

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



IZOLACE ALKALOIDŮ DRUHU
***MAGNOLIA SOULANGEANA* SOUL.-BOD.**
A STUDIUM JEJICH BIOLOGICKÉ AKTIVITY

Diplomová práce

Vedúci diplomovej práce: PharmDr. Anna Hošťálková, Ph.D.

Hradec Králové, máj 2017

Izabela Baková

PREHLÁSENIE

Prehlasujem, že táto práca je mojím pôvodným autorským dielom, ktoré som vypracovala samostatne (pod vedením svojho školiteľa). Všetka literatúra a ďalšie zdroje, z ktorých som pri spracovaní čerpala, sú uvedené v zozname použitej literatúry a v práci riadne citované. Práca nebola využitá na získanie iného alebo rovnakého titulu.

Hradec Králové, 2017

Izabela Baková

POĎAKOVANIE

Rada by som sa predovšetkým poďakovala mojej školiteľke, PharmDr. Anne Hošťálkovej, Ph.D., za ochotu, cenné rady a odbornú pomoc pri vypracovaní tejto práce. Ďalej by som sa chcela poďakovať doc. PharmDr. Jiřímu Kunešovi, CSc. za zmeranie a interpretáciu NMR spektier, prof. RNDr. Lubomírovi Opletalovi, CSc. za zmeranie inhibície cholinesteráz, Mgr. Martine Hrabínovej a doc. PharmDr. Danielovi Junovi, Ph.D. z Fakulty vojenského zdravotníctví Univerzity obrany za stanovenie inhibície POP a celej katedre farmaceutickej botaniky a ekológie za vytvorenie príjemného pracovného prostredia.

ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK

A β	amyloid β
A β ₄₂	amyloid β o veľkosti 42 aminokyselín
AD	Alzheimerova choroba
ADP	adenozíndifosfát
ACh	acetylcholín
AChE	acetylcholínesteráza
AK	aminokyselina
APP	amyloidový prekursorový proteín
ATP	adenozíntrifosfát
BChE	butyrylcholínesteráza
CDK 5	cyklín-dependentná kináza 5
CNS	centrálny nervový systém
COX-2	cyklooxygenáza 2
CYP 450	cytochróm P450
DNA	deoxyribonukleová kyselina
GIT	gastrointestinálny trakt
GSK-3 β	glykogénsyntáza kináza 3 β
HDL	lipoproteíny s vysokou hustotou (high density lipoproteins)
HEB	hematoencefalická bariéra
Hup A	huperzín A
IC	inhibičná koncentrácia
IChE	inhibitor cholinesteráz
IL	interleukín
INF- α	interferón- α
iNOS	indukovateľná NO syntáza
L-DOPA	levodopa
LDL	lipoproteíny s nízkou hustotou (low density lipoproteins)
MRP	transportér asociovaný s vývojom liekovej rezistencie
MRSA	meticilín rezistentný <i>Staphylococcus aureus</i>

MS	hmotnostná spektrometria
mtDNA	mitochondriálna DNA
NFTs	neurofibrilárne kľbká
NMDA	<i>N</i> -metyl-D-aspartát
NMR	nukleárna magnetická rezonancia
NSAIDs	nesteroidné antiflogistiká
NÚ	nežiaduce účinky
P-gp	P-glykoproteín
POP	prolyl oligopeptidáza
ROS	reaktívne formy kyslíku
sp. (spp.)	druh (druhy)
TČM	tradičná čínska medicína
TLC	tenkovrstvová chromatografia
TNF- α	tumor nekrotizujúci faktor α
UV	ultrafialová oblasť elektromagnetického žiarenia
Ø	priemer chromatografického stĺpca

ZOZNAM OBRÁZKOV A TABULIEK

Obr. 1 Donepezil.....	16
Obr. 2 Rivastigmín.....	17
Obr. 3 Galantamín.....	17
Obr. 4 Huperzín A	18
Obr. 5 Memantín.....	18
Obr. 6 <i>Magnolia × soulangeana</i>	23
Obr. 7 Alkaloidy aporfinového typu.....	25
Obr. 8 Alkaloidy oxoaporfinového typu.....	26
Obr. 9 Taspín	26
Obr. 10 (+)- <i>N</i> -Metyllaurotetanín	43
Obr. 11 Liriodenín	44
Obr. 12 Alokryptopín.....	45
Obr. 13 (+)-Koklaurín.....	46
Tab. 1 Podmienky stĺpcovej chromatografie.	40
Tab. 2 Výsledky stĺpcovej chromatografie.	41
Tab. 3 Biologická aktivita izolovaných alkaloidov	47

OBSAH

ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK	1
ZOZNAM OBRÁZKOV A TABULIEK	3
1. ÚVOD.....	6
2. CIEĽ PRÁCE	8
3. TEORETICKÁ ČASŤ.....	9
3.1. Alzheimerova choroba.....	9
3.1.1. Formy Alzheimerovej choroby.....	9
3.1.2. Etiopatogenéza.....	9
3.1.3. Klinický obraz	15
3.1.4. Farmakoterapia	15
3.2. <i>Magnolia × soulangeana</i> Soul.-Bod.....	22
3.2.1. Taxonomická klasifikácia.....	22
3.2.2. Charakteristika čeľade, rodu a druhu.....	22
3.2.3. Obsahové látky <i>Magnolia × soulangeana</i> Soul.-Bod.....	24
3.2.4. Biologická aktivita alkaloidov	26
4. EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	30
4.1. Materiál a prístrojové vybavenie	30
4.1.1. Rozpúšťadlá.....	30
4.1.2. Chemikálie.....	30
4.1.3. Pufre.....	31
4.1.4. Adsorbenty pre chromatografiu.....	32
4.1.5. Pomocný materiál	32
4.1.6. Prístroje.....	32
4.1.7. Vyvíjacie sústavy pre chromatografiu	33
4.1.8. Detekčné činidlá	33
4.1.9. Činidlá pre stanovenie inhibičnej aktivity voči AChE a BChE.....	33
4.1.10. Činidlá pre stanovenie inhibičnej aktivity voči POP	34
4.2. Metódy.....	35
4.2.1. Všeobecné postupy	35
4.2.2. Štruktúrna analýza a stanovenie fyzikálne-chemických vlastností	36
4.2.3. Stanovenie biologickej aktivity	38
4.2.4. Izolácia alkaloidov z kvetov <i>Magnolia × soulangeana</i> Soul.-Bod.	40

5.	VÝSLEDKY	43
5.1.	Štruktúrna analýza a stanovenie fyzikálne-chemických vlastností izolovaných alkaloidov	43
5.1.1.	MS01: (+)- <i>N</i> -Metyllaurotetanín	43
5.1.2.	MS02: Liriodenín	44
5.1.3.	MS03: Alokryptopín.....	45
5.1.4.	MS04: (+)-Koklaurín.....	46
5.2.	Inhibičná aktivita alkaloidov voči AChE, BChE a POP	47
6.	DISKUSIA	48
7.	ABSTRAKT	50
8.	ABSTRACT	51
9.	POUŽITÁ LITERATÚRA	52

1. ÚVOD

Pred nástupom éry syntetických liečiv zaujímali rastliny a ich extrakty dôležitú pozíciu v liečbe rôznych ochorení. Rozvoj izolačných a identifikačných metód umožnil vedcom odhaliť jednotlivé obsahové látky, ktoré stáli za prejavom daného účinku na organizmus. U mnohých sekundárnych metabolitov bola vo väčšej či menšej miere pozorovaná biologická aktivita a niektoré z týchto látok (či už pôvodné, alebo ich polosyntetické deriváty) nachádzajú významné uplatnenie aj v súčasnej terapii.

Jednu zo zaujímavých skupín sekundárnych metabolitov predstavujú alkaloidy, organické zlúčeniny obsahujúce atóm dusíka v molekule, ktoré sú biogeneticky odvodené od aminokyselín (AK). Po podaní do organizmu často vykazujú širokú škálu účinkov, napr. antiarytmický (chinidín), antiastmatický (efedrín), analgetický (morfín), stimulačný (kofeín), atď. Hlavným zdrojom sú rastliny, i keď niekoľko ich bolo izolovaných zo živočíšnych druhov a húb. Z rastlinných čeľadí sú na výskyt alkaloidov bohaté napr. Papaveraceae, Ranunculaceae, Solanaceae či Amaryllidaceae [1].

U niektorých látok bola evidovaná anticholinesterázová aktivita, potenciálne využiteľná v terapii zatiaľ neliečiteľnej Alzheimerovej choroby (AD), ktorá v civilizovanom svete predstavuje čoraz väčší problém. Asi najpodstatnejším rizikovým faktorom podieľajúcim sa na jej vzniku je vek. Pre rozvinuté krajiny je charakteristické zvyšovanie priemernej dĺžky života obyvateľstva a z toho hľadiska stúpa i význam AD kvôli rastúcej prevalencii a incidencii. Súčasná terapia nedokáže liečiť príčinu AD ani navrátiť kognitívne funkcie do pôvodného stavu, v praxi sa uplatňujú prístupy spomaľujúce progres ochorenia. Jednou z používaných skupín liečiv sú inhibítory cholinesteráz (ICH_E), kde práve rastlinné alkaloidy zaujímajú nenahraditeľné postavenie.

Rastlinná ríša z hľadiska obsahových látok nie je úplne prebádanou oblasťou a stále ponúka nové možnosti – či už priamo uplatniteľné v terapii, alebo slúžiace ako predloha pre ďalší vývoj derivátov s lepšími farmakologickými vlastnosťami. S bylinami tradičnej čínskej medicíny (TČM) sú v rôznych oblastiach užívania dlhodobé skúsenosti, a tak zostávajú bohatým zdrojom rozmanitých biologicky aktívnych látok. Niektoré z nich už našli uplatnenie v liečbe ochorení (vrátane diabetu či AD) [2], čo dodáva motiváciu pre ďalší výskum v rámci prípravkov TČM.

Magnolia spp. sú súčasťou mnohých prípravkov východnej medicíny, požívaných okrem iného aj v terapii rozličných neurologických porúch, z čoho vyplýva schopnosť obsahových látok prešľapovať cez hematoencefalickú bariéru (HEB) a dosahovať miesta

účinku. Alkaloidný extrakt magnólie bol na Katedre farmaceutickej botaniky a ekológie Farmaceutickej fakulty v Hradci Králové podrobený predbežným testom na anticholinesterázovú aktivitu so sľubnými výsledkami – konkrétne s hodnotami inhibičnej aktivity $IC_{50} = 7,54 \pm 0,82 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a $7,30 \pm 0,86 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, respektíve voči AChE a BChE. Preto sme sa rozhodli izolovať a identifikovať jednotlivé látky zodpovedné za tento účinok.

2. CIEĽ PRÁCE

Cieľom tejto diplomovej práce bolo:

- spracovanie literárnej rešerše na alkaloidy daného taxónu a ich biologickú aktivitu,
- prevedenie stĺpcovej chromatografie alkaloidného extraktu *Magnolia × soulangeana* Soul.-Bod.,
- izolácia alkaloidov z vybraných frakcií za použitia štandardných chromatografických metód vrátane ich prečistenia,
- podiel na identifikácii izolovaných látok (MS, NMR) a stanovení niektorých fyzikálne-chemických vlastností (optická otáčavosť),
- podiel na stanovení biologickej aktivity a jej vyhodnotenie.

3. TEORETICKÁ ČASŤ

3.1. Alzheimerova choroba

Alzheimerova choroba je chronické progredujúce neurodegeneratívne ochorenie nie úplne objasnenej etiológie spojené so zhoršovaním pamäti a kognitívnym deficitom. Ide o najčastejší typ demencie (tvorí asi 50-60 % všetkých demencií [3]), pričom jej výskyt výrazne stúpa s vekom. Istá metaanalýza konkrétne uvádza 0,7% výskyt ochorenia vo veku 62,5 roka, ktorý sa každých 5,1 roka zdvojnásobí a vo veku 81-90 rokov tvorí až 25-30 % [4]. S predlžujúcou sa dobou života a celkovo starnúcou populáciou sa predpokladá enormný nárast počtu prípadov. Demencie zaujímajú v štatistike príčin smrti 4.-5. miesto [3].

3.1.1. Formy Alzheimerovej choroby

Na základe počiatku príznakov rozlišujeme dve formy AD. Forma s neskorým začiatkom (senilná) sa vyskytuje u 90-95 % prípadov a príznaky sa objavujú až po 65. roku života. Je multifaktoriálnej etiológie, pričom sa na jej vzniku ako hlavný rizikový faktor podieľa vek, k ďalším patrí ženské pohlavie, nízka úroveň vzdelania [5] a psychická aktivita, úrazy hlavy, vaskulárne faktory, expozícia niektorým neurotoxínom, infekcie centrálného nervového systému (CNS) i genetická predispozícia (známy je napr. polymorfizmus apolipoproteínu E – konkrétne izoforma $\epsilon 4$) [6].

V oveľa menšej miere sa objavuje forma so skorým začiatkom (presenilná), vyskytujúca sa u 5-10 % prípadov. Za skorším nástupom ochorenia (pred 65. rokom) stoja hlavne genetické faktory. Mutácie bývajú na 1. a 14. chromozóme, kde sú zakódované zložky γ -sekretáz – presenilin 2 a presenilín 1, alebo na 21. chromozóme, kde je zakódovaný amyloidový prekursorový proteín (APP) [4].

3.1.2. Etiopatogenéza

Aj keď príčiny a mechanizmy vzniku AD stále nie sú úplne objasnené, v súčasnosti je považovaná za multifaktoriálne ochorenie. Z makroskopických zmien mozgu môžeme pozorovať zväčšenie postranných komôr a atrofiu mozgovej kôry (temporálnej, frontálnej) a hipokampu. Mikroskopicky je charakteristická prítomnosť extracelulárnych senilných (amyloidných) plakov tvorených depozitami β -amyloidu ($A\beta$) a intracelulárnymi neurofibrilárnymi kľbikmi („tangles“, NFTs) obsahujúcich

hyperfosforylovaný proteín τ . To následne vedie k zániku synapsií a neurónov najmä v temporálnej a frontálnej kôre a hipokampe. Ako prvý je postihnutý acetylcholinergický neurotransmitterový systém, ktorý je dôležitý pre kognitívne funkcie, neskôr je zasiahnutý aj glutamátergický a katecholaminergický systém.

Primárna príčina ochorenia je síce neznáma, existuje však viacero patogenetických faktorov, medzi ktorými sa vedci snažia nájsť súvislosti [7].

3.1.2.1. Amyloid β a senilné plaky

Pojem amyloid zahŕňa peptidy vznikajúce z transmembránového APP, ktorý je prirodzenou súčasťou nervových buniek. Za fyziologických podmienok je štiepený α -sekretázou na solubilné fragmenty o veľkosti do 39 AK [4], majúce v organizme dôležitú úlohu (napr. v synaptickej plasticite či ochrane neurónov voči excitotoxicite) [8]. V prípade AD dochádza k zvýšenému štiepeniu APP alebo vznikajú dlhé fragmenty štiepenia. Aktivita α -sekretázy je potlačená a pôsobením β - a následne γ -sekretázy vznikajú dlhšie, primárne rozpustné fragmenty o dĺžke 40-42 AK. V senilných plakoch sa prednostne akumuluje $A\beta$ o veľkosti 42 AK ($A\beta_{42}$). Jeho toxicita spočíva v schopnosti monomérov agregovať, čo je podmienené preferenčným vytvorením konformácie β -skladaného listu [9]. Vysoko fibrilogénne fragmenty sa spájajú do značne neurotoxických oligomérov a neskôr v extracelulárnom priestore koagulujú a polymerizujú. Ložiská takto vytvoreného nerozpustného $A\beta$ sú základom senilných plakov [7]. Tieto útvary vedú k deštrukcii okolitého nervového tkaniva, aktivácii gliových buniek a expresii mediátorov zápalu v mikrogliaách a astrocytoch. Výsledkom je rozvoj chronického neurozápalu [10].

Mechanizmus neurotoxicity sa pokúša objasniť hypotéza amyloidných kanálov. Na jej základe sa oligomérne $A\beta$ inkorporujú do neuronálnej membrány, kde vytvárajú neregulované kation-senzitívne iónové kanály (tzv. amyloidné kanály), čím narušia homeostázu Ca^{2+} . Zvýšenie intracelulárnej hladiny Ca^{2+} spúšťa rôzne apoptotické cesty, podporuje tvorbu reaktívnych foriem kyslíku (ROS) či fosforyláciu τ proteínu a indukuje zmeny počtu synapsií [11].

Oligoméry $A\beta$ však poškodzujú i rôzne funkcie priamo v neurónoch [4]. Do buniek sa dostávajú procesom adsorpčnej pinocytózy, pričom fragmenty o veľkosti 40 a menej AK podliehajú rýchlej degradácii. Oproti tomu je podstatná väčšina internalizovaného $A\beta_{42}$ voči proteolýze rezistentná a hromadí sa v neskorých endozómoch či lyzozómoch. Tvorba týchto agregátov mení aj katabolizmus APP.

