

Univerzita Karlova
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra farmaceutické botaniky

**PŘÍRODNÍ LÁTKY POTENCIÁLNĚ VYUŽITELNÉ V PREVENCI A
LÉČBĚ NĚKTERÝCH
CHRONICKÝCH ONEMOCNĚNÍ**

Habilitační práce

(soubor publikovaných vědeckých prací doplněný komentářem)

V úvodu bych ráda poděkovala především všem spolupracovníkům a studentům z Katedry farmaceutické botaniky (KFB), kteří se podíleli na vzniku této práce. Dále chci poděkovat spolupracovníkům z laboratoře kardiovaskulární farmakologie z Katedry farmakologie a toxikologie, s nimiž dlouhodobě spolupracuji, a kteří se stejně, jako kolegové z KFB, podíleli na vzniku kvalitních publikací, které jsou součástí této práce. Dík patří také ostatním kolegům, kteří jsou jmenovitě uvedeni na přiložených publikacích.

Velice děkuji také své rodině, která mi poskytla především emocionální podporu.

OBSAH

1	Úvod.....	5
2	Oxidační stres a chronická onemocnění.....	8
2.1	Přechodné kovy.....	9
2.2	Interakce přírodních látek s přechodnými kovy.....	10
2.2.1	Flavonoidy	10
2.2.2	Kumariny	13
3	Kardiovaskulární onemocnění	16
3.1	Funkce krevních destiček.....	16
3.2	Vliv vybraných skupin přírodních látek na agregaci krevních destiček	17
3.2.1	Flavonoidy	17
3.2.2	Kumariny	20
4	Alzheimerova choroba	23
4.1	Patofyziologie Alzheimerovy choroby	23
4.2	Současná léčba Alzheimerovy choroby	24
4.3	Přírodní látky potenciálně využitelné v léčbě Alzheimerovy choroby	25
4.3.1	Přírodní inhibitory acetylcholinesterasy a butyrylcholinesterasy	26
4.3.1.1	Alkaloidy.....	27
4.3.1.2	Flavonoidy.....	32
4.3.1.3	Kumariny.....	35
5	Závěr a výhled do budoucna	38
6	Seznam zkratek	42
7	Literatura.....	43
8	Tématické publikace předkladatelky.....	51
8.1	Přímé a nepřímé antioxidační účinky.....	51
8.2	Agregace krevních destiček	52
8.3	Alzheimerova choroba	52

Seznam obrázků

Obrázek 1. Struktury flavonoidů s chelatační aktivitou.

Obrázek 2. Struktury isoflavonů s chelatační aktivitou.

Obrázek 3. Kumariny s antioxidační aktivitou.

Obrázek 4. Flavonoidy s antiagregační aktivitou.

Obrázek 5. Kumariny s antiagregační aktivitou.

Obrázek 6. Galanthaminové alkaloidy a AChE inhibiční aktivitou.

Obrázek 7. Lykorinové alkaloidy s AChE inhibiční aktivitou.

Obrázek 8. Zástupci dalších strukturních typů Amaryllidaceae alkaloidů s AChE inhibiční aktivitou.

Obrázek 9. Alkaloidy izolované z *Hosta plantaginea* s AChE inhibiční aktivitou.

Obrázek 10. Flavonoidy s AChE inhibiční aktivitou.

Obrázek 11. Kumariny s AChE a BChE inhibiční aktivitou I.

Obrázek 12. Kumariny s AChE a BChE inhibiční aktivitou II.

Seznam reakcí

Reakce 1. Fentonova reakce. Analogická reakce probíhá s Cu^+ místo s Fe^{2+} .

