceae) in model of acute pain in rodents. *J. Ethnopharmacol.* 2010, *129*, 227-231.
90. Jullian V., Bourdy G., Georges S., Maurel S. et al.: Validation of use of antimalarial remedy from French Guiana, *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. *J. Ethnopharmacol.* 2006, *106*, 348-352.
91. Chen I. S., Tsai I. W., Teng Ch. M., Chen J. J. et al.: Pyranoquinoline alkaloids from *Zanthoxylum simulans*. *Phytochemistry*. 1997, *46*, 525-529.
92. Chen I. S., Wu S. J., Leu Y. L., Tsai I. W. et al.: Alkaloids from root bark of *Zanthoxylum simulans*. *Phytochemistry*. 1996, *42*, 217-219.
93. Steck T. L., Kant J. A.: Preparation of impermeable ghosts and inside-out vesicles from human erythrocyte membranes. *Methods Enzymol.* 1974, *31*, 172.
94. Ellman G. L., Courtney K. D., Andres V. Jr, Feather-Stone R. M.: A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 1961, *7*, 88.
95. Yang Z. D., Zhang B. D., Ren J., Yang M. J.: Skimmianine, a furoquinoline alkaloid from *Zanthoxylum nitidum* as a potential acetylcholinesterase inhibitor. *Med. Chem. Res.* 2012, *21*, 722-725.
96. Toubé T. P., Murphy J. W. Cross A. D.: The structure of edulitine and edulinine-XXIV: Spectra and stereochemistry. *Tetrahedron*. 1967, *23*, 2061-2065.
97. Chen J. J., Duh CH. Y., Huang H. Y., Chen I. S.: Furoquinoline alkaloids and cytotoxic constituents from leaves of *Melicope semecarpifolia*. *Planta Med.* 2003, *69*, 542-546.

8. SEZNAM ZKRATEK

A549	buněčná linie lidského karcinomu plic
AD	Alzheimerova choroba
AChE	acetylcholinesteráza
ApoE	apolipoprotein E
APP	amyloidový prekurzorový protein
BuChE	butyrylcholinesteráza
CC	sloupcová chromatografie
CDT	Clock Drawing Test
CNS	centrální nervová soustava
DSM-IV	Diagnostic and Statistical Manual, 4. revize
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DPPH	2,2'-difenyl-1-pikrylhydrazyl
DTNB	kyselina 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová
HBV	virus hepatitidy B
HBsAg	povrchový antigen hepatitidy typu B (Hepatitis B surface antigen)
HBeAg	antigen e hepatitidy typu B
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HT-29	buněčná linie lidského adenokarcinomu střev
HuAChE	lidská acetylcholinesteráza
HuBuChE	lidská butyrylcholinesteráza
IC	inhibiční koncentrace
MCF-7	buněčná linie lidské rakoviny prsu
MIC	minimální inhibiční koncentrace
MMSE	Mini-Mental State Exam
MS	hmotnostní spektrometrie
NCI-H460	buněčná linie lidské rakoviny plic
NINCDS-ADRDA	National Institute of Neurologic, Communicative Disorders and Stroke – Alzheimer's disease and Related Disorders
NMDA	N-methyl-D-aspartát
NMR	nukleární magnetická rezonance
ot	otáčky
P-388	buněčná linie myši leukémie
PS1	presenilin 1
PS2	presenilin 2

SF-268	buněčná linie lidského glioblastomu
SNRI	inhibitory zpětného vychytávání serotoninu a adrenalinu
SSRI	inhibitory zpětného vychytávání serotoninu
TLC	tenkovrstvá kapalinová chromatografie