V bunkách sú APP s normálnou a patologickou konformáciou zhodnou s A β v rovnováhe. Obyčajne rýchlo degradujúce sa potenciálne amyloidogénne fragmenty sa v prítomnosti agregátov A β ₄₂ stávajú veľmi stabilnými a dochádza k ich akumulácii. Mechanizmus pravdepodobne spočíva v adícii fragmentov na vláknitú mriežku A β ₄₂ a jej rozširovaní. Následne dôjde k strate impermeability lyzozomálnej membrány a uvoľneniu obsahu do cytoplazmy, čo môže vyústiť v lýzu bunky. Takto uvoľnený intracelulárny amyloid sa môže stať základom pre ďalší rast plaku [12].

Nízkomolekulárne oligoméry inhibujú dlhodobú potenciáciu synaptického prenosu (kde sa uplatňujú glutamátové receptory – vid' ďalej) a spôsobujú stratu dendritických trňov a synapsií [11]. Úbytok počtu synapsií koreluje so stupňom poškodenia pamäti u AD [13].

3.1.2.2. Proteín τ a neurofibrilárne kľbká

Proteín τ zohráva významnú úlohu v zostavovaní a stabilizácii neuronálnych mikrotubulov. Jeho fosforylácia je za normálnych okolností prísne regulovaná kinázovou a fosfatázovou aktivitou [14]. U AD dochádza k hyperfosforylácii τ proteínu, ktorú spúšťa aktivovaný enzým GSK-3 β (glykogénsyntáza kináza 3 β) za účasti enzýmu CDK 5 (cyklín-dependentná kináza 5). Predpokladá sa, že k degenerácii intraneuronálneho τ proteínu dochádza v dôsledku toxického pôsobenia oligomérov β -peptidu [7], ktorý značne zvyšuje aktivitu CDK 5 [15]. Hyperfosforylovaný proteín τ stráca schopnosť stabilizovať mikrotubuly, disociuje z väzby a spája sa do párovo heliakálnych filamentov. Tieto dvojzávitnice patologických proteínov sú základom NFTs [16]. V postihnutých neurónoch dochádza k destabilizácii mikrotubulov, rozpadu cytoskeletu a apoptóze. Ako prvý je zasiahnutý acetylcholínergický systém [4].

3.1.2.3. Zmeny v cholínergickom systéme

Cholínergický systém zohráva dôležitú úlohu pri procesoch zapamätania a učenia. Existuje spojenie medzi pamäťovým deficitom u pacientov s AD a zhoršením cholínergickej neurotransmisie v CNS. Podľa cholínergickej hypotézy obnova neurotransmisie práve v tomto systéme zvyšuje dostupnosť synaptického acetylcholínu (ACh) a zlepšuje narušenú pamäť u AD [17].

Acetylcholín je syntetizovaný v cholínergických neurónoch z acetylkoenzýmu A a cholínu za katalýzy enzýmu cholín-*O*-acetyltransferázy. Po uvoľnení do synaptickej štrbiny je rýchlo degradovaný cholínesterázami, majoritne acetylcholínerázou

(AChE), v oveľa menšej miere sa uplatňuje butyrylcholínesteráza (BChE) [18]. Cholín, ako produkt enzymatickej degradácie, je mechanizmom spätného vychytávania prenesený späť do presynaptického zakončenia.

U pacientov s AD bol zistený deficit cholín-*O*-acetyltransferázy, obmedzené spätné vychytávanie cholínu a zvýšená tvorba BChE [7]. Tiež bolo pozorované zníženie aktivity AChE a naopak, zvýšenie aktivity BChE. V neskorých štádiách AD predstavuje BChE predominantnú cholínesterázu v mozgu, a preto sa takisto stáva cieľom v liečbe AD [18].

Avšak cholinergický systém nie je jediným neurotransmiterovým systémom, ktorý je postihnutý. Zmeny boli zaznamenané aj v katecholaminergickom, glutamátergickom, či sérotonergickom systéme [19].

3.1.2.4. Zmeny v glutamátergickom systéme

Aminokyselina glutamát je hlavným a všadeprítomným excitačným neurotransmiterom v CNS. Uplatňuje sa v kontrole synaptickej plasticity, t. j. zmien v sile synapsie (zahŕňa vznik nových synapsí, posilnenie funkčných či zánik nevyužívaných synapsí), ktoré predstavujú kľúčový mechanizmus pamäti a učenia [20]. Na druhej strane však môže byť pre neuróny toxický. Väzbou prevažne na ionotropný NMDA (*N*-metyl-*D*-aspartátový) receptor, ktorý obsahuje kanál pre Ca^{2+} , dochádza k zvýšeniu intracelulárnej koncentrácie Ca^{2+} , čo je životu nevyhnutný proces. Avšak u AD dochádza k nadmernému uvoľňovaniu excitačných AK a v najviac zasiahnutých oblastiach aj k zníženému spätnému vychytávaniu glutamátu. Pri jeho nadmernom pôsobení (tzv. excitotoxicita) dochádza k nadmernému vstupu Ca^{2+} do neurónov vedúceho k aktivácii proteínkináz a fosfatáz a v konečnom dôsledku k apoptóze [7]. Odumreté neuróny sú zdrojom ďalších excitačných AK, na základe čoho vzniká kaskádovitá reakcia poškodzujúca mozgové tkanivo [16].

Hyperexcitácia NMDA receptorov navyše negatívne ovplyvňuje tzv. dlhodobú potenciáciu [7], ktorá predstavuje jednu z najpreskúmanejších zmien v synaptickej plasticite. V procese učenia a vytvárania pamäti totiž hrá úlohu opakovaná stimulácia synapsí, čo vedie k zvýšeniu sily (účinnosti) synapsie, ktoré môže pretrvávajúť ešte hodiny alebo dokonca dni [21].

3.1.2.5. Mitochondriálna dysfunkcia a oxidačný stres

Mitochondrie sú dôležitým článkom energetického metabolizmu buniek, a zároveň kľúčovým regulátorom bunkovej smrti. Istá hypotéza tvrdí, že mutácie v mitochondriálnej DNA (mtDNA) nadobúdané počas starnutia prispievajú k fyziologickému úpadku, ktorý sa objavuje v súvislosti so starnutím a s ním spojenou neurodegeneráciou [22]. Vekom podmienenou akumuláciou mutácií mtDNA môže dôjsť k zníženiu aktivity enzýmov dýchacieho reťazca, zníženiu tvorby ATP a nárastu produkcie ROS [23]. Toto nahromadenie koreluje s poklesom mitochondriálnej funkcie [22].

Dysfunkcia mitochondrií prispieva k poškodeniu tzv. „zraniteľných“ génov v starnúcom mozgu (ide o vekom downregulované gény zohrávajúce úlohu napr. v synaptickej plasticite či mitochondriálnych funkciách). Pre ich promótorov je typická citlivosť k oxidačnému stresu a náchylnosť k chybnnej alebo nedostatočnej oprave, pričom mitochondriálna dysfunkcia môže oba rizikové faktory ešte zhoršiť – zvýšením produkcie ROS a znížením dostupnosti ATP potrebnej na reparáciu DNA [22].

Oxidatívne poškodenie sa v mozgu pacientov s AD objavuje pomerne skoro, ešte predchádza ukladaniu A β . Mitochondrie obsahujú rozmanité elektrónové prenášače schopné tvorby ROS, ako aj sieť antioxidantných mechanizmov. Poškodenie mitochondrie (vrátane poškodenia plynúceho z hromadenia mutácií mtDNA) môže spôsobiť nerovnováhu medzi produkciou a odstraňovaním ROS v prospech produkcie. V nadbytku vznikajúce ROS naďalej poškodzujú mitochondrie, čo vyvolá ešte vyššiu produkciu ROS a stratu antioxidantnej kapacity [22]. U AD je dôležitý fakt, že sa tieto vysoko reaktívne látky viažu na lipidy neuronálnej membrány a spôsobujú ich peroxidáciu, čo vedie k smrti buniek [16].

Oxidačný stres spolu s mitochondriálnou dysfunkciou môže aktivovať signálne dráhy, ktoré pozmeňujú spracovanie APP alebo proteínu τ – konkrétne v zmysle zvýšenia expresie β -sekretázy a zvýšenia abnormálnej fosforylácie τ proteínu [22]. Navyše existuje určitý vzťah medzi mitochondriami a proteínmi, ktoré zohrávajú úlohu v patogenéze AD. Zistilo sa, že APP obsahuje sekvenciu, ktorou je cielený do týchto organel a spôsobuje ich dysfunkciu a zhoršenie energetického metabolizmu u transgénnych myši [24]. Iné štúdie potvrdili, že A β interaguje s mitochondriami, inhibuje aktivitu cytochrómu oxidázy a zvyšuje tvorbu ROS [25,26]. Predpokladá sa, že viac poškodené sú synaptické mitochondrie. Tie následne nedokážu uspokojiť vysoké energetické nároky vyžadované v oblasti synapsí, čo vedie k zhoršeniu neurotransmisie a kognitívnemu zlyhávaniu [23].

3.1.2.6. Neuronálny zápal

Zápal fyziologicky zastáva obrannú funkciu organizmu, avšak v prípade prechodu do chronicity spôsobuje poškodenie tkaniva. V krvi, mozgu a mozgovomiechovom moku pacientov s AD bola zaznamenaná zvýšená hladina prozápalových cytokínov (IL-1 α , IL-1 β , IL-6, TNF- α , INF- α). Podľa hypotézy neriešiteľná povaha amyloidných plakov a NFTs stimuluje chronickú zápalovú reakciu, ktorá má odstrániť tieto fragmenty [27].

U AD je typická glióza – aktivované astrocyty a mikroglie sú hojne nachádzané v blízkosti neurónov a plakov. Produkujú mediátory zápalu (cytokíny, zložky komplementu, chemokíny, adhezívne molekuly, eikosanoidy, ROS a iné radikály, NO a i.) a hlavne nadmerná expresia IL-1 môže ovplyvniť normálne správanie nervových buniek a spôsobiť ich dysfunkciu a smrť. Chronicky aktivované glie môžu taktiež spôsobiť smrť susedných neurónov uvoľnením vysoko toxických produktov (reaktívne kyslíkové intermediáty, NO, proteolytické enzýmy či excitačné AK). Mediátory zápalu a stres vzápätí zvyšujú produkciu APP a amyloidogénne spracovanie APP v prospech A β , čo má za následok opäť expresiu cytokínov, aktiváciu komplementovej kaskády a indukciu iNOS a COX-2 [27]. Abnormálne uvoľňovanie IL-1 a IL-6 navyše ovplyvňuje fosforyláciu τ proteínu [15].

Astrocyty sú dôležité pre clearance a degradáciu A β , avšak v dôsledku chronického stresu nadmerne exprimujú β -sekretázu, čím sa takisto stávajú zdrojom A β [28].

Pretože zápalové komponenty akcelerujú amyloidogézu, ako perspektívne liečivá by sa mohli javiť nesteroidné antiflogistiká (NSAIDs).

Z ďalších znakov bol u AD zaznamenaný nedostatok antiapoptotických a nadbytok proapoptotických faktorov. Vyskytuje sa tiež znížená tvorba nervových rastových faktorov a ich receptorov, čo vedie k zníženiu synaptickej plasticity a pravdepodobne dochádza aj k zníženiu neurogenézy [7]. Medzi všetkými týmito patogenetickými faktormi sa hľadá spojitosť a podmienenosť, čo by umožnilo včasnú diagnostiku i efektívnu terapiu.

3.1.3. Klinický obraz

Neuropatológia aj klinický obraz sú zhodné u oboch foriem AD s tým rozdielom, že u presenilnej formy postupuje demencia často rýchlejšie. Pre demenciu je typický postupný a nenápadný rozvoj. Priebeh je lineárne progredientný, bez väčších výkyvov či stupňovitého zhoršovania stavu [4]. Podľa ťažkostí demencie rozlišujeme tri štádiá AD [3].

V ľahkom štádiu sa objavujú mierne poruchy časopriestorovej orientácie i kognitívnych funkcií, prítomná je porucha pamäti pre nedávne udalosti aj porucha reči. Začínajú sa vyskytovať poruchy zložitejších aktivít denného života, vyžadujúce zvýšenú pozornosť [3,4].

Pre stredne ťažké štádium je typická progresia porúch kognitívnych funkcií, dezorientácia priestorom a časom a problémy so zvládaním bežných denných aktivít. Komunikácia je jednoduchá, objavujú sa závažnejšie behaviorálne a psychiatrické príznaky demencie (podozrievavosť, výbuchy hnevu, nepokoj, halucinácie atď.) [3,4].

V ťažkom štádiu je pacient silne dezorientovaný, nespoznáva okolie ani svojich najbližších a neskôr ani sám seba. Nie je schopný samostatne jesť, obliekať sa, dodržiavať osobnú hygienu. Komunikácia je výrazne obmedzená a stav pacienta vyžaduje trvalú ošetrovateľskú starostlivosť [3,4].

Priemerné trvanie ochorenia od výskytu prvých príznakov je 7-10 rokov, ale vďaka liečbe a práci opatrovateľov sa doba prežitia predlžuje. V konečnej fáze spôsobí demencia smrť, ale pacienti často umierajú skôr v dôsledku iných komplikácií (infekcie, úrazy a poranenia pri pádoch, a i.) [4].

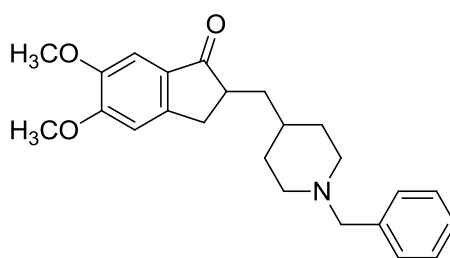
3.1.4. Farmakoterapia

V súčasnosti neexistuje kauzálna liečba AD, cieľom sa preto stáva včasná a presná diagnostika, spomalenie progresie ochorenia, prevencia behaviorálnych symptómov a čo najdlhšie udržanie sebestačnosti pacienta. Farmakoterapia je v podstate symptomatická a snaží sa vyvážiť zmeny v hladinách neurotransmiterov. Zahŕňa dve skupiny látok, tzv. kognitív – a to IChE a antagonistov NMDA receptorov. Ich použitie je založené na dôkazoch a voľba liečiv sa riadi štádiom demencie [3].

3.1.4.1. Inhibítory cholínesteráz

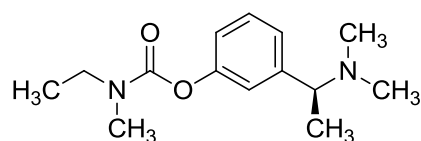
Ide o chemicky heterogénnu skupinu látok, ktoré blokujú hlavné enzýmy zúčastňujúce sa degradácie ACh – AChE, príp. BChE. Vo výsledku sa zvýši dostupnosť deficientného ACh v synaptickej štrbine a dôjde k úprave cholínergickej transmisie v CNS. Inhibícia cholínesteráz navyše znižuje toxicitu aj tvorbu A β , účinok je teda komplexný (úprava deficitu neurotransmiterov, ale aj zásah do patogenézy AD). V praxi sa v Českej republike používajú tri liečivá, a to donepezil, rivastigmín a galantamín, primárne určené na terapiu ľahkej až stredne ťažkej formy. Liečba spomaľuje pokles kognitívnych funkcií, predlžuje obdobie sebestačnosti a zmiernuje aj poruchy správania. IChE je vhodné podávať čo najskôr od stanovenia diagnózy, dávku je však nutné titrovať kvôli lepšej znášanlivosti a nižšiemu výskytu nežiaducich účinkov (NÚ) na gastrointestinálny trakt (GIT). Efektivita je preukázaná až u 60-70 % pacientov a v prípade intolerancie či neúčinnosti podávanej látky je možné ju zameniť za iný inhibítor [3].

Donepezil (Obr. 1) je pomerne selektívny reverzibilný inhibítor AChE, ktorý navyše zvyšuje hustotu nikotínových receptorov v mozgu [8]. Účinok reverzibilných inhibítorov je podmienený prítomnosťou liečiva alebo jeho aktívneho metabolitu v plazme a likvore, kedy dochádza k blokovaniu cholínesteráz. Efekt pretrváva len do doby prítomnosti látky v mieste účinku [29].



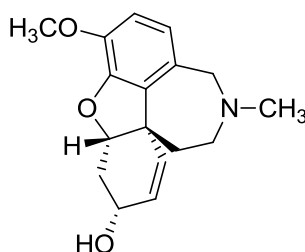
Obr. 1 Donepezil

Rivastigmín (Obr. 2) bol vyvinutý ako syntetický derivát fyzostigmínu a pôsobí na AChE aj BChE mechanizmom pseudoireverzibilnej inhibície. Inhibítor sa viaže do aktívneho miesta enzýmu, kde dochádza k jeho štiepeniu. Vzniknutý produkt je z organizmu rýchlo eliminovaný, aktívne miesto enzýmu je však naďalej blokované karbamátovým zbytkom rivastigmínu po dobu asi 10 hod. Pôsobenie preto trvá aj v čase, keď už bol inhibítor z organizmu eliminovaný [30].



Obr. 2 Rivastigmin

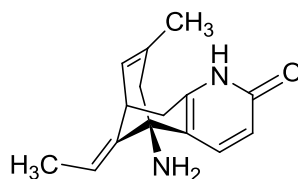
Galantamín (Obr. 3) je alkaloid izolovaný z rôznych druhov čeľade Amaryllidaceae, prvýkrát z cibúľ snežienky *Galanthus woronowii*. Reverzibilne inhibuje AChE, a navyše pôsobí ako alosterický modulátor nikotínových receptorov, čím zlepšuje cholínergickú transmisiu [7].