1 Úvod

Přírodní látky byly prvními, a po dlouhou dobu i jedinými léčivy, která byla dostupná pro člověka. Ačkoli v mnoha oblastech světa zůstávají různým způsobem upravené části „léčivých“ rostlin primárními prostředky pro léčbu a jejich používání je založeno na tradici, v tzv. „západním světě“ jsou nahrazovány izolovanými účinnými látkami, které jsou jasně chemicky, fyzikálně i farmakologicky charakterizovány (1). I přes to jsou mezi schválenými léčivy i některé standardizované extrakty připravené z „léčivých“ rostlin (2). Přírodní látky jsou předmětem studia farmakognosie, která byla vůbec první farmaceutickou disciplínou uznávanou již v roce 1815. Farmakognosie byla definována jako věda, která se zabývá drogami rostlinného i živočišného původu ve všech aspektech. Po dlouhou dobu byl jediným nástrojem farmakognosie mikroskop, který byl používán především pro kontrolu drog. Vývoj tenkovrstvé chromatografie a později i dalších technik obohatil farmakognosii o možnost izolace a identifikace přírodních látek. Izolace přírodních látek vykazujících požadovanou biologickou aktivitu je založena na tzv. bioassay-guided fractionation, tedy na sledování aktivity u jednotlivých frakcí získaných různými technikami a výběrem té nejaktivnější pro izolaci jednotlivých látek. Pro tento postup izolace je zapotřebí rychlých, ale přesných metod pro měření biologické aktivity, které umožňují testování velkého množství vzorků v krátkém čase. Tento požadavek vedl k vývoji řady metod a další postupy jsou neustále zaváděny. Přírodní látky tedy prozatím zůstávají zdrojem nových léčiv často zejména u biologických účinků, které lze sledovat jednoduchým testem (3). Tento trend je zřejmý především u antibiotik a protinádorových léčiv, kde mezi lety 1981 a 2014 bylo 66 % nových antibiotik a více než 32 % protinádorových léčiv přímo přírodního původu nebo od nich odvozeno (2). Přírodní látky však nejsou pouze zdrojem nových léčiv, ale vzhledem k jejich obsahu v potravinách a nápojích mohou ovlivňovat naše zdraví v pozitivním i negativním smyslu. Asi nejvíce diskutovaným pozitivním účinkem je pravděpodobná prevence kardiovaskulárních a dalších chronických onemocnění polyfenolickými látkami, které jsou obsaženy v ovoci, zelenině, čaji, čokoládě, vínu a dalších potravinách a nápojích (4-7).

Chronická onemocnění jsou v současné době na výrazném epidemiologickém vzestupu. Jsou to onemocnění, která jsou relativně běžná, mají většinou pomalou progresi a souvisí s životním stylem daného jedince. Nárůst těchto chorob je spojován s prodlužující se

průměrnou délkou života v důsledku zavedení účinných hygienických opatření, zlepšení stravy a používání nových účinných léčiv, díky kterým došlo k zastavení šíření nejnebezpečnějších pandemií a epidemií infekčních onemocnění. Pojem chronická onemocnění nahrazuje dříve používaný pojem „nepřenosná chronická onemocnění“, protože výzkum v poslední době ukázal, že i některá chronická onemocnění jsou přenosná, např. viry (karcinom děložního čípku – lidský papilomavirus). Další synonymní pojmy pro tato onemocnění jsou „civilizační onemocnění“ či „onemocnění spojená s životním stylem (8). Poslední dva zmíněné pojmy vycházejí z hlavních rizikových faktorů, které podporují rozvoj těchto onemocnění. Mezi rizikové faktory patří především vysoký krevní tlak, kouření včetně pasivního, obezita lehce prokazatelná vysokým tzv. „body-mass indexem“ (BMI), nedostatek fyzického pohybu, pití velkého množství alkoholu a strava chudá na ovoce a zeleninu, s vysokým obsahem soli a tuků bohatých na nasycené mastné kyseliny (9). Podle statistik Světové zdravotnické organizace je celosvětově chronickým onemocněním přičítáno 60 % ze všech úmrtí. Mezi chronická onemocnění způsobující předčasná úmrtí jsou řazena především kardiovaskulární onemocnění (KVO)(15 %), zhoubné novotvary (9 %), neuropsychiatrické choroby (3,5 %), zahrnující především Alzheimerovu chorobu (AD) a jiné typy demence (1,3 %), a diabetes mellitus (2,3 %)(10). Odborníci Světové zdravotnické organizace vypracovali odhady pro počty úmrtí následkem chronických onemocnění na rok 2030, kde je u AD a jiných typů demencí předpokládán nárůst na 1,4 % (o 180 % oproti roku 2001). U ostatních onemocnění je předpokládán pouze mírný nárůst (11).