Obr. 3 Galantamín

Ďalšou zaujímavou látkou zo skupiny alkaloidov je huperzín A (Hup A; Obr. 4), ktorého použitie v terapii AD je schválené v Číne [31]. Tento alkaloid bol izolovaný z druhu *Huperzia serrata*, používaného v TČM na liečbu opuchov, schizofrénie, myastenia gravis, otravy organofosfátmi [8], reumatizmu či horúčky [31].

Huperzín A je reverzibilný a selektívny inhibítor AChE, ktorý má v porovnaní s donepezilom a galantamínom lepšie farmakokinetické vlastnosti [32]. K výhodám patrí aj jeho duálny účinok – na jednej strane symptomaticky zvyšuje hladinu ACh a zlepšuje kognitívne funkcie, na strane druhej má potenciál choroby-modifikujúcej látky. Zistené „non-cholínergické“ účinky zahŕňajú neuroprotekcii pred oxidačným poškodením a apoptózou vyvolanou A β , zlepšenie mitochondriálnej dysfunkcie, antagonistický účinok na NMDA receptory, reguláciu neuronálnych rastových faktorov, podporu neamyloidogénneho spracovania APP a zníženie hladín železa v mozgu [31]. Na základe metaanalýzy z roku 2014 Hup A môže zlepšiť kognitívne funkcie aj aktivitu denného života u pacientov s AD vzhľadom na relatívne mierne a prechodné cholínergické vedľajšie účinky [33].

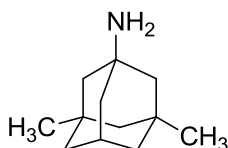


Obr. 4 Huperzín A

3.1.4.2. Antagonisty NMDA receptorov

Druhú skupinu reprezentuje jediný používaný zástupca – memantín (Obr. 5). Ide o nekompetitívneho, stredne afinitného antagonistu NMDA receptorov. Blokovaním nadmerne aktivovaných NMDA receptorov dochádza k zníženiu influxu Ca^{2+} do buniek, a tým k tlmeniu excitotoxického pôsobenia glutamátu. Terapia vedie k udržaniu kognitívnych funkcií, spomaleniu progresie AD a predĺženiu obdobia sebestačnosti, môže však aj redukovať behaviorálne a psychiatrické príznaky demencie [3,34]. Indikáciou sú ťažké demencie, príp. aj stredne ťažké, pokiaľ sú IChE kontraindikované, netolerované či neúčinné [3].

Liečba sa môže s výhodou kombinovať [7].



Obr. 5 Memantín

3.1.4.3. Iné farmakologické možnosti

Ďalšie možnosti zahŕňajú podávanie látok, pre ktoré nie sú evidované dostatočné dôkazy o ich účinnosti alebo tieto úplne chýbajú.

Štandardizovaný extrakt z listov *Ginkgo biloba* je tvorený zmesou látok, ktoré pôsobia antioxidantne, antiagregačne a okrem iného zlepšujú neuronálny metabolizmus [7]. Výsledky viacerých štúdií sú protichodné, avšak metaanalýza z roku 2015 preukázala možnosť stabilizácie či spomalenia poklesu kognitívnych funkcií po podávaní extraktu v dávke 240 mg/deň [35]. Rôzne odborné spoločnosti jeho užívanie odporúčajú v rámci adjuvantnej terapie či pri intolerancii IChE [36].

Napriek tomu, že ďalšie antioxidantne pôsobiace látky (β -karotén, vitamín E, ω -3 mastné kyseliny) v štúdiách nepreukázali prospešný efekt [6], vo forme voľne predajných

prípravkov slúžia ako prídavná terapia ku kognitívam [7]. Klinické skúšky sú potrebné pre posúdenie účinnosti kurkumínu, koenzýmu Q10, resveratrolu či polyfenolov zeleného čaju [6].

Nootropiká (piracetam, pyritinol) a vazodilatačné látky nie sú racionálnou terapiou; v liečbe AD nevykazujú dostatočnú účinnosť [7]. Efektivitu nepreukázalo ani podávanie statínov, u ktorých sa predpokladali neuroprotektívne aj antioxidantné vlastnosti [37,38].

Objavili sa tiež informácie, že dlhodobé užívanie NSAIDs chráni pred rozvojom AD, a tento protektívny efekt závisí od trvania protizápalovej liečby [39]. Nedávna metaanalýza preukázala, že ich užívanie môže byť spojené so znížením rizika poklesu kognitívnych funkcií [40].

Pozoruhodnú skupinu látok predstavujú inhibítory prolyl oligopeptidázy (POP), cytosólovej serínovej proteázy, ktorá hydolyzuje peptidy obsahujúce AK prolín. Tento enzým sa zúčastňuje štiepenia mnohých fyziologických substrátov (napr. substancia P, vazopresín) a jeho aktivita pravdepodobne zohráva dôležitú rolu pri delení a diferenciácii buniek, v procese pamäti a učenia, ako aj u niektorých psychiatrických porúch [41]. Prostredníctvom degradácie neuropeptidov môže POP urýchľovať proces starnutia a podieľať sa na vekom podmienených neurodegeneratívnych ochoreniach [42]. Inhibícia POP sa v poslednom čase stáva jedným z ďalších terapeutických cieľov AD.

3.1.4.4. Nové terapeutické prístupy

Vo vývoji sú nové liečivá, ktoré sa pokúšajú ovplyvniť základné patogenetické mechanizmy v snahe zastaviť priebeh choroby už v počiatočných štádiách. Ide o tzv. chorobu modifikujúce látky (disease-modifying drugs), ktoré sa nachádzajú v rôznych fázach klinického skúšania, a väčšina z nich sa zameriava na možnosti ovplyvnenia A β .

Tvorbu A β by teoreticky mali znižovať inhibítory β - a γ -sekretázovej aktivity a stimulátory α -sekretázovej aktivity. γ -Sekretáza sprostredkováva (mimo APP) aj štiepenie iných esenciálnych substrátov podieľajúcich sa na diferenciácii a proliferácii buniek, čo limituje použitie inhibítorov v klinických skúškach. Preto sa vývoj zameriava na modulátory, ktoré neinteragujú s katalytickým miestom enzýmu. Nádejný tarenflurbil (*R*-enantiomér flurbiprofénu) v štúdiách nepreukázal žiadne benefity, ďalšie látky sú skúšané. β -Sekretáza má okrem fyziologických funkcií i nevýhodu veľkosti katalytického miesta. Inhibítory by mali byť veľké a hydrofilné molekuly, čím je značne sťažená penetrácia cez HEB [6]. Snahy vedú k vývoju nepeptidických molekúl s lepšou

penetráciou a biologickou dostupnosťou po perorálnom podaní [34]. Z aktivátorov α -sekretáz je v procese skúšania etazolát [37].

Ďalej sú skúmané látky blokujúce agregáciu A β , ktoré by zabránili tvorbe neurotoxických oligomérov. Sľubne javiaci sa tramiprosat nepriniesol významné zmeny, pre účinnosť iných zlúčenín (kolostrín, *scyllo*-inozitol) je nedostatok dôkazov. Keďže sa zistilo, že meď a zinok sa zúčastňujú agregácie A β a tiež bola preukázaná ich vysoká koncentrácia v amyloidných plakoch, študované sú i látky interferujúce s kovmi (napr. PBT2) [6,34].

Odlíšnu stratégiu predstavuje imunoterapia, ktorá vedie k priamemu odstraňovaniu už uložených depozít A β na základe imunologickej odpovede. Predpokladá sa, že na clearance amyloidu sa podieľa viacero mechanizmov, ako rozrušenie plakov protilátkami, neutralizácia toxických oligomérov, aktivácia makrofágií a fagocytóza patologických depozít a i. [34].

Skúmané sú amyloidné vakcíny (aktívna imunizácia) aj monoklonálne protilátky (pasívna imunizácia) [6,34], avšak podľa najnovších údajov ani bapineuzumab, ani solanezumab nepreukázali účinnosť u pacientov s ľahkou až stredne ťažkou formou AD. Možným vysvetlením nedostatočnej efektivity je nutnosť skoršej intervencie; k akumulácii A β pravdepodobne dochádza oveľa skôr pred nástupom symptómov [43]. Iné protilátky sú vo fáze skúšania (napr. aducanumab) [44].

Prirodzené protilátky proti A β obsahuje aj ľudský intravenózný imunoglobulín [34], ktorý rok po aplikácii redukoval atrofiu mozgu, bránil poklesu kognitívnych funkcií a oddialil nástup AD u pacientov s miernou kognitívnou poruchou. Tento efekt sa však v intervale asi dvoch rokov vytratil [45].

Iné stratégie sú zamerané na τ proteín a zahŕňajú inhibíciu jeho agregácie a hyperfosforylácie a imunoterapiu. Študovaná je aj modulácia zápalového procesu a oxidačného poškodenia, zatiaľ ale žiadne látky nevykazujú dostatočnú účinnosť [34].

Keďže nové prístupy zatiaľ nepriniesli výsledky v podobe významného zlepšenia či aspoň zastavenia zhoršovania stavu, a keďže používaných účinných látok v terapii AD je žalostne málo, výskum sa zameriava aj na hľadanie ďalších potenciálnych IChE s lepšími vlastnosťami – s vyššou biodostupnosťou, dlhším trvaním účinku a nižším výskytom NÚ. U mnohých látok bola zistená inhibičná aktivita voči cholinesterázam, väčšinou len *in vitro*. Iba pár z nich sa testovalo na zvieracích

modeloch, čo je však nevyhnutné pre posúdenie ich schopnosti prekonať HEB a plne rozvinúť svoj účinok v mozgu [8].

Odhalením priaznivých efektov podávania fyzostigmínu, neskôr jeho derivátu rivastigmínu a galantamínu je práve na skupinu alkaloidov upriamená pozornosť z hľadiska eventuálne využiteľnej anticholinesterázovej aktivity. Komplexná štruktúra a atóm dusíku prítomný v molekule sú dôležité kvôli interakcii s väzbovým miestom enzýmu [46]. Acetylcholinesterázu dokážu inhibovať aj nealkaloidné látky, ale vo väčšine prípadov u nich nebola preukázaná silnejšia inhibícia [47].

3.2. *Magnolia* × *soulangeana* Soul.-Bod.

3.2.1. Taxonomická klasifikácia

Ríša:	Plantae (rastliny)
Podríša:	Tracheobionta (cievnaté rastliny)
Oddelenie:	Magnoliophyta (krytosemenné)
Trieda:	Magnoliopsida (dvojkľúčolistové)
Rad:	Magnoliales (magnóliotvaré)
Čeľaď:	Magnoliaceae (magnóliovité)
Rod:	<i>Magnolia</i> (magnólia)
Druh:	<i>Magnolia</i> × <i>soulangeana</i> (magnólia Soulangova)

3.2.2. Charakteristika čeľade, rodu a druhu

Je starobyľou čeľaďou, ktorá predchádzala vzniku dvojkľúčolistových rastlín [48] a tvoria ju dreviny trópov a subtropov Ázie a Ameriky, zväčša pestované ako okrasné kry alebo stromy. Prevažne vŕdzelené okrem niektorých druhov rastúcich v oblasti mierneho pásma. Vyznačujú sa nápadne veľkými obojpohlavnými kvetmi, plodom je šištícovité súplodie mechúrikov alebo nažiek. Hlavnými obsahovými látkami sú alkaloidy, glykozidy, silice a triesloviny [49].

Do čeľade Magnoliaceae patria dva rody – *Magnolia* spp. a *Liriodendron* spp., aj keď mnoho tropických druhov magnólií bolo pôvodne klasifikovaných ako samostatné rody (napr. *Michelia*, *Talauma*, *Manglietia*) [48]. Kvôli rôznorodosti je rod ďalej rozčlenený na tri podrody a sekcie a podsekcie:

- podrod *Magnolia* obsahujúci 8 sekcií (*Magnolia*, *Gwillimia*, *Talauma*, *Manglietia*, *Kmeria*, *Rytidospermum*, *Auriculata*, *Macrophylla*) a 7 podsekcí (*Gwillimia*, *Blumiana*, *Talauma*, *Dugandiodendron*, *Splendentes*, *Rytidospermum*, *Oyama*),
- podrod *Yulania* s dvomi sekciami (*Yulania*, *Michelia*) a 6 podsekciami (*Yulania*, *Tulipastrum*, *Michelia*, *Elmerrillia*, *Maingola*, *Aromadendron*),
- podrod *Gynopodium* s dvomi sekciami (*Gynopodium*, *Manglietiastrum*) [50].

Rod *Magnolia* dostal meno po francúzskom profesorovi botaniky Pierrovi Magnolovi (1638 – 1715) [51] a zahŕňa celkovo asi 220 druhov (podrod *Magnolia* tvorí

okolo 130 druhov) [50] vyskytujúcich sa v trópech a subtrópech Ázie a Ameriky. Väčšina druhov je rozmiestnená v oblasti severnej pologule, niektoré druhy sa rozšírili aj na južnú pologuľu a dnes sú vysádzané v rôznych regiónoch po celom svete [52].

Vyžadujú slnečné stanoviská, dostatočne vlhkú pôdu, sú mrazuvzdorné. Rozmnožujú sa ťažko – semenami alebo pomocou odrezkov [53].

Magnolia × soulangeana je krížencom *M. denudata* a *M. liliiflora*. Ker dosahuje výšky až 5 metrov, je 5-7 metrov široký, stromovitý, košatý s korunou rozloženou do šírky. Listy sú vajcovité, dlhé 10-20 cm, na vrchole zašpicatené, sú opadavé a klíčia po odkvitnutí. Vrcholový kvetný puk je dlhý 3-4 cm a husto zeleno plstnatý. Kalichovité kvety rastú jednotlivo na konci konárov, sú obojpohlavné, môžu byť purpurové, ružové či takmer biele s tmavším pruhom na vonkajšej strane a majú 6-9 okvetných lístkov. Kvitne v apríli až máji. Šišticovité súplodie mechúrikov je červenkasté so semenami oranžovej farby, ktoré po otvorení visia na dlhých pútkach a dozrievajú v októbri a novembri. Je najčastejšie pestovanou magnóliou v parkoch a záhradách [53].



Obr. 6 *Magnolia × soulangeana*

Magnolia spp. nachádzajú uplatnenie hlavne ako okrasné dreviny, niektoré tropické druhy sa ťažia kvôli drevu. *Magnolia officinalis* a *M. obovata* sú súčasťou materia medica tradičnej aj oficiálnej čínskej a japonskej medicíny [49], kde sa používajú v terapii cievnej mozgovej príhody, bolesti hlavy, úzkosti, nespavosti, alergie, kašľa,

astmy, horúčky, hnačky, vysokého krvného tlaku, GIT dyskomfortu, svalových kŕčov i zvracania [54]. Ako droga slúži kôra a nerozvinutý kvet.

Cortex Magnoliae je prírodný materiál získavaný z *M. officinalis* a iných druhov magnólií, pričom v tradičnej čínskej a japonskej medicíne hrajú významnejšiu rolu *M. officinalis* a *M. obovata*. Droga je zakomponovaná vo viacerých tradičných rastlinných predpisoch používaných na terapiu ťažkostí asociovaných s GIT, zvracania, hnačky, kašľa a hlienu, astmy, bolesti hrudníku i úzkosti [54].

Zdroje drogy *Flos Magnoliae* zahŕňajú tri druhy uvádzané v Čínskom liekopise – *M. biondii*, *M. denudata* a *M. sprengeri*, ale okrem nich sa používa viac než 20 iných druhov ako náhrada či prímеси. Preto bolo navrhnuté, aby sa ako zdroj drogy mohli v TČM používať *M. liliiflora*, *M. cylindrica*, *M. campbelli*, *M. pilocarpa*, *M. wilsonii* a *M. kobus*. Kvet má dlhú históriu klinického užívania v liečbe rinitídy, sinusitídy a bolesti hlavy [52].

3.2.3. Obsahové látky *Magnolia* × *soulangeana* Soul.-Bod.

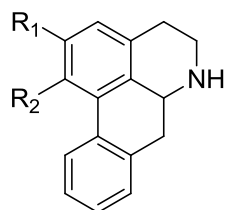
Rastlina je zdrojom mnohých biologicky aktívnych zlúčenín, ako sú alkaloidy, fenypropánové zlúčeniny – lignany a neolignany, terpény, flavonoidy, chromanoly a α -tokoferol [54].

Zaujímavú skupinu sekundárnych metabolitov tvoria alkaloidy – prirodzene sa vyskytujúce dusíkaté zlúčeniny, ktoré často vykazujú biologické účinky po podaní do organizmu. Charakteristická je prítomnosť izochinolínových alkaloidov [55], biosynteticky odvodených od aminokyseliny tyrozínu. Kvalitatívny a kvantitatívny obsah alkaloidov sa líši v závislosti na druhu magnólie, rastlinnom orgáne, období a mieste zberu, voľbe extrakčného činidla aj použitej analytickej metóde. Za chemotaxonomický znak rodu *Magnolia* by mohla byť považovaná prítomnosť liriodenínu, ktorý bol nájdený vo všetkých analyzovaných vegetatívnych orgánoch (list, kvet, kôra) odlišných druhov [56]. Z rôznych orgánov druhu *M. × soulangeana* boli izolované alkaloidy aporfínového (asimilobín [57], anonaín, remerín [58], magnoflorín [59], izolaurelín, kaaverín [56]) a oxoaporfínového (liriodenín, oxolaurenín [60], lanuginozín [56]) typu a protoalkaloid taspín [57].

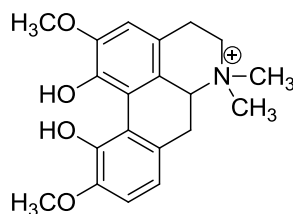
Početnou skupinou izochinolíkových alkaloidov sú alkaloidy aporfínového typu (Obr. 7), ktoré sú biosyntetizované pomocou benzylozochinolíkových prekursorov [61].

Ich prítomnosť bola zistená v nasledujúcich rastlinných orgánoch:

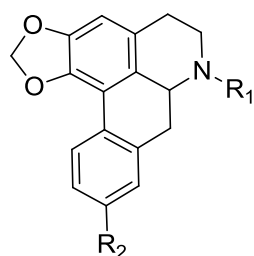
- kôra kmeňu/konárov – izolaurelín, kaaverín [56], remerín [58] a kvartérny alkaloid magnoflorín [59],
- listy – anonaín, remerín [58], asimilobín [57].



R ₁	R ₂	
OH	OCH ₃	asimilobín
OCH ₃	OH	kaaverín



magnoflorín

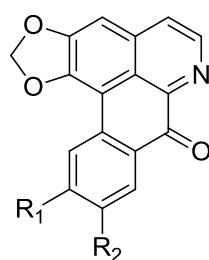


R ₁	R ₂	
H	H	anonaín
CH ₃	OCH ₃	izolaurelín
CH ₃	H	remerín

Obr. 7 Alkaloidy aporfínového typu

Oxoaporfínové alkaloidy (Obr. 8) v rastlinách vznikajú pravdepodobne oxidáciou príslušných aporfínových alkaloidov. Voľné bázy sú svetložltej alebo oranžovej farby s vysokou teplotou topenia. Prvým plne charakterizovaným aporfínovým alkaloidom bol liriidenín [61].

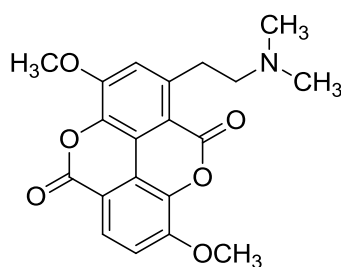
- kôra kmeňu/konárov – liriidenín [56,58,60], oxolaurelín [60],
- listy – lanuginozín [56], liriidenín [56,58],
- kvety – liriidenín [56].



R ₁	R ₂	
H	OCH ₃	lanuginozín
H	H	liriodenín
OCH ₃	H	oxolaurelín

Obr. 8 Alkaloidy oxoaporfínového typu

Z listov bol izolovaný taspín [57] (Obr. 9), jediný zástupca protoalkaloidov, pre ktoré je charakteristická prítomnosť atómu dusíku v postrannom reťazci cyklu. Ide o opticky neaktívnu terciárnu bázu, ktorá je pravdepodobne biogeneticky odvodená od kvartérneho aporfínového alkaloidu magnoflorínu [61].



Obr. 9 Taspín

3.2.4. Biologická aktivita alkaloidov

3.2.4.1. Antimikróbna aktivita

Rôzne štúdie preukázali účinok liriodenínu voči širokej škále mikroorganizmov – je aktívny proti G⁺ (*Staphylococcus aureus* i MRSA [62]) aj G⁻ baktériám, má antifungálny (*Candida albicans*, *Aspergillus niger*) [63], antiplazmodiálny [64] a antiprotozoálny efekt (na chlorochín-senzitívny a rezistentný kmeň *Plasmodium falciparum* [65], na *Trypanosoma cruzi* [66] a inhibuje replikáciu *Toxoplasma gondii* [67]).

Antiplazmodiálny účinok bol zistený aj u anonaínu, asimilobínu [65] a remerínu a zo štúdií vzťahov štruktúry a účinku vyplýva, že pre daný efekt je rozhodujúci substituent na uhlíkoch C1 a C2 aporfínových alkaloidov [68]. Zaujímavá aktivita proti *Leishmania* a *Trypanosoma cruzi* bola evidovaná u kaaverínu [69].

Antibakteriálny účinok vykazovali remerín, anonaín [70], asimilobín [71], lanuginozín [72] a taspín [73]. Antifungálna aktivita bola pozorovaná u anonaínu [70], lanuginozínu [72], remerínu [68] a magnoflorínu [74] a antivírusovo pôsobí taspín [73], magnoflorín a lanuginozín [75].

3.2.4.2. Cytotoxická aktivita

Väčšina testovaných alkaloidov preukázala rôzne silný cytotoxický efekt voči viacerým líniam ľudských nádorových buniek. U izolaurelínu a oxolaurelínu zatiaľ nebola skúmaná biologická aktivita. Remerín sám o sebe nie je cytotoxický, avšak podaný v kombinácii s vinblastínom môže zvýšiť jeho aktivitu, a to pravdepodobne inhibíciou efluxného transportéru P-glykoproteínu (P-gp) [76].

Liriodenín vykazoval silne cytotoxický efekt na bunkové línie karcinómu epidermis KB a rakoviny prsníku BC [77], ďalšie štúdie potvrdili účinok na bunkové línie karcinómu pľúc A-549, nádoru hrubého čreva HCT-8, myšie leukemické bunkové línie P-388 a L-1210 [78] a i. Planárna molekula liriodenínu je schopná interkalácie do DNA, čím dochádza k inhibícii topoizomerázy II [79], a to môže mať za následok inhibíciu syntézy DNA a zastavenie bunkového cyklu [80]. Práve inhibícia topoizomerázy môže byť zodpovedná i za mutagénne a klastogénne vlastnosti, ktoré boli pozorované u nízkych dávok liriodenínu [81]. Zvýšenie protinádorového účinku je možné dosiahnuť použitím kovových komplexov – majú pevnejšiu väzbu na DNA a inhibujú topoizomerázu I; dosahujú dokonca vyššiu aktivitu ako cisplatina [82].

Cieľom viacerých štúdií sa stala aj cytotoxicita taspínu. Aktivita bola pozorovaná voči bunkovým líniam KB a V-79 (fibroblasty škrečka čínskeho) [83], melanómu SK-23, kolorektálneho karcinómu HT-29 [84], epiteliálneho karcinómu A-431 [85], nádoru hrubého čreva HCT-116 [86] a prsníku ZR-75-30 [87], A-549 [88] či myšieho sarkómu S-180 [89]. Mechanizmy zahŕňali inhibíciu proliferácie buniek, indukciu apoptózy, inhibíciu topoizomeráz I a II aj inhibíciu nádorovej angiogenézy [84,85,86,87,88]. Navyše sa v štúdií z roku 2009 zistila efektivita u buniek nadmerne exprimujúcich efluxné transportéry (P-gp, MRP) [86].

U magnoflorínu a lanuginozínu bola zistená aktivita voči bunkovým líniam hepatocelulárneho karcinómu HEPG-2 a nádoru mozgu U-251 [75]. Anonaín bol účinný na bunkové línie rakoviny pľúc H-1299 [90] a krčka maternice HeLa [91].

3.2.4.3. Aktivita na CNS

Na bunkovej línii potkana PC12 (feochromocytóm nadobličiek) sa skúmali následky pôsobenia liriodenínu, anonaínu a asimilobínu na biosyntézu dopamínu. Vo všetkých prípadoch došlo k významnému zníženiu intracelulárnej koncentrácie dopamínu, na jednej strane inhibíciou jeho biosyntézy (znižujú aktivitu a expresiu tyrozínhydroxylázy a dekarboxylázy AK) a na strane druhej indukciou uvoľňovania. Tým pôsobia protektívne proti levodopou indukovanej cytotoxicite, keďže L-DOPA môže u nervových buniek vyvolať oxidačný stres a následnú apoptózu [92,93,94]. Anonaín *in vitro* vykazoval inhibičný efekt na reuptake dopamínu [95].

Skúmaný bol aj vplyv alkaloidov na sérotonínové receptory, kde asimilobín a anonaín pôsobili ako neselektívni agonisti 5-HT_{1A} receptoru, z čoho vyplýva potenciálny antidepresívny efekt [96]. Remerín sa javí ako vysoko selektívny blokátor 5-HT_{2A} receptorov, eventuálne využiteľný v liečbe insomnie či schizofrénie [97].

Niektoré z látok boli testované na anti-AChE aktivitu, zaujímavú z hľadiska terapie AD. V štúdií z roku 2006 bol zistený významný účinok taspínu voči AChE, konkrétne s hodnotou IC₅₀ = 0,33 ± 0,07 µM, čo predstavovalo až 10× vyššiu účinnosť v porovnaní s použitou kontrolou – galantamínom (IC₅₀ = 3,20 ± 1,02 µM). Selektívna inhibícia enzýmu závisela na dávke a pretrvávala dlhší čas [57].

Iná štúdia poukázala na významnú anti-AChE aktivitu oxoaporfinového alkaloidu liriodenínu s hodnotou IC₅₀ = 3,5 ± 1,0 µM, ktorá bola porovnateľná s inhibičným účinkom pozitívnej kontroly – Hup A (IC₅₀ = 1,8 ± 0,3 µM) [98].

Mierny efekt voči AChE bol evidovaný aj u remerínu (IC₅₀ = 20,7 ± 1,3 µM), ako kontrola bol použitý takrín (IC₅₀ = 0,17 ± 0,02 µM) [99]. Magnoflorín ani asimilobín nepreukázali inhibičnú aktivitu na cholinesterázy [57,100].

U magnoflorínu boli zistené potenciálne anxiolytické a sedatívne vlastnosti sprostredkované pravdepodobne ovplyvnením GABA_A receptorov [101].

3.2.4.4. Antioxidačná aktivita

Ako scavengery peroxylových radikálov boli identifikované asimilobín, anonaín, liriodenín, remerín a kaaverín [102]. Magnoflorín navyše dokáže inhibovať oxidáciu lipidov HDL, ako i rôznych foriem LDL (natívneho, glykovaného a glykoxylovaného). Aktivita je daná dvomi voľnými fenolickými skupinami [103,104].

3.2.4.5. Iné aktivity

Na vybraných orgánoch psa (priedušnica) a morčat'a domáceho (bedrovník, priedušnica) pôsobil liriodenín ako selektívny antagonista muskarínových M₃ receptorov [105,106]. Zaznamenaný bol uňho aj antiarytmický a pozitívne inotropný efekt [107]. Navyše má spolu s anonaínom a remerínom vazodilatačné účinky (študované na aorte potkana), sprostredkované interakciou s α_1 -adrenergickými receptormi a blokovaním vstupu Ca²⁺ cez napäťovo riadené kanály [108,109,110].

U magnoflorínu bol pozorovaný zaujímavý antidiabetický efekt, ktorý zahŕňal inhibíciu α -glukozidázy [111], zvýšenie sekrécie inzulínu v pankreatických β -bunkách potkana RINm5F [112] či inhibíciu aldózoreduktázy (enzým zúčastňujúci sa polyolovej cesty metabolizmu glukózy, ale v prípade hyperglykémie môže prispievať k diabetickým komplikáciám, napr. retinopatii) [113]. Určitý inhibičný efekt voči α -glukozidáze preukázal aj anonaín, liriodenín a remerín [114].

Oxoaporfínové alkaloidy boli študované z hľadiska antiagregačnej aktivity – konkrétne liriodenín bol účinný v prípade kolagénom a ADP-indukovanej agregácie čistených králičích krvných doštičiek [115], zatiaľ čo lanuginozín bol testovaný na doštičkách potkana [116].

U niektorých látok sa zistil imunomodulačný efekt – magnoflorín významne zvyšoval fagocytárnu aktivitu neutrofilov a produkciu ROS [117]; imunostimulačné pôsobenie bolo zaznamenané aj u lanuginozínu [118]. Protizápalový účinok taspínu môže spočívať v inhibícii klasickej cesty aktivácie komplementového systému [119].

Anthelmintická aktivita bola evidovaná u liriodenínu, asimilobínu, anonaínu, kaaverínu i remerínu [102].

Alkaloidy magnólie so svojou anticholinesterázovou aktivitou však nie sú jedinými látkami, ktoré by mohli priaznivo ovplyvňovať pacientov s AD. Komplexnejší účinok by sa mohol javiť u hlavných zložiek kôry – neolignanov (honokiol, magnolol a i.), na ktoré je v štúdiách upriamená oveľa väčšia pozornosť. Efekt voči AD môže spočívať vo zvýšení uvoľňovania ACh, znížení uvoľňovania AChE, dôležité sú aj antioxidantné a protizápalové účinky. Ďalším pozoruhodným zistením bolo zvýšenie hladín neurotrofných faktorov a následný rast neuritov. 4-O-Metylhonokiol navyše dokázal zabrániť A β -indukovanej apoptóze buniek potlačením vzniku ROS, ako aj potlačením expície β -sekretázy a vzniku A β [120].

4. EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

4.1. Materiál a prístrojové vybavenie

4.1.1. Rozpúšťadlá

- acetón p. a. (Ing. Švec – Penta, Praha) (Me_2CO)
- benzín lekársky vyhovujúci ČL 2009 a ČSN 65 6544 (Ing. Švec – Penta, Praha) (benzín)
- cyklohexán č. (Ing. Švec – Penta, Praha) (C_6H_{12})
- dietyléter p. a. (Ing. Švec – Penta, Praha) (Et_2O)
- dichlórmétán č. (Ing. Švec – Penta, Praha) (CH_2Cl_2)
- dimetylsulfoxid p. a. (Sigma Aldrich, Praha) (DMSO)
- 1,4-dioxán č. (Ing. Švec – Penta, Praha)
- etanol 95% (Lihovar Chrudim, Chrudim) (EtOH)
- etylester kyseliny octovej (etylacetát) č. (Ing. Švec – Penta, Praha) (EtOAc)
- chloroform č. (Ing. Švec – Penta, Praha) (CHCl_3)
- chloroform deuterovaný pre NMR analýzu chloroform-d 99,8 atom % D (Sigma Aldrich, Praha) (CDCl_3)
- metanol p. a. (Ing. Švec – Penta, Praha) (MeOH)
- metanol deuterovaný pre NMR analýzu metanol-d₄ 99,8 atom % D (Sigma Aldrich, Praha) (CD_3OD)
- metanol HPLC gradient (J. T. Baker, Deventer, Netherlands) (MeOH)
- toluén p. a. (Ing. Švec – Penta, Praha) ($\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_3$)
- voda superčistá

4.1.2. Chemikálie

- acetyltiocholín jodid p. a. (Sigma Aldrich, Praha) (ATChI)
- amoniak 25-29% vodný roztok p. a. (Ing. Švec – Penta, Praha) (NH_4OH)
- baikalín 95% (Sigma Aldrich, Praha)
- butyryltiocholín jodid p. a. (Sigma Aldrich, Praha) (BTChI)
- dietylamin p. a. (Ing. Švec – Penta, Praha) (Et_2NH)
- dihydrogénfosforečnan draselný bezvodý p. a. (Lach-Ner, Neratovice) (KH_2PO_4)

- dihydrogénfosforečnan sodný dihydrát p. a. (Ing. Švec – Penta, Praha) ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \cdot \text{H}_2\text{O}$)
- 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoová kyselina) $\geq 98\%$ (Sigma Aldrich, Praha) (DTNB)
- fyzostigmín 99% (Sigma Aldrich, Praha)
- dusičnan bizmutitý zásaditý č. (Lachema, Brno)
- hydrogénfosforečnan disodný bezvodý p. a. (Ing. Švec – Penta, Praha) (Na_2HPO_4)
- chlorid draselný p. a. (Ing. Švec – Penta, Praha) (KCl)
- hydroxid sodný č. (Ing. Švec – Penta, Praha) (NaOH)
- chlorid ortuťnatý p. a. (Fisher Scientific, Pardubice) (HgCl_2)
- chlorid sodný p. a. (Lachema, Pardubice) (NaCl)
- jodid draselný č. (Lach-Ner, Neratovice) (KI)
- kyselina chlorovodíková 35% p. a. (Ing. Švec – Penta, Praha) (HCl)
- kyselina L-vínna p. a. (Balex, Pardubice)
- tetrametylsilán ACS reagent, NMR grade, $\geq 99,9\%$ (Sigma Aldrich, Praha) (TMS)
- uhličitan sodný bezvodý č. (Ing. Švec – Penta, Praha) (Na_2CO_3)
- Z-Gly-Pro-*p*-nitroanilid $\geq 98\%$ (Sigma Aldrich, Praha)
- Z-Pro-prolinal $\geq 98\%$ (Sigma Aldrich, Praha)