Tento přehled je věnován ovlivnění některých aspektů dvou skupin chronických onemocnění a to Alzheimerově chorobě, u které je v budoucnu předpokládán nejvyšší nárůst (12) a kardiovaskulárním onemocněním, která jsou dosud nejčastější příčinou úmrtí ve vyspělých zemích (10). Pro obě skupiny chorob je společným znakem oxidační stres. Zvýšená tvorba reaktivních forem kyslíku a dusíku (RONS) je popisována jako významný faktor ve vývoji všech chronických onemocnění. Stanovení přímé antioxidační aktivity, vylučování volných radikálů, se nejen u přírodních látek dostává do pozadí a v současné době je pozornost věnována spíše nepřímému působení látek, jako je chelatace přechodných kovů, které katalyzují další propagaci volných radikálů, a inhibice enzymů spojených s tvorbou volných radikálů. V souvislosti s AD a KVO jsou v poslední době studie často zaměřeny právě na chelataci přechodných kovů (13-15). Z rostlinných látek je chelatační aktivita je spojována především s polyfenolickými látkami. Dalším významným faktorem v progresi KVO je tvorba

sraženin v krevním řečišti, která může vést k akutnímu infarktu myokardu nebo cévní mozkové příhodě. Některé přírodní látky, jako flavonoidy, jsou známé svou antiagregační aktivitou. Na jedné straně je možné, že právě tyto jejich účinky přispívají k jejich pozitivním vlivům na KVO, jak bylo ukázáno v některých epidemiologických studiích (16, 17). Je také možné, že některé z nich by mohly být v budoucnu také užívány jako léčiva v kombinaci s již používanými látkami, jako je např. kyselina acetylsalicylová. U mnoha těchto látek není zcela objasněn mechanismus účinku, tedy úroveň, na které působí, a proto je této problematice třeba věnovat pozornost. Ovlivnění průběhu AD choroby přírodními látkami je v poslední době velmi intenzivně studováno (18). I když je známo mnoho mechanismů, které mohou průběh tohoto onemocnění ovlivnit, největší množství studií hodnotí především inhibiční schopnosti látek vůči lidským choliesterasám (acetylcholinesterase AChE a butyrylcholinesterase BChE), a to zřejmě proto, že některá z klinicky již využívaných léčiv spadají do této kategorie látek a na testování těchto účinků je vypracována jednoduchá a rychlá metoda. Největší skupinou přírodních látek testovaných na inhibici AChE a BChE jsou alkaloidy. Jednou z látek využívaných v terapii AD je galanthamin, inhibitor AChE ze specifické skupiny alkaloidů rostlin z čeledi Amaryllidaceae. Rostliny z této čeledi tvoří široké spektrum alkaloidů různých strukturních typů, které mají rozdílné inhibiční účinky. Vzhledem k tomu, že do této skupiny látek patří již používané léčivo, je v tomto přehledu věnována pozornost především těmto alkaloidům, ale také řadě nealkaloidních látek.

2 Oxidační stres a chronická onemocnění

Oxidační stres se významně podílí na rozvoji mnoha chronických onemocnění. RONS poškozují biologické systémy, protože reagují s aminokyselinami, proteiny, mastnými kyselinami, lipidy, nukleovými kyselinami a řadou nízkomolekulárních sloučenin (19, 20).

Patogeneze aterosklerózy zahrnuje řadu mechanismů spojených s oxidačním stresem. Zvýšená produkce RONS (superoxidový aniont, alkoxy- a peroxy- radikál, hydroxylový radikál, oxidy dusíku, peroxyinitrit a alkylperoxyinitrit) a následné oxidativní změny na lipidech vedou k rozvoji zánětu a dysfunkci endotelia, která je spojena se zvýšenou agregací destiček umožňující prokoagulaci vedoucí např. k akutnímu infarktu myokardu. Chirurgický nebo farmakoterapeutický zásah, obnovující tok krve, je nezbytný pro obnovu tkáně, ale zároveň je spojen s dalším poškozením, které je způsobeno zvýšeným uvolňováním RONS a volných přechodných kovů, hlavně železa a mědi (21). Vlivu oxidačního stresu na kardiovaskulární onemocnění se podrobně věnuje řada prací (22, 23).