4.1.3. Pufre

- 100mM fosfátový pufer pH 7,4 (vzniká zmiešaním roztokov $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 31,2 $\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ a Na_2HPO_4 28,4 $\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ s vodou v objemovom pomere 9,5 : 40,5 : 50)
- 5mM fosfátový pufer pH 7,4 (vzniká zmiešaním roztokov $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1,56 $\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ a Na_2HPO_4 1,42 $\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ s vodou v objemovom pomere 9,5 : 40,5 : 50)
- 5mM fosfátový pufer pH 7,4 obsahujúci 150 mM NaCl (8,766 g NaCl bolo rozpustených v 5mM fosfátovom pufri pH 7,4 do objemu 1000 ml)
- PBS – 100mM Na/K fosfátový pufer pH 7,4 obsahujúci 137 mM NaCl a 2,7 mM KCl; vzniká zmiešaním 20 ml roztoku A (0,68 g KH_2PO_4 a 1,5 g NaCl sa rozpustí v 100 ml destilovanej vody) so 100 ml roztoku B (0,89 g Na_2HPO_4 a 1,5 g NaCl sa rozpustí v 100 ml destilovanej vody)

4.1.4. Adsorbenty pre chromatografiu

- pre stĺpcovú chromatografiu bol použitý neutrálny oxid hlinitý (Al_2O_3), o veľkosti častíc 63-200 μm , deaktivovaný prídavkom 6 % vody (Across, Lach-Ner, Neratovice)
- pre kontrolné účely boli analytické TLC dosky Silica gel 60 GF₂₅₄ for TLC o rozmeroch 20 × 20 cm strihané na výšku 7,5 alebo 10 cm; v prípade použitia pre preparatívnu TLC 20 × 10 cm (Merck Millipore, Praha)
- na prípravu liatych dosiek pre preparatívnu TLC bol použitý silikagél Silica gel 60 GF₂₅₄ (Merck Millipore, Praha)

4.1.5. Pomocný materiál

- kremelina Diatomaceous earth (Sigma Aldrich, Praha)
- netkaná textília
- vata

4.1.6. Prístroje

- knižnica spektier NIST Virtual Library (NIST, Gaithersburg, Maryland, USA)
- microplate ELISA reader EL800 (Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, Vermont, USA)
- odstredivka Boeco U-32R (Boeco, Hamburg, Germany) s rotorom Hettich 1611 (Hettich, Tuttlingen, Germany)
- polarimeter P3000 (A. Krüss Optronic, Hamburg, Germany)
- reader Synergy™ HT Multi-Detection Microplate Reader (Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, Vermont, USA)
- spektrometer EI/MS na GC-MS system using an Agilent 7890A GC 5975 inertný MSD; EI režim 70 eV; kolóna DP-5 MS (30 × 0,25 mm × 0,25 μm) (Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA)
- spektrometer ESI/MS Thermo Finnigan LCQDuo (GenTech Scientific, Arcade, New York, USA)
- spektrometer Varian VNMR S500 (Varian, Palo Alto, California, USA)
- štatistický program GraphPad Prism 5.0 2006 (Graph PaD Software, SanDiego, California, USA)

- ultrazvukový kúpeľ Sonorex Super 10P (Bandelin, Berlin, Germany)
- vákuová odparka Laborota 20 Heidolph (Heidolph, Schwabach, Germany)
- vákuová odparka Laborota 4000 (Heidolph, Schwabach, Germany)

4.1.7. Vyvíjacie sústavy pre chromatografiu

S1: C₆H₅CH₃ + CHCl₃ + Et₂NH (50 : 45 : 5)

S2: EtOAc + MeOH + Et₂NH (90 : 5 : 5)

S3: C₆H₅CH₃ + Et₂NH (90 : 10)

S4: C₆H₅CH₃ + C₆H₁₂ + Et₂NH (20 : 70 : 10)

S5: C₆H₁₂ + Me₂CO + NH₄OH (30 : 60 : 2)

S6: C₆H₁₂ + EtOAc + Et₂NH (50 : 40 : 10)

S7: C₆H₅CH₃ + Me₂CO + EtOH + NH₄OH (40 : 40 : 6 : 2)

S8: C₆H₁₂ + Et₂NH (95 : 5)

4.1.8. Detekčné činidlá

- **Dragendorffovo činidlo** modifikované podľa Muniera – zásobný roztok vzniká zmiešaním roztoku A a B v pomere 1:1, pričom roztok A vzniká rozpustením 1,7 g dusičnanu bizmutitého zásaditého a 20 g kyseliny vínnej v 80 ml vody, roztok B rozpustením 32 g KI v 80 ml vody; vlastný detekčný roztok bol pripravený pridaním vodného roztoku kyseliny vínnej (10 g v 50 ml) k 5 ml zásobného roztoku.
- **Mayerovo činidlo** vzniká rozpustením 5 g KI v 30 ml vody a pridaním 1,35 g HgCl₂ – mieša sa do rozpustenia.

Obe činidlá boli uchovávané v chladničke pri 4 °C.

4.1.9. Činidlá pre stanovenie inhibičnej aktivity voči AChE a BChE

Roztok 5mM DTNB bol pripravený rozpustením látky v 100mM fosfátovom pufri pH 7,4. Vzniknutý roztok má byť maximálne slabo žltastý.

Roztok ATChI (10mM) bol pripravený rozpustením látky vo vode za vzniku číreho roztoku.

Roztok BTChI (10mM) bol pripravený rovnakým spôsobom ako roztok ATChI.

Činidlá boli uchovávané v chladničke po dobu maximálne 1 týždňa.

4.1.10. Činidlá pre stanovenie inhibičnej aktivity voči POP

Roztok 10mM Z-Gly-Pro-*p*-nitroanilidu bol pripravený rozpustením náležitého množstva látky v 40% 1,4-dioxáne, následne bolo činidlo uchovávané v chladničke.

4.2. Metódy

4.2.1. Všeobecné postupy

4.2.1.1. Príprava rozpúšťadiel

Rozpúšťadlá boli pred použitím prečistené destiláciou a uchovávané v nádobách z tmavého skla, chránené pred svetlom.

4.2.1.2. Odparovanie

Frakcie, ktoré boli získané elúciou za použitia zmesi CHCl_3 + benzín, boli odparované na vákuovej odparke Laborota 4000 Heidolph vo vodnom kúpeli pri teplote $30\text{ }^\circ\text{C}$ za zníženého tlaku. V prípade elučnej zmesi CHCl_3 + EtOH prebiehalo odparovanie pri teplote $40\text{ }^\circ\text{C}$.

4.2.1.3. Sušenie a skladovanie

Jednotlivé frakcie i získané čisté látky boli sušené vo vákuovom exsikátore nad perlami silikagélu po dobu min. 24 hod, po vysušení boli uchovávané v chladničke pri teplote $2\text{-}8\text{ }^\circ\text{C}$.

4.2.1.4. Stĺpcová chromatografia

Do chromatografickej kolóny bola vpravená suspenzia adsorbentu – neutrálny Al_2O_3 deaktivovaný 6 % vody, so zmesou rozpúšťadiel, ktoré slúžili ako počiatková vyvíjacia zmes. Alkaloidný extrakt bol na stĺpec nanesený vo forme tritúrácie s adsorbentom. Stĺpcová chromatografia bola prevedená formou stupňovitej elúcie.

4.2.1.5. Príprava liatych dosiek pre preparatívnu TLC

Na čisté a odmastené sklenené dosky s hladkým alebo zdrsneným povrchom o rozmeroch $15 \times 15\text{ cm}$ bola rovnomerne naliata suspenzia 6,5 g silikagélu Silica gel 60 GF₂₅₄ v 20 ml vody. Takto pripravené dosky sa sušili pri izbovej teplote aspoň 24 hod.

4.2.1.6. Preparatívna TLC

Jednotlivé frakcie boli na liate sklenené, príp. komerčné hliníkové dosky nanášané po rozpustení v menšom objeme CHCl_3 a EtOH (1:1), vo vzdialenosti od okrajov min. 1 cm. Hliníkové dosky boli použité pre delenie menších množstiev látok. Počet použitých

dosiek závisel na množstve delenej frakcie tak, aby nebola prekročená ich nosnosť (3-4 mg·cm⁻¹).

Preparatívne i analytické dosky sa vyvíjali v sklenených komorách, ktoré boli predtým sýtené príslušnou elučnou zmesou aspoň 20 min. Po odvetraní rozpúšťadiel sa v prípade potreby vyvíjanie zopakovalo v rovnakej alebo odlišnej mobilnej fáze.

Chromatogramy boli následne detegované pod UV lampou pri vlnovej dĺžke 254 a 366 nm. Jednotlivé zóny boli označené preparatívnou ihlou a vyškrabané, pričom pri použití viacerých dosiek boli zóny s rovnakým retenčným faktorom spojené. Získané zóny boli zmiešané približne s rovnakým dielom kremeliny a v kolóne eluované zmesou CHCl₃ a EtOH.

4.2.1.7. Detekcia alkaloidov

Kontrolné chromatogramy zo stĺpcovej chromatografie aj preparatívnej TLC a kontroly čistoty izolovaných látok pomocou TLC boli detegované pod UV lampou ($\lambda = 254$ a 366 nm) a jednotlivé zóny boli označené. Nasledoval postrek chromatogramov Dragendorffovým činidlom, ktoré reaguje s alkaloidmi za vzniku oranžového až oranžovočerveného sfarbenia.

Počas prípravy alkaloidného extraktu bola prítomnosť alkaloidov v kyslej vodnej fáze overovaná reakciou s Mayerovým činidlom. Po okyslení na pH 3-4 a pridaní 1-2 ml vody bolo k roztoku pridaných pár kvapiek činidla a v prípade výskytu alkaloidov došlo k vylúčeniu bielej zrazeniny.

4.2.2. Štruktúrna analýza a stanovenie fyzikálne-chemických vlastností

4.2.2.1. Hmotnostná spektrometria s elektrónovou ionizáciou (EI)

Na hmotnostnú analýzu izolovaných látok bol použitý spektrometer Agilent 7890A GC 5975 v režime EI 70 eV s GC kolónou DP-5 MS (30 m × 0,25 mm × 0,25 μm). Analyzované látky boli rozpustené v MeOH (koncentrácia 1 mg·ml⁻¹) a nástrek prebiehal v split móde v pomere 1:10. Namerané spektrá boli porovnávané s knižnicou NIST a s referenčnými spektrami látok už izolovaných na katedre farmaceutickej botaniky a ekológie [121].

4.2.2.2. Hmotnostná spektrometria s ionizáciou elektrosprejom (ESI)

Hmotnostné spektrá boli merané na spektrometri LC/MS Thermo Finnigan LCQDuo s ionizáciou elektrosprejom v kladnom móde. Ako analyzátor slúžila iónová pasca a MSⁿ spektrá boli merané pri kolíznej energii 40 eV. Analyzované látky boli rozpustené v MeOH (1 mg·ml⁻¹).

4.2.2.3. NMR analýza

NMR spektrá boli merané na spektrometri VNMR S500 pri teplote 25 °C. Pre jadrá ¹H bola použitá pracovná frekvencia 499,87 MHz a pre jadrá ¹³C 125,70 MHz. Chemické posuny boli zaznamenané ako hodnoty δ vyjadrené v *parts per milion* (ppm) a boli vzťahované na vnútorný štandard (TMS). Spektrá boli merané v prostredí CDCl₃ alebo CD₃OD – pri použití CDCl₃ boli hodnoty posunu pre atómy ¹H δ = 7,26 ppm a pre ¹³C δ = 77,0 ppm a v prípade CD₃OD pre ¹H δ = 3,30 ppm a pre ¹³C δ = 49,0 ppm.

Namerané dáta sú vo výsledkoch uvádzané v poradí: chemický posun δ, integrálna intenzita signálu, multiplicita signálu (s – singlet, d – dublet, t – triplet, q – kvartet, dd – dublet dubletov, m – multiplet, bs – široký singlet) a interakčná konštanta *J* (v Hz).

4.2.2.4. Optická otáčavosť

Optická otáčavosť izolovaných látok bola meraná v MeOH, resp. CHCl₃ roztokoch alkaloidov na polarimetri P3000. Špecifická optická otáčavosť bola spočítaná podľa vzorca:

$$[\alpha]_D^t = \frac{100 \times \alpha}{c \times l}$$

α – nameraná otáčavosť [°]; t – teplota merania; D – línia sodíkového svetla (λ = 589,3 nm); c – koncentrácia meraného alkaloidu [g·100 ml⁻¹]; l – dĺžka kyvety [dm].

4.2.3. Stanovenie biologickej aktivity

4.2.3.1. Príprava enzýmových preparátov (hemolyzát a plazma)

Ľudské cholinesterázy boli získané z krvi zdravého dobrovoľníka, ktorá bola po odobratí zmiešaná s antikoagulačnou prísadou (2 ml 3,4% citrátu sodného na 18 ml krvi). Ako zdroj AChE slúžili erytrocyty, zdrojom BChE bola krvná plazma. Krv bola následne centrifugovaná rýchlosťou 4000 otáčok/min pri 4 °C na centrifúge Boeco U-32R a odsatá plazma bez erytrocytov sa použila ako zdroj BChE.

Erytrocytárny sediment bol zriedený pridaním 5mM fosfátového pufru pH 7,4 obsahujúceho 150 mM NaCl a opäť centrifugovaný, pričom toto premývanie prebehlo celkom 3×. K premytým erytrocytom bol pridaný 5mM fosfátový pufer pH 7,4 (bez NaCl) v takom objeme, aby bol pomer erytrocytov k pufru 1 : 9. Po homogenizácii sa erytrocyty nechali spontánne hemolyzovať v Erlenmeyerovej banke za stáleho miešania po dobu 10 min.

Po odobratí plazmy a príprave hemolyzátu bola stanovená absorbancia BChE, resp. AChE a v prípade potreby bola hodnota absorbancie upravená prídavkom 5mM fosfátového pufru pH 7,4. Preparáty sa až do doby použitia uchovávali pri teplote -22 °C [121].

4.2.3.2. Stanovenie absorbancie enzýmových preparátov a stanovenie inhibičnej aktivity testovaných alkaloidov voči cholinesterázam

Hodnota inhibičnej aktivity (IC_{50}) bola stanovená pomocou modifikovanej Ellmanovej spektrofotometrickej metódy s využitím DTNB. Podstatou metódy je enzymatický rozklad acetyl-, resp. butyryltiocholínu príslušnou cholinesterázou na tiocholín, ktorý reakciou s DTNB poskytuje žltý sfarbený produkt, následne stanovovaný spektrofotometricky.

Reakcia prebieha v jamkách mikrotitračnej doštičky, kam sa vpraví 8,3 μ l roztoku hemolyzátu, resp. plazmy v 5mM fosfátovom pufri pH 7,4 o určitej koncentrácii (a to v objemových pomeroch 1 : 0, 3 : 1, 1 : 1, 1 : 2, 1 : 3, 1 : 4 a 1 : 5 v prípade hemolyzátu a 1 : 0, 1 : 1, 1 : 2, 1 : 3 a 1 : 4 v prípade plazmy), pridá sa 283 μ l 5mM DTNB vo fosfátovom pufri pH 7,4 a 8,3 μ l testovaného alkaloidu v DMSO (v koncentráciách 40 mM, 10 mM, 4 mM, 1 mM, 0,4 mM a 0 mM). Zmes je trepaná na mikrotrepačke po dobu 1 min a vložená do readeru Synergy™ HT Multi-Detection Microplate Reader, kde je 5 min inkubovaná pri 37 °C. Po inkubácii sa k zmesi pridáva 33,3 μ l substrátu (ATChI, resp. BTChI) alebo DMSO (v prípade slepej vzorky pri stanovení absorbancie

enzýmových preparátov). Absorbancia sa meria po 2 min pri $\lambda = 436$ nm pre stanovenie inhibičnej aktivity AChE, resp. pri $\lambda = 412$ nm pre BChE. Následne bola IC_{50} spočítaná pomocou programu GraphPad Prism podľa vzorca:

$$\%I = 100 - \left(100 \times \frac{\Delta A_{Bl}}{\Delta A_{Sa}} \right)$$

$\%I$ – percento inhibície; ΔA_{Bl} – zmena absorbancie slepej vzorky počas 1 min; ΔA_{Sa} – zmena absorbancie testovanej vzorky počas 1 min [121].

Zistené hodnoty IC_{50} testovaných látok boli porovnávané s IC_{50} použitej referenčnej látky – fyzostigmínu.

4.2.3.3. Stanovenie inhibičnej aktivity testovaných alkaloidov voči prolyl oligopeptidáze

V pufovanom fyziologickom roztoku PBS bol rozpustený enzým POP, ktorého špecifická aktivita bola $0,2 \text{ U} \cdot \text{ml}^{-1}$. Príprava zásobných roztokov testovaných látok spočívala v rozpustení v DMSO (10mM); z týchto zásobných roztokov boli riedením superčistou vodou pripravené roztoky pre testovanie ($10^{-3} - 10^{-7}$ M). Slepé vzorky obsahovali obdobnú koncentráciu DMSO. Substrát POP, Z-Gly-Pro-*p*-nitroanilid, bol rozpustený v 40% 1,4-dioxáne (10mM). Test prebiehal na polystyrénovej 96-jamkovej mikrotitračnej doštičke s rovným a priehľadným dnom, kde bola do jamky vpravená zmes 170 μl PBS, 5 μl roztoku testovanej látky o danej koncentrácii a 5 μl roztoku POP. Po 5 min inkubácii pri 37 °C bolo pridaných 20 μl substrátu a zmes bola inkubovaná ďalších 30 min pri rovnakej teplote. Vznikajúci produkt reakcie (*p*-nitroanilín) je priamo úmerný aktivite POP a meraný spektrofotometricky pri $\lambda = 405$ nm na microplate ELISA readeri EL800 [121]. Nameraná inhibičná aktivita bola vyjadrená ako hodnota IC_{50} a porovnaná s IC_{50} referenčnej látky – baikalínu alebo Z-pro-prolinalu.

4.2.4. Izolácia alkaloidov z kvetov *Magnolia × soulangeana* Soul.-Bod.

4.2.4.1. Príprava alkaloidného extraktu

Súčasťou tejto diplomovej práce nebola príprava alkaloidného extraktu magnólie; túto prácu zrealizovala PharmDr. A. Hošťáľková, Ph.D.

Na získanie alkaloidného extraktu bolo použitých 30,8 kg suchých kvetov magnólie s obdobím zberu v máji 2015. Dokladová vzorka je uložená na Katedre farmaceutickej botaniky a ekológie Farmaceutickej fakulty v Hradci Králové.

Rastlinný materiál bol za varu pod spätným chladičom 2× extrahovaný 450 l EtOH a po odparení rozpúšťadla okyslený 5 l 5% HCl s pridaním rovnakého množstva destilovanej vody (pH ~ 1-2). Zmes bola prefiltrovaná cez netkanú textíliu a doriedená destilovanou vodou na 25 l. Nasledovala alkalizácia roztoku pomocou 10 l 10% Na₂CO₃ na pH ~ 9-10. Po trojnásobnom vytrepání 12,5 l CHCl₃ bolo získaných 61 g surového alkaloidného chloroformového výtrepku, ktorý bol ďalej čistený pretrepaním. Najprv bol výtrepok po okyslení 150 ml 5% HCl a pridaní 1000 ml vody prefiltrovaný cez kremelinu, pričom na premytie filtračnej vrstvy bolo použitých ďalších 100 ml vody. Vytrepávanie prebehlo 2× – vždy za použitia 400 ml Et₂O a výsledkom bol zisk riedkeho odparku L páchnuceho po silici (ďalej nebol spracovávaný). Kyslá vodná fáza bola alkalizovaná pomocou 400 ml 10% Na₂CO₃ na pH ~ 9-10 a opäť vytrepávaná 200 ml Et₂O (celkom 4×). Vzhľadom na pozitívnu reakciu vodnej fázy s Mayerovým činidlom bolo vytrepávanie 2× zopakované za použitia 300 ml CHCl₃. Celý postup vytrepávania bol zopakovaný ešte 2× (pri pH ~ 9-10 bol použitý iba CHCl₃), čo viedlo k zisku 2,7611 g prečisteného alkaloidného odparku.

4.2.4.2. Stĺpcová chromatografia alkaloidného extraktu

Odparok bol separovaný metódou stĺpcovej chromatografie, ktorá prebiehala formou stupňovitej elúcie. Získané frakcie s podobným zložením alkaloidov boli spájané na základe TLC. Podmienky a výsledky chromatografie znázorňujú Tab. 1 a Tab. 2.

Tab. 1 Podmienky stĺpcovej chromatografie.

Hmotnosť odparku	2,7611 g
Adsorbent na trituráciu	10 g
Hmotnosť adsorbentu	Al ₂ O ₃ ; 200 g
Deliaca vrstva v stĺpci	Ø : v = 3,5 : 19 cm

Vrstva s frakciou	Ø : v = 3,5 : 0,9 cm
Mŕtvy objem	180 ml
Objem frakcie	50 ml
Kontrolné TLC	TLC Silica gel 60 GF ₂₅₄ , sústava S1 (príp. S2), dráha 8,5 cm, vyvíjanie 1×

Tab. 2 Výsledky stĺpcovej chromatografie.

Označenie	Spojené frakcie	Zloženie elučnej zmesi	Hmotnosť [mg]
-	1-16	CHCl ₃ : benzín (20 : 80)	-
	17-29	CHCl ₃ : benzín (25 : 75)	
A	30-54	CHCl ₃ : benzín (25 : 75)	12,5
B	55-73	CHCl ₃ : benzín (30 : 70)	127,9
	74-84	CHCl ₃ : benzín (35 : 65)	
	85-94	CHCl ₃ : benzín (40 : 60)	
	95-109	CHCl ₃ : benzín (50 : 50)	
C	110-123	CHCl ₃ : benzín (50 : 50)	38,7
	124-126	CHCl ₃ : benzín (60 : 40)	
D	127-155	CHCl ₃ : benzín (60 : 40)	270,4
	156-165	CHCl ₃ : benzín (70 : 30)	
	166-172	CHCl ₃ : benzín (80 : 20)	
E	173-174	CHCl ₃ : benzín (80 : 20)	318,8
	175-192	CHCl ₃ : benzín (100 : 0)	
	193-206	CHCl ₃ : EtOH (99 : 1)	
F	207-215	CHCl ₃ : EtOH (99 : 1)	183,0
	216-233	CHCl ₃ : EtOH (98 : 2)	
	234-236	CHCl ₃ : EtOH (95 : 5)	
G	237-250	CHCl ₃ : EtOH (95 : 5)	324,2
	251-260	CHCl ₃ : EtOH (90 : 10)	
H	261-279	CHCl ₃ : EtOH (90 : 10)	578,1
	280-291	CHCl ₃ : EtOH (80 : 20)	
	292-312	CHCl ₃ : EtOH (50 : 50)	

4.2.4.3. Izolácia alkaloidov z *Magnolia × soulangeana* Soul.-Bod.

Frakcia B (127,9 mg) bola chromatografovaná na 8 analytických doskách 20 × 10 cm v sústave S3 (2×). Vyškrabaná zóna bola po elúcii a odparení čistená na liatej doske 20 × 12,5 cm CH₂Cl₂ (5×). Zóna bola separovaná a eluovaná a na liatej doske 20 × 12,5 cm bolo realizované ďalšie vyvíjanie v sústavách S4 (1×) a S5 (1×). Dočistenie prebehlo na 2 analytických doskách 20 × 10 cm v sústave S6 (2×), so ziskom 23,1 mg čistej látky **MS01**.

Frakcia C (38,7 mg) bola nanosená na 2 liate dosky s rozmermi 15 × 15 cm a separovaná pomocou preparatívnej TLC v sústave S3 (2×). Na základe UV detekcie bola vyškrabaná a zeluovaná jedna zóna. Nasledovalo čistenie na liatej doske 15 × 15 cm CHCl₃ (5×), zóna bola opäť separovaná. Po nanosení na liatu dosku 15 × 15 cm pokračovala separácia v sústave S5 (1×) Vyškrabaná zóna bola eluovaná a dosušená v exsikátore, čím bolo získaných 25,2 mg látky **MS02**.

Frakcia E (318,8 mg) bola najskôr rozpustená v 5 ml 5% HCl a po pridaní 5 ml vody sfiltrovaná cez kremelinu (premytá vodou). Kyslý roztok bol vytrepávaný 2× 10 ml Et₂O (Et₂O extrakt nebol ďalej spracovávaný). Vodná fáza bola alkalizovaná 10% Na₂CO₃ na pH ~ 9-10 a extrahovaná 6× 20 ml Et₂O, získaných bolo 132,5 mg.

Získané množstvo bolo nanosené na 5 liatych dosiek 15 × 15 cm a po vyvinutí v sústave S7 (1×) bolo vyškrabaných 7 zón. Zóna E3 bola chromatografovaná na 1 analytickej doske 20 × 10 cm sústavami S3 (2×) a S8 (1×), čo viedlo k zisku 5,7 mg látky **MS03**.

Frakcia H (578,1 mg) bola pred samotným delením prečistená rozpustením v 10 ml 2% HCl s prídavkom 10 ml vody a sfiltrovaná cez kremelinu, ktorá bola premytá rovnakým množstvom vody. Po dvojnásobnom vytrepaní Et₂O (ďalej nebol spracovávaný) bol roztok alkalizovaný 5 ml vodného roztoku NH₃ na pH ~ 9. Extrakciou 5× 15 ml Et₂O bolo získaných 286,2 mg.

Preparatívna TLC bola prevedená na 8 liatych doskách 15 × 15 cm v sústave S2 (2×). Z vyškrabávanej 3. zóny H3 bolo izolovaných 38,6 mg látky **MS04**.

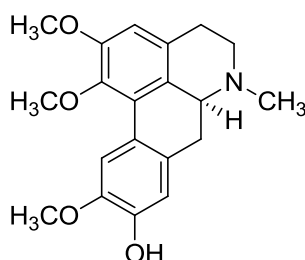
5. VÝSLEDKY

5.1. Štruktúrna analýza a stanovenie fyzikálne-chemických vlastností izolovaných alkaloidov

5.1.1. MS01: (+)-*N*-Metyllaurotetanín

Na základe výsledkov NMR a MS analýzy, ktoré boli porovnané s literatúrou, bola látka MS01 identifikovaná ako (+)-*N*-metyllaurotetanín.

sumárny vzorec: C₂₀H₂₃NO₄



Obr. 10 (+)-*N*-Metyllaurotetanín

5.1.1.1. MS analýza

MS (EI, 70 eV): m/z (%) = 340(100), 341(M⁺, 72), 326(21), 310(17), 294(12), 281(11), 266(6).

5.1.1.2. NMR analýza

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 8.06 (1H, s); 6.81 (1H, s); 6.58 (1H, s); 3.89 (3H, s); 3.88 (3H, s); 3.65 (3H, s); 3.16 (1H, m); 3.03 (1H, m); 2.99 (1H, s); 2.96 (1H, d, $J = 4.22$ Hz); 2.67 (1H, dd, $J = 16.3$ Hz, $J = 3.4$ Hz); 2.56 d (1H, d, $J = 12.7$ Hz); 2.53 (3H, s); 2.50 (1H, dd, $J = 11.7$ Hz, $J = 3.9$ Hz).

¹³C NMR (125 MHz, CHCl₃): δ 152.2, 145.5, 145.1, 144.4, 130.4, 129.1, 127.4, 127.3, 124.2, 114.1, 111.4, 110.5, 62.8, 60.4, 56.3, 56.0, 53.5, 44.2, 34.5, 29.4.

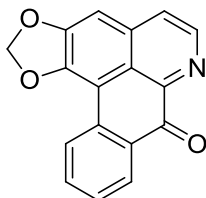
5.1.1.3. Optická otáčavosť

$[\alpha]_D^{25,5} = +76,8^\circ$ (c = 0,093; CHCl₃)

5.1.2. MS02: Liriodenín

Na základe výsledkov NMR a MS analýzy, ktoré boli porovnané s literatúrou, bola látka MS02 identifikovaná ako liriodenín.

sumárny vzorec: C₁₇H₉NO₃



Obr. 11 Liriodenín

5.1.2.1. MS analýza

MS (EI, 70 eV): m/z (%) = 275(M⁺, 100), 246(18), 219(8), 188(25), 162(15), 123(4), 94(10).

5.1.2.2. NMR analýza

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 8.90 (1H, d, J = 5.5 Hz, H-5), 8.67 (1H, d, J = 8.0 Hz, H-11), 8.60 (1H, d, J = 8.0 Hz, H-8), 7.76 (1H, d, J = 7.5 Hz, H-10), 7.59 (1H, t, J = 15.5 Hz, H-9), 7.20 (1H, s, H-3) 6.38 (2H, s, -O-CH₂-O-).

¹³C NMR (125 MHz, CHCl₃): δ 180.0 (C-7), 152.5 (C-2), 147.3 (C-1), 146.4 (C-3a), 145.3 (C-5), 135.1 (C-6a), 134.0 (C-10), 132.8 (C-11a), 131.1 (C-7a), 129.1(C- 9), 128.4 (C-8), 127.4 (C-11), 124.1 (C-4), 123.3 (C-1b), 103.3 (C-3), 102.0 (-O-CH₂-O-).

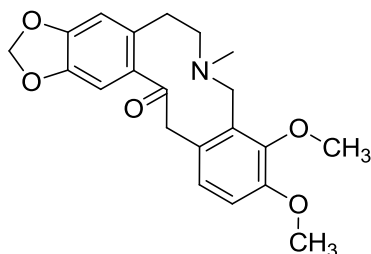
5.1.2.3. Optická otáčavosť

Optická otáčavosť nebola meraná z dôvodu absencie chirálneho atómu.

5.1.3. MS03: Alokryptopín

Na základe výsledkov NMR a MS analýzy, ktoré boli porovnané s literatúrou, bola látka MS03 identifikovaná ako alokryptopín.

sumárny vzorec: $C_{21}H_{23}NO_5$



Obr. 12 Alokryptopín

5.1.3.1. MS analýza

MS (EI, 70 eV): m/z (%) = 369(M^+ , <1), 351(9), 283(11), 267(8), 252(8), 206(20), 164(100), 149(28), 134(17), 121(9), 104(9).

5.1.3.2. NMR analýza

1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ 6.95 (1H, s); 6.91 (1H, d); 6.80 (1H, d, $J = 8.24$ Hz); 6.63 (1H, s); 5.94 (2H, s); 3.86 (3H, s); 3.78 (3H, s); 3.72 (2H, bs); 2.2-3.5 (3H, m); 1.86 (3H, s).

^{13}C NMR (125 MHz, $CHCl_3$): δ 193.6, 151.8, 148.3, 147.9, 146.6, 136.3, 133.1, 129.8, 128.8, 128.0, 110.8, 110.7, 109.5, 101.4, 61.0, 57.8, 55.9, 50.4, 46.5, 41.4, 32.6.

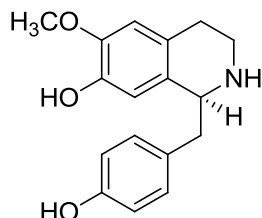
5.1.3.3. Optická otáčavosť

Optická otáčavosť nebola meraná z dôvodu absencie chirálneho atómu.

5.1.4. MS04: (+)-Koklaurín

Na základe výsledkov NMR a MS analýzy, ktoré boli porovnané s literatúrou, bola látka MS04 identifikovaná ako (+)-koklaurín.

sumárny vzorec: C₁₇H₁₉NO₃



Obr. 13 (+)-Koklaurín

5.1.4.1. MS analýza

MS (EI, 70 eV): m/z (%) = 285(M⁺, <1), 178(100), 163(21), 134(6).

MS (ESI): m/z (%) = [M+H]⁺ 286 (100), 269 (4).

5.1.4.2. NMR analýza

¹H NMR (500 MHz, CD₃OD): δ 7.11-7.08 (2H, m, AA'BB', H2'', H6''), 6.79-6.76 (2H, m, AA'BB', H3'', H5''), 6.69 (1H, s, H5), 6.68 (1H, s, H8), 4.18 (1H, dd, J = 9.2 Hz, J = 4.6 Hz, H1), 3.83 (3H, s, OCH₃), 3.29-3.23 (1H, m, H3) 3.19 (1H, dd, J = 14.2 Hz, J = 4.6 Hz, H1'), 3.03-2.92 (1H, m, H3), 2.88-2.75 (3H, m, H1', H4).

¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD): δ 157.5 (C4''), 148.2 (C6), 146.0 (C7), 131.5 (C1'', C2'', C6''), 129.5 (C8a), 126.0 (C4a), 116.6 (C3'', C5''), 114.1 (C8), 112.9 (C5), 57.9 (C1), 56.4 (OCH₃), 41.7 (C1'), 41.3 (C3), 28.6 (C4).

5.1.4.3. Optická otáčavosť

$[\alpha]_D^{26} = + 236,1^\circ$ (c = 0,122; MeOH)

5.2. Inhibičná aktivita alkaloidov voči AChE, BChE a POP

Tab. 3 Biologická aktivita izolovaných alkaloidov

Alkaloid	IC ₅₀ [μM]		
	AChE	BChE	POP
(+)- <i>N</i> -Metyllaurotetanín	898,0 ± 100,5	> 1000	135,4 ± 23,2
Liriodenín	> 1000	> 1000	n. d.
Alokryptopín	114,4 ± 10,9	655,8 ± 69,4	> 1000
(+)-Koklaurín	507,4 ± 27,8	62,9 ± 6,1	665,2 ± 15,4
Štandardy			
Fyzostigmín	0,063 ± 0,001	0,130 ± 0,004	-
Baikalín	-	-	194,1 ± 14,3
Z-Pro-prolinal	-	-	2,8 × 10 ⁻³ ± 2,2 × 10 ⁻³

n. d. – nebolo stanovené

6. DISKUSIA

V rámci tejto diplomovej práce bol alkaloidný extrakt získaný z kvetov *Magnolia* × *soulangeana* podrobený deleniu stĺpcovou chromatografiou, ktoré viedlo k zisku 8 frakcií (A-H). Z vybraných frakcií boli v čistej forme izolované 4 izochinolinové alkaloidy rôznych štruktúrnych typov (MS01, MS02, MS03, MS04), identifikované ako (+)-*N*-metyllaurotetanín, liriodenín, alokryptopín a (+)-koklaurín.