O RONS se mluví také jako o významných faktorech stárnutí a degenerativních onemocnění včetně AD (24, 25). V případě AD bylo prokázáno, že se RONS uplatňují v mnoha fázích rozvoje tohoto onemocnění. Mechanismus, který vede k porušení redoxní rovnováhy a zdroji volných radikálů, však není prozatím zcela objasněn. Velké množství RONS může vznikat mitochondriální dysfunkcí a zvýšenou akumulací přechodných kovů (Fe, Cu) v placích β -amyloidu ($A\beta$). Kromě $A\beta$ i neurofibrilární klubka (neurofibrillary tangles NFTs) vedou také ke zvýšené tvorbě volných radikálů - oxidačnímu stresu, který se podílí na neurotoxicitě těchto útvarů. Samotný oxidační stress rovněž může dále zvyšovat agregaci $A\beta$ a umožňuje další fosforylaci a polymerizaci hyperfosforylovaného τ -proteinu (26). Oxidační stres se v rozvoji neurodegenerativních onemocnění uplatňuje na mnoha úrovních. Těmto procesům je věnována řada prací (20, 26-28).

Antioxidační aktivita látek nezahrnuje pouze přímé vychytávání již vzniklých volných radikálů, ale také chelataci přechodných kovů, které katalyzují vznik volných radikálů, a inhibici enzymů spojených s tvorbou RONS. Některé přechodné kovy nemají redoxní schopnosti, např. zinek, ale mohou se podílet na patogenезi různých onemocnění jiným mechanismem. Spektrum látek s antioxidační aktivitou je velmi široké. Vzhledem k tomu, že význam přímé antioxidační aktivity, která je běžně testována, s objevem dalších účinků spíše ustupuje, jak je patrné u flavonoidů (21), je tato část věnována pouze interakcím přírodních látek

s přechodnými kovy, které se významně podílejí na rozvoji mnoha chronických onemocnění (29, 30).

2.1 Přechodné kovy

Pojem "přechodné kovy" zahrnuje obecně kovové prvky s neúplně obsazeným orbitalem *d*. Z hlediska fyziologie člověka je tento pojem mnohem užší. Největší pozornost je věnována především železu a mědi podílejícím se na Fentonově reakci (Reakce 1), která vede k tvorbě volných radikálů (30, 31). V souvislosti s neurodegenerativními chorobami je zmiňován také zinek (30, 32).



Reakce 1. Fentonova reakce. Analogická reakce probíhá s Cu^+ místo s Fe^{2+} .

Železo je esenciální prvek, který se účastní mnoha životních procesů. V organismu však musí být jeho metabolismus pečlivě regulován z důvodu jeho schopnosti generovat RONS. Homeostáza železa je porušena při mnoha patologických stavech. Jedním z příkladů může být zvýšená hladina volného železa po akutním infarktu myokardu následkem výrazného snížení pH (33). Stejně tak se uplatňuje železo i v rozvoji AD. Zvýšené hladiny volného železa byly zaznamenány v senilních placích i NFTs post mortem u pacientů s AD (29). Také měď hraje významnou roli v lidském organismu. Ve spojení s enzymy se podílí na mnoha životních metabolických procesech. Lokální poruchy homeostázy mědi jsou spojovány s patofyziologií mnoha chorob včetně neurodegenerativních onemocnění, tumorů, zánětlivých onemocnění a infarktu myokardu (34). Zinek je po železu druhý nejhojnější stopový prvek v lidském organismu. Nejvyšší koncentrace zinku je v mozku, kde se vyskytuje v chelatovatelné formě a to především v hipokampu, amygdale a kůře. Jinak se vyskytuje vázaný na mnohé intracelulární enzymy. Zinek se uplatňuje jako modulátor neurotransmise a synaptických funkcí a reguluje mnoho signálních drah. Volný nebo slabě vázaný zinek je klíčový faktor neuronální smrti spojené s ischemií a s neurodegenerativními stavy, jako je např. tvorba senilních plaků při AD (32). I když není v případě AD zcela jasné, zda je zvýšené množství těchto kovů příčinou oxidačního stresu a neurodegenerace nebo se jedná o vedlejší produkty těchto procesů, výsledky studií ukazují na příznivý vliv chelátorů na průběh tohoto onemocnění, který je asi dán solubilizací amyloidních plaků, tj. zvýšením rozpustnosti těchto plaků chelatací v nich přítomných kovů (35).

2.2 Interakce přírodních látek s přechodnými kovy