Prítomnosť oxoaporfínového alkaloidu liriodenínu už bola popísaná v iných štúdiách a jedna z nich sa dokonca zmieňuje o tom, že by mohlo ísť o chemotaxonomický znak celého rodu *Magnolia* [56,58,60]. Alkaloidy (+)-*N*-metyllaurotetanín (aporfínového typu), alokryptopín (protopínového typu) a (+)-koklaurín (benzylizochinolinového typu) boli z tohto druhu izolované po prvý raz. (+)-*N*-Metyllaurotetanín bol predtým izolovaný napr. z druhov *Liriodendron tulipifera* (Magnoliaceae) [122], *Peumus boldus* (Monimiaceae) [121] a *Annona purpurea* (Annonaceae) [123]. Alokryptopín bol popísaný u viacerých zástupcov čeľade Papaveraceae (napr. *Glaucium* spp. [124]) či Fumariaceae (*Fumaria officinalis* [125]). (+)-Koklaurín bol izolovaný napr. z *M. salicifolia* (Magnoliaceae) [54] a z rôznych ďalších čeľadí.

Izolované alkaloidy boli podrobené testom na inhibičnú aktivitu voči ľudským cholinesterázam a POP.

Inhibičná aktivita (+)-*N*-metyllaurotetanínu voči obidvom cholinesterázam bola v porovnaní s použitým štandardom nevýznamná. Výsledky sa zhodujú s už publikovanou štúdiou [126], a teda látka sa nejaví ako perspektívna v terapii AD.

Anticholinesterázová aktivita liriodenínu bola nevýznamná ($IC_{50} > 1000 \mu M$), čo je v rozpore s údajmi štúdie z roku 2010, ktorá pre AChE uvádza $IC_{50} = 3,5 \pm 1,0 \mu M$ porovnateľnú s Hup A [98]. V literatúre sa však nepodarilo dohľadať, z akého zdroja pochádzal použitý enzým, tento výrazný rozdiel v aktivite by však bolo vhodné preskúmať. Vzhľadom na to, že v tejto práci *in vitro* bol zdrojom AChE ľudský hemolyzát, výpovedná hodnota tohto modelu je vyššia než v prípade AChE z elektrického úhora používanú v rôznych štúdiách. Liriodenín nepredstavuje potenciálne využiteľnú látku v liečbe AD.

Slabá inhibičná aktivita alokryptopínu voči AChE ($IC_{50} = 114,4 \pm 10,9 \mu M$) a oveľa nižšia voči BChE ($IC_{50} = 655,8 \pm 69,4 \mu M$) nie sú perspektívne z hľadiska možného uplatnenia v terapii AD.

(+)-Koklaurín nevykazoval zaujímavú inhibičnú aktivitu voči AChE, zo všetkých testovaných látok bol však najviac účinný voči BChE ($IC_{50} = 62,9 \pm 6,1 \mu M$). Zvýšené hladiny BChE u pacientov s AD predstavujú ďalší terapeutický cieľ, preto je možné (+)-koklaurín pokladať za látku potenciálne využiteľnú v liečbe AD, príp. ako predlohovú štruktúru pre vývoj účinnejších derivátov. Podobné výsledky už boli publikované u ďalších benzylicholinových alkaloidov, pričom *N*-metylované alkaloidy tohto štruktúrneho typu majú aktivitu približne 2× vyššiu [127].

U alokryptopínu a (+)-koklaurínu nebola pozorovaná dostatočná inhibičná aktivita voči POP. Vyššia aktivita v porovnaní s baikalínom bola zaznamenaná u *N*-metyllaurotetanínu ($IC_{50} = 135,4 \pm 23,2 \mu M$), stále však bola omnoho slabšia oproti *Z*-pro-prolinalu. Hodnotu IC_{50} liriidenínu nebolo možné vypočítať z dôvodu kalenia roztoku pri vyšších koncentráciách.

Na záver sa dá konštatovať, že z hľadiska terapie AD sa ako perspektívna javí jediná z izolovaných látok, a to (+)-koklaurín. Tento alkaloid vykazoval stredne silnú inhibičnú aktivitu voči BChE, voči AChE však účinný nebol. (+)-*N*-Metyllaurotetanín, liriidenín a alokryptopín neboli dostatočne účinné voči cholinesterázam, a preto nepredstavujú potenciálne využiteľné látky v tejto indikácii. (+)-*N*-Metyllaurotetanín vykazoval vyššie inhibičné účinky voči POP v porovnaní s baikalínom, syntetický inhibítor má však mnohonásobne vyššiu aktivitu.

7. ABSTRAKT

Baková I.: Izolace alkaloidů druhu *Magnolia soulangeana* Soul.-Bod. a studium jejich biologické aktivity. Diplomová práce, Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra farmaceutické botaniky a ekologie, Hradec Králové, 2017.

Klíčové slová: *Magnolia soulangeana*, sekundárne metabolity, alkaloidy, biologická aktivita.

Sekundárne metabolity sú zodpovedné za rôzne účinky rastlín na organizmus. U alkaloidov bola popísaná inhibičná aktivita voči cholínesterázam, potenciálne využiteľná v terapii Alzheimerovej choroby (AD). Tieto látky sú v súčasnosti dôležitými liečivami AD, screening rastlinných drog preto zostáva aktuálnou témou.

Alkaloidný extrakt z kvetov *Magnolia* × *soulangeana* bol podrobený predbežným testom na anticholínesterázovú aktivitu. Na základe sľubných výsledkov bol vybraný na izoláciu a identifikáciu potenciálne účinných alkaloidov.

Extrakt bol separovaný stĺpcovou chromatografiou na oxide hlinitom s využitím stupňovitej elúcie. Alkaloidy boli izolované opakovaným použitím preparatívnej tenkovrstvej chromatografie. Jednotlivé alkaloidy boli identifikované na základe štruktúrnej analýzy (NMR, MS) a bola zameraná ich optická otáčavosť. Látky boli testované na inhibičnú aktivitu voči ľudským cholínesterázam (AChE, BChE) s využitím modifikovanej Ellmanovej metódy a voči prolyl oligopeptidáze (POP) spektrofotometrickou metódou. Zistené inhibičné konštanty IC_{50} boli porovnané s literatúrou.

Vo výsledku boli izolované a identifikované štyri alkaloidy rôznych štruktúrnych typov: liriodenín, (+)-*N*-metyllaurotetanín (aporfínového typu), alokryptopín (protopínového typu) a (+)-koklaurín (benzylizochinolínového typu). Posledné tri spomínané látky boli z tohto druhu izolované po prvý raz.

Alkaloidy neprejavili voči AChE výraznejšiu inhibičnú aktivitu; slabá inhibícia bola zaznamenaná u alokryptopínu ($IC_{50} = 114,4 \pm 10,9 \mu\text{M}$). Stredne silnú inhibičnú aktivitu voči BChE vykazoval (+)-koklaurín ($IC_{50} = 62,9 \pm 6,1 \mu\text{M}$). Vyššia inhibičná aktivita voči POP oproti baikalínu bola zaznamenaná u (+)-*N*-metyllaurotetanínu ($IC_{50} = 135,4 \pm 23,2 \mu\text{M}$), avšak nedosahovala úroveň inhibície *Z*-pro-prolinalu. S výnimkou (+)-koklaurínu nemajú izolované látky z hľadiska ďalšieho štúdia potenciál.

8. ABSTRACT

Baková I.: Isolation of alkaloids of the species *Magnolia soulangeana* Soul.-Bod. and study of their biological activity. Diploma thesis, Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Department of Pharmaceutical Botany and Ecology, Hradec Králové, 2017.

Key words: *Magnolia soulangeana*, secondary metabolites, alkaloids, biological activity.

Secondary metabolites of plants are responsible for various biological activities. Alkaloids were described as a potentially suitable for Alzheimer's disease therapy (AD) through their inhibition activities against cholinesterases. Nowadays, these substances are important medicine for AD, therefore a screening of herbal drugs is still a current topic.

An alkaloid extract of *Magnolia* × *soulangeana* flowers was tested in a preliminary testing on anticholinesterase activity. Because of the promising results, it was chosen for an isolation and identification of possible effective alkaloids.

The extract was separated by a column chromatography using aluminium oxide and a step gradient elution. Alkaloids were isolated by a repeated preparative thin-layer chromatography. Individual alkaloids were identified by a structural analysis (NMR, MS) and then their optical activity was measured. Substances were tested for an inhibition activity against human cholinesterases (AChE, BChE) using a modified Ellman's method and against prolyl oligopeptidase (POP) using a spectrophotometric method. Measured inhibition concentration values IC_{50} were compared with literature.

Four alkaloids with different structural types were isolated and identified: liriodenine, (+)-*N*-methyllaurotetanine (aporphine type), allocryptopine (protopine type) and (+)-coclaurine (benzylisoquinoline type). The last three mentioned alkaloids were isolated from this species for the first time.

Alkaloids did not show any significant inhibition activity against AChE; weak inhibition was recorded for allocryptopine ($IC_{50} = 114.4 \pm 10.9 \mu\text{M}$). (+)-Coclaurine showed moderate inhibition activity against BChE ($IC_{50} = 62.9 \pm 6.1 \mu\text{M}$). (+)-*N*-Methyllaurotetanine's inhibition activity against POP ($IC_{50} = 135.4 \pm 23.2 \mu\text{M}$) was higher than that of baicalin, but it did not reach the inhibition level of *Z*-pro-prolinal. Isolated substances apart from (+)-coclaurine do not have any potential for future studies.

9. POUŽITÁ LITERATÚRA

- [1] Ng Y. P., Or T. C. T., Ip N. Y.: Plant alkaloids as drug leads for Alzheimer's disease. *Neurochem. Int.*, 89, 2015, 260-270.
- [2] Cheung T. S. et al.: Therapeutic effects of herbal chemicals in traditional chinese medicine on Alzheimer's disease. *Curr. Med. Chem.*, 22(19), 2015, 2392-2403.
- [3] Vlček J., Fialová D. a kol.: *Klinická farmacie I*. Grada Publishing, Praha 2010, 276-291.
- [4] Raboch J., Pavlovský P. a kol.: *Psychiatrie*. Karolinum, Praha 2012, 170-177.
- [5] Nevšimalová S., Růžička E., Tichý J., a kol.: *Neurologie*. Galén, Praha 2002, 187.
- [6] Tayeb H. O. et al.: Pharmacotherapies for Alzheimer's disease: Beyond cholinesterase inhibitors. *Pharmacol. Ther.*, 134(1), 2012, 8-25.
- [7] Jiráček R.: Farmakoterapie Alzheimerovy choroby. *Remedia*, 5, 2009, 342-345.
- [8] Konrath E. L. et al.: Alkaloids as a source of potential anticholinesterase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease. *J. Pharm. Pharmacol.*, 65(12), 2013, 1701-1725.
- [9] Lorenzo A., Yankner B. A.: β -Amyloid neurotoxicity requires fibril formation and is inhibited by Congo red. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91(25), 1994, 12243-12247.
- [10] Akiyama H. et al.: Inflammation and Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging*, 21(3), 2000, 383-421.
- [11] Kawahara M. et al.: Membrane incorporation, channel formation, and disruption of calcium homeostasis by Alzheimer's β -amyloid protein. *Int. J. Alzheimer's Dis.*, 2011, 17 s.
- [12] Glabe C.: Intracellular mechanisms of amyloid accumulation and pathogenesis in Alzheimer's Disease. *J. Mol. Neurosci.*, 17(2), 2001, 137-145.
- [13] Terry R. D. et al.: Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: Synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. *Ann. Neurol.*, 30(4), 1991, 572-580.
- [14] Churcher I.: Tau therapeutic strategies for the treatment of Alzheimer's disease. *Curr. Top. Med. Chem.*, 6(6), 2006, 579-595.
- [15] Rojo L. E. et al.: Neuroinflammation: Implications for the pathogenesis and molecular diagnosis of Alzheimer's disease. *Arch. Med. Res.*, 39(1), 2008, 1-16.

- [16] Preiss M. a kol.: *Klinická neuropsychologie*. Grada Publishing, Praha 1998, 139-145.
- [17] Bartus R. T. et al.: The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. *Science*, 217(4558), 1982, 408-417.
- [18] Greig N. H., Lahiri D. K., Sambamurti K.: Butyrylcholinesterase: An important new target in Alzheimer's disease therapy. *Int. Psychogeriatr.*, 14(1), 2002, 77-91.
- [19] Francis P. T., Ramírez M. J., Lai M. K.: Neurochemical basis for symptomatic treatment of Alzheimer's disease. *Neuropharmacology*, 59(4-5), 2010, 221-229.
- [20] Stuchlik A.: Dynamic learning and memory, synaptic plasticity and neurogenesis: An update. *Front. Behav. Neurosci.*, 8:106, 2014, 6 s.
- [21] Malenka R. C., Nicoll R. A.: Long-term potentiation – A decade of progress?. *Science*, 285(5435), 1999, 1870-1874.
- [22] Lin M. T., Beal M. F.: Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature*, 443(7113), 2006, 787-795.
- [23] Reddy P. H., Beal M. F.: Amyloid beta, mitochondrial dysfunction and synaptic damage: implications for cognitive decline in aging and Alzheimer's disease. *Trends Mol. Med.*, 14(2), 2008, 45-53.
- [24] Anandatheerthavarada H. K. et al.: Mitochondrial targeting and a novel transmembrane arrest of Alzheimer's amyloid precursor protein impairs mitochondrial function in neuronal cells. *J. Cell Biol.*, 161(1), 2003, 41-54.
- [25] Crouch P. J. et al.: Copper-dependent inhibition of human cytochrome *c* oxidase by a dimeric conformer of amyloid- β_{1-42} . *J. Neurosci.*, 25(3), 2005, 672-679.
- [26] Manczak M. et al.: Mitochondria are a direct site of A β accumulation in Alzheimer's disease neurons: Implications for free radical generation and oxidative damage in disease progression. *Hum. Mol. Genet.*, 15(9), 2006, 1437-1449.
- [27] Rubio-Perez J. M., Morillas-Ruiz J. M.: A review: Inflammatory process in Alzheimer's disease, role of cytokines. *Sci. World J.*, 2012, 15 s.
- [28] Roßner S. et al.: Alzheimer's disease β -secretase BACE1 is not a neuron-specific enzyme. *J. Neurochem.*, 92(2), 2005, 226-234.
- [29] Jiráček R.: Současné trendy v kognitivní farmakoterapii Alzheimerovy choroby. *Neurologie pro praxi*, 2, 2002, 101-105.
- [30] Jiráček R., Vnoučková K.: Rivastigminum. *Remedia*, 6, 2003, 372-378.

- [31] Qian Z. M., Ke Y.: Huperzine A: Is it an effective disease-modifying drug for Alzheimer's disease?. *Front. Aging Neurosci.*, 6:216, 2014, 6s.
- [32] Bai D. L., Tang X. C., He X. C.: Huperzine A, a potential therapeutic agent for treatment of Alzheimer's disease. *Curr. Med. Chem.*, 7(3), 2000, 355-374.
- [33] Xing S. et al.: Huperzine A in the treatment of Alzheimer's disease and vascular dementia: A meta-analysis. *Evid.-Based Complement. Alternat. Med.*, 2014, 10 s.
- [34] Yiannopoulou K. G., Papageorgiou S. G.: Current and future treatments for Alzheimer's disease. *Ther. Adv. Neurol. Disord.*, 6(1), 2013, 19-33.
- [35] Tan M.-S. et al.: Efficacy and adverse effects of *Ginkgo Biloba* for cognitive impairment and dementia: A systematic review and meta-analysis. *J. Alzheimer's Dis.*, 43(2), 2015, 589-603.
- [36] Krombholz R.: Nejčastější demence a jejich léčba. *Neurologia pre prax*, 12(3), 2011, 192-196.
- [37] Villegas S.: Alzheimer's disease: New therapeutic strategies. *Med. Clin. (Barc.)*, 145(2), 2015, 76-83.
- [38] Butterfield D. A., Barone E., Mancuso C.: Cholesterol-independent neuroprotective and neurotoxic activities of statins: Perspectives for statin use in Alzheimer disease and other age-related neurodegenerative disorders. *Pharmacol. Res.*, 64(3), 2011, 180-186.
- [39] Stewart W. F. et al.: Risk of Alzheimer's disease and duration of NSAID use. *Neurology*, 48(3), 1997, 626-632.
- [40] Wang W., Sun Y., Zhang D.: Association between non-steroidal anti-inflammatory drug use and cognitive decline: A systematic review and meta-analysis of prospective cohort studies. *Drugs & aging*, 33(7), 2016, 501-509.
- [41] García-Horsman J. A., Männistö P. T., Venäläinen J. I.: On the role of prolyl oligopeptidase in health and disease. *Neuropeptides*, 41(1), 2007, 1-24.
- [42] Puttonen K. A. et al.: A prolyl oligopeptidase inhibitor, Z-Pro-Prolinal, inhibits glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase translocation and production of reactive oxygen species in CV1-P cells exposed to 6-hydroxydopamine. *Toxicol. In Vitro*, 20(8), 2006, 1446-1454.
- [43] Salloway S. et al.: Two phase 3 trials of bapineuzumab in mild-to-moderate Alzheimer's disease. *N. Engl. J. Med.*, 370(4), 2014, 322-333.

- [44] Sevigny J. et al.: The antibody aducanumab reduces A β plaques in Alzheimer's disease. *Nature*, 537(7618), 2016, 50-56.
- [45] Kile S. et al.: IVIG treatment of mild cognitive impairment due to Alzheimer's disease: A randomised double-blinded exploratory study of the effect on brain atrophy, cognition and conversion to dementia. *J. Neurol., Neurosurg. Psychiatry*, 0, 2015, 1-7.
- [46] Pereira D. M. et al.: Pharmacological effects of *Catharanthus roseus* root alkaloids in acetylcholinesterase inhibition and cholinergic neurotransmission. *Phytomedicine*, 17(8-9), 2010, 646-652.
- [47] Houghton P. J., Ren Y., Howes M. J.: Acetylcholinesterase inhibitors from plants and fungi. *Nat. Prod. Rep.*, 23(2), 2006, 181-199.
- [48] Rodd T., Stackhouse J.: *Stromy: Velký obrazový průvodce*. Rebo Productions, Čestlice 2010, 290.
- [49] Jahodář L.: *Farmakobotanika: Semenné rostliny*. Karolinum, Praha 2011, 38-39.
- [50] Figlar R. B., Nootboom H. P.: Notes on Magnoliaceae IV. *Blumea*, 49(1), 2004, 87-100.
- [51] Marinelli J.: *Rastlina*. Ikar, Bratislava 2006, 113.
- [52] Shen Y. et al.: Chemistry and bioactivity of *Flos Magnoliae*, a chinese herb for rhinitis and sinusitis. *Curr. Med. Chem.*, 15(16), 2008, 1616-1627.
- [53] Nekolová R.: *Listnaté dřeviny od A do Ž díl druhý: Laburnum – Zelkova*. Libuše Kumpánová, Praha 2004, 45-53.
- [54] Sarker S. D., Maruyama Y. (Eds.): *Magnolia: The genus Magnolia*. Taylor & Francis, London 2002, 5-115.
- [55] Hejný S., Slavík B. (Eds.): *Květena české socialistické republiky I*. Academia, Praha 1988, 347.
- [56] Vachnadze N. et al.: Analysis of some species of Magnolia introduced to west Georgia, on the content of aporphine alkaloids and their biological activity. *Georgian Medical News*, (241), 2015, 84-88.
- [57] Rollinger J. M. et al.: Taspine: bioactivity-guided isolation and molecular ligand-target insight of a potent acetylcholinesterase inhibitor from *Magnolia × soulangiana*. *J. Nat. Prod.*, 69(9), 2006, 1341-1346.
- [58] Ziyaev R. et al.: Alkaloids of some *Magnolia* species. *Chem. Nat. Compd.*, 35(3), 1999, 366-367.

- [59] Slavík J., Slavíková L.: Quarternary isoquinoline alkaloids and some diterpenoid alkaloids in plants of the Czech Republic. *Collect. Czech. Chem. Commun.*, 60(6), 1995, 1034-1041.
- [60] Ziyaev R., Abdusamatov A., Yunusov S. Y.: Alkaloids of *Magnolia soulangeana*. *Chem. Nat. Compd.*, 11(4), 1975, 560-561.
- [61] Shamma M.: *The isoquinoline alkaloids chemistry and pharmacology*. Academic Press, New York, 1972, 45-266.
- [62] Zhang Z. et al.: New sesquiterpenoids from the root of *Guatteria multivenia*. *J. Nat. Prod.*, 65(6), 2002, 856-859.
- [63] Rahman M. M. et al.: Antibacterial and cytotoxic compounds from the bark of *Cananga odorata*. *Fitoterapia*, 76(7-8), 2005, 758-761.
- [64] Camacho-Corona M. d. R. et al.: Evaluation of some plant-derived secondary metabolites against sensitive and multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Mex. Chem. Soc.*, 53(2), 2009, 71-75.
- [65] Graziose R. et al.: Antiplasmodial activity of aporphine alkaloids and sesquiterpene lactones from *Liriodendron tulipifera* L. *J. Ethnopharmacol.*, 133(1), 2011, 26-30.
- [66] Costa E. V. et al.: Trypanocidal activity of oxoaporphine and pyrimidine- β -carboline alkaloids from the branches of *Annona foetida* Mart. (Annonaceae). *Molecules*, 16(11), 2011, 9714-9720.
- [67] Ferreira R. A. et al.: New naphthoquinones and an alkaloid with *in vitro* activity against *Toxoplasma gondii* RH and EGS strains. *Exp. Parasitol.*, 132(4), 2012, 450-457.
- [68] Agnihotri V. K. et al.: Constituents of *Nelumbo nucifera* and their antimalarial and antifungal activity. *Phytochem. lett.*, 1(2), 2008, 89-93.
- [69] Fournet A. et al.: Phytochemical and antiprotozoal activity of *Ocotea lancifolia*. *Fitoterapia*, 78(5), 2007, 382-384.
- [70] Tsai I. L., Liou Y. F., Lu S. T.: Screening of isoquinoline alkaloids and their derivatives for antibacterial and antifungal activities. *Kaohsiung J. Med. Sci.*, 5(3), 1989, 132-145; Chemical abstracts 1989:436488.
- [71] Costa E. V. et al.: Antioxidant and antimicrobial activities of aporphinoids and other alkaloids from the bark of *Annona salzmannii* A. DC. (Annonaceae). *Nat. Prod. Res.*, 27(11), 2013, 1002-1006.

- [72] Ferdous A. J. et al.: *In vitro* antimicrobial activity of lanuginosine and oxostephanine. *Fitoterapia*, 63(6), 1992, 549-550.
- [73] Zhang Y. et al.: Taspine isolated from *Radix et Rhizoma Leonticis* inhibits proliferation and migration of endothelial cells as well as chicken chorioallantoic membrane neovascularisation. *Vasc. Pharmacol.*, 48(2-3), 2008, 129-137.
- [74] Chen J. H. et al.: Aporphine alkaloids from *Clematis parviloba* and their antifungal activity. *Arch. Pharm. Res.*, 32(1), 2009, 3-5.
- [75] Mohamed S. M., Hassan E. M., Ibrahim N. A.: Cytotoxic and antiviral activities of aporphine alkaloids of *Magnolia grandiflora* L.. *Nat. Prod. Res.*, 24(15), 2010, 1395-1402.
- [76] You M. et al.: (-)-Roemerine, an aporphine alkaloid from *Annona senegalensis* that reverses the multidrug-resistance phenotype with cultured cells. *J. Nat. Prod.*, 58(4), 1995, 598-604.
- [77] Wirasathien L. et al.: Biological activities of alkaloids from *Pseuduvaria setosa*. *Pharm. Biol.*, 44(4), 2006, 274-278.
- [78] Wu Y. C., Yamagishi T., Lee K. H.: Cytotoxic isoquinoline alkaloids from *Xanthorhiza simplicissima*. *Kaohsiung J. Med. Sci.*, 5(7), 1989, 409-411; Chemical abstracts 1990:18879.
- [79] Woo S. H. et al.: Topoisomerase II inhibition by aporphine alkaloids. *Biochem. Pharmacol.*, 57(10), 1999, 1141-1145.
- [80] Chen C. Y., Chen S. Y., Chen C. H.: Liriodenine induces G1/S cell cycle arrest in human colon cancer cells *via* nitric oxide- and p53-mediated pathway. *Process Biochem.*, 47(10), 2012, 1460-1468.
- [81] Tadaki S. et al.: Clastogenicity of aporphine alkaloids *in vitro*. *J. Pharmacobio-Dyn.*, 15(9), 1992, 501-512.
- [82] Chen C. Y. et al.: Review on pharmacological activities of liriodenine. *Afr. J. Pharm. Pharmacol.*, 7(18), 2013, 1067-1070.
- [83] Itokawa H. et al.: A cytotoxic substance from Sangre de Grado. *Chem. Pharm. Bull.*, 39(4), 1991, 1041-1042.
- [84] Montopoli M. et al.: *Croton lechleri* sap and isolated alkaloid taspine exhibit inhibition against human melanoma SK23 and colon cancer HT29 cell lines. *J. Ethnopharmacol.*, 144(3), 2012, 747-753.

- [85] Zhang Y. et al.: Effects of taspine on proliferation and apoptosis by regulating caspase-3 expression and the ratio of Bax/Bcl-2 in A431 cells. *Phytother. Res.*, 25(3), 2011, 357-364.
- [86] Fayad W. et al.: Identification of a novel topoisomerase inhibitor effective in cells overexpressing drug efflux transporters. *PLoS One*, 4(10), 2009, 8 s.
- [87] Zhan Y. et al.: Activity of taspine isolated from *Radix et Rhizoma Leonticis* against estrogen-receptor-positive breast cancer. *Fitoterapia*, 82(6), 2011, 896-902.
- [88] Zhang Y. et al.: Suppression of tumor-induced angiogenesis by taspine isolated from *Radix et Rhizoma Leonticis* and its mechanism of action *in vitro*. *Cancer Lett.*, 262(1), 2008, 103-113.
- [89] Zhang Y. M., He L. C., Wang H. Y.: Inhibitory effect of taspine on mouse S180 sarcoma and its mechanism. *China J. Chin. Mater. Med.*, 32(10), 2007, 953-956; Chemical abstracts 2008:92450.
- [90] Chen B. H. et al.: (-)-Anonaine induces DNA damage and inhibits growth and migration of human lung carcinoma H1299 cells. *J. Agric. Food Chem.*, 59(6), 2011, 2284-2290.
- [91] Chen C. Y. et al.: (-)-Anonaine induces apoptosis through Bax- and caspase-dependent pathways in human cervical cancer (HeLa) cells. *Food Chem. Toxicol.*, 46(8), 2008, 2694-2702.
- [92] Jin C. M. et al.: Liriodenine inhibits dopamine biosynthesis and L-DOPA-induced dopamine content in PC12 cells. *Arch. Pharm. Res.*, 30(8), 2007, 984-990.
- [93] Jin C. M. et al.: Effects of asimilobine on dopamine biosynthesis and L-DOPA-induced cytotoxicity in PC12 cells. *J. Asian Nat. Prod. Res.*, 10(8), 2008, 737-745.
- [94] Lee J. J. et al.: Effects of anonaine on dopamine biosynthesis and L-DOPA-induced cytotoxicity in PC12 cells. *Molecules*, 13(2), 2008, 475-487.
- [95] Protais P. et al.: Effects of various isoquinoline alkaloids on *in vitro* ³H-dopamine uptake by rat striatal synaptosomes. *J. Nat. Prod.*, 58(10), 1995, 1475-1484.
- [96] Hasrat J. A. et al.: Isoquinoline derivatives isolated from the fruit of *Annona muricata* as 5-HT_{1A} receptor agonists in rats: Unexploited antidepressive (lead) products. *J. Pharm. Pharmacol.*, 49(11), 1997, 1145-1149.

- [97] Munusamy V. et al.: Structure-based identification of aporphines with selective 5-HT_{2A} receptor-binding activity. *Chem. Biol. Drug Des.*, 81(2), 2013, 250-256.
- [98] Mollataghi A. et al.: Anti-acetylcholinesterase, anti- α -glucosidase, anti-leishmanial and anti-fungal activities of chemical constituents of *Beilschmiedia* species. *Fitoterapia*, 83(2), 2012, 298-302.
- [99] Hung T. M. et al.: Alkaloids from roots of *Stephania rotunda* and their cholinesterase inhibitory activity. *Planta Med.*, 76(15), 2010, 1762-1764.
- [100] Jung H. A. et al.: Anti-Alzheimer and antioxidant activities of *Coptidis Rhizoma* alkaloids. *Biol. Pharm. Bull.*, 32(8), 2009, 1433-1438.
- [101] de la Peña J. B. I. et al.: The involvement of magnoflorine in the sedative and anxiolytic effects of *Sinomeni Caulis et Rhizoma* in mice. *J. Nat. Med.*, 67(4), 2013, 814-821.
- [102] Lin R. J. et al.: Anthelmintic activities of aporphine from *Nelumbo nucifera* Gaertn. cv. *Rosa-plena* against *Hymenolepis nana*. *Int. J. Mol. Sci.*, 15(3), 2014, 3624-3639.
- [103] Hung T. M. et al.: Magnoflorine from *Coptidis Rhizoma* protects high density lipoprotein during oxidant stress. *Biol. Pharm. Bull.*, 30(6), 2007, 1157-1160.
- [104] Hung T. M. et al.: Protective effect of magnoflorine isolated from *Coptidis Rhizoma* on Cu²⁺-induced oxidation of human low density lipoprotein. *Planta Med.*, 73(12), 2007, 1281-1284.
- [105] Lin C. H. et al.: Antimuscarinic action of liriodenine, isolated from *Fissistigma glaucescens*, in canine tracheal smooth muscle. *Br. J. Pharmacol.*, 113(4), 1994, 1464-1470.
- [106] Lin C. H. et al.: Pharmacological characteristics of liriodenine, isolated from *Fissistigma glaucescens*, a novel muscarinic receptor antagonist in guinea-pigs. *Br. J. Pharmacol.*, 113(1), 1994, 275-281.
- [107] Chang G. J. et al.: Electrophysiological mechanisms for antiarrhythmic efficacy and positive inotropy of liriodenine, a natural aporphine alkaloid from *Fissistigma glaucescens*. *Br. J. Pharmacol.*, 118(7), 1996, 1571-1583.
- [108] Chuliá S. et al.: Vasodilator effects of liriodenine and norushinsunine, two aporphine alkaloids isolated from *Annona cherimolia*, in rat aorta. *Pharmacology*, 50(6), 1995, 380-387.

- [109] Chuliá S. et al.: Relaxant activity of three aporphine alkaloids from *Annona cherimolia* on isolated aorta of rat. *J. Pharm. Pharmacol.*, 47(8), 1995, 647-650.
- [110] Valiente M. et al.: Vascular activity of (-)-anonaine, (-)-roemerine and (-)-pukateine, three natural 6a(R)-1,2-methylenedioxyaporphines with different affinities for α_1 -adrenoceptor subtypes. *Planta Med.*, 70(7), 2004, 603-609.
- [111] Patel M. B., Mishra S. M.: Magnoflorine from *Tinospora cordifolia* stem inhibits α -glucosidase and is antiglycemic in rats. *J. Funct. Foods*, 4(1), 2012, 79-86.
- [112] Patel M. B., Mishra S.: Hypoglycemic activity of alkaloidal fraction of *Tinospora cordifolia*. *Phytomedicine*, 18(12), 2011, 1045-1052.
- [113] Patel M. B., Mishra S.: Isoquinoline alkaloids from *Tinospora cordifolia* inhibit rat lens aldose reductase. *Phytother. Res.*, 26(9), 2012, 1342-1347.
- [114] Qu Q. et al.: Constituents with inhibitory activity against α -glycosidase from *Magnolia officinalis* Rehder et Wils. *Chin. J. Appl. Environ. Biol.*, 15(6), 2009, 796-798; Chemical abstracts 2010:513724.
- [115] Chen K. S. et al.: Bioactive alkaloids from *Illigera luzonensis*. *J. Nat. Prod.*, 60(6), 1997, 645-647.
- [116] Pyo M. K., Yun-Choi H. S., Hong Y. J.: Antiplatelet activities of aporphine alkaloids isolated from leaves of *Magnolia obovata*. *Planta Med.*, 69(3), 2003, 267-269.
- [117] Sharma U. et al.: Immunomodulatory active compounds from *Tinospora cordifolia*. *J. Ethnopharmacol.*, 141(3), 2012, 918-926.
- [118] Soni V. K. et al.: *N*-methyl-6,7-dimethoxyisoquinolone in *Annona squamosa* twigs is the major immune modifier to elicit polarized Th1 immune response in BALB/c mice. *Fitoterapia*, 83(1), 2012, 110-116.
- [119] Tsacheva I. et al.: Complement inhibiting properties of dragon's blood from *Croton draco*. *Z. Naturforsch.*, 59(7-8), 2004, 528-532.
- [120] Lee Y. J. et al.: Therapeutic applications of compounds in the Magnolia family. *Pharmacol. Ther.*, 130(2), 2011, 157-176.
- [121] Hošťálková A.: Studium obsahových látek vybraných taxonů z řádů Laurales a Ranunculales s potenciálně neuroprotektivní aktivitou. UK v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Hradec Králové 2015.

- [122] Ziyaev R., Arslanova O. N., Abdusamatov A: *N*-Methylaurotetanine and isocorypalmine from *Liriodendron tulipifera*. *Chem. Nat. Compd.*, 22(4), 1986, 490-490.
- [123] Chang F. R. et al.: Two new 7-dehydroaporphine alkaloids and antiplatelet action aporphines from the leaves of *Annona purpurea*. *Phytochemistry*, 49(7), 1998, 2015-2018.
- [124] Kintsurashvili L. G., Vachnadze V. Y.: Alkaloids of *Glaucium corniculatum* and *G. flavum* growing in Georgia. *Chem. Nat. Compd.*, 36(2), 2000, 225-226.
- [125] Páltinean R. et al.: Phytochemical analysis of *Fumaria officinalis* L. (Fumariaceae). *Farmacia*, 64(3), 2016, 409-413.
- [126] Cahlíková L. et al.: Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory compounds from *Eschscholzia californica* (Papaveraceae). *Nat. Prod. Commun.*, 5(7), 2010, 1035-1038.
- [127] Hošťálková A. et al.: Alkaloids from *Peumus boldus* and their acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase and prolyl oligopeptidase inhibition activity. *Nat. Prod. Commun.*, 10(4), 2015, 577-580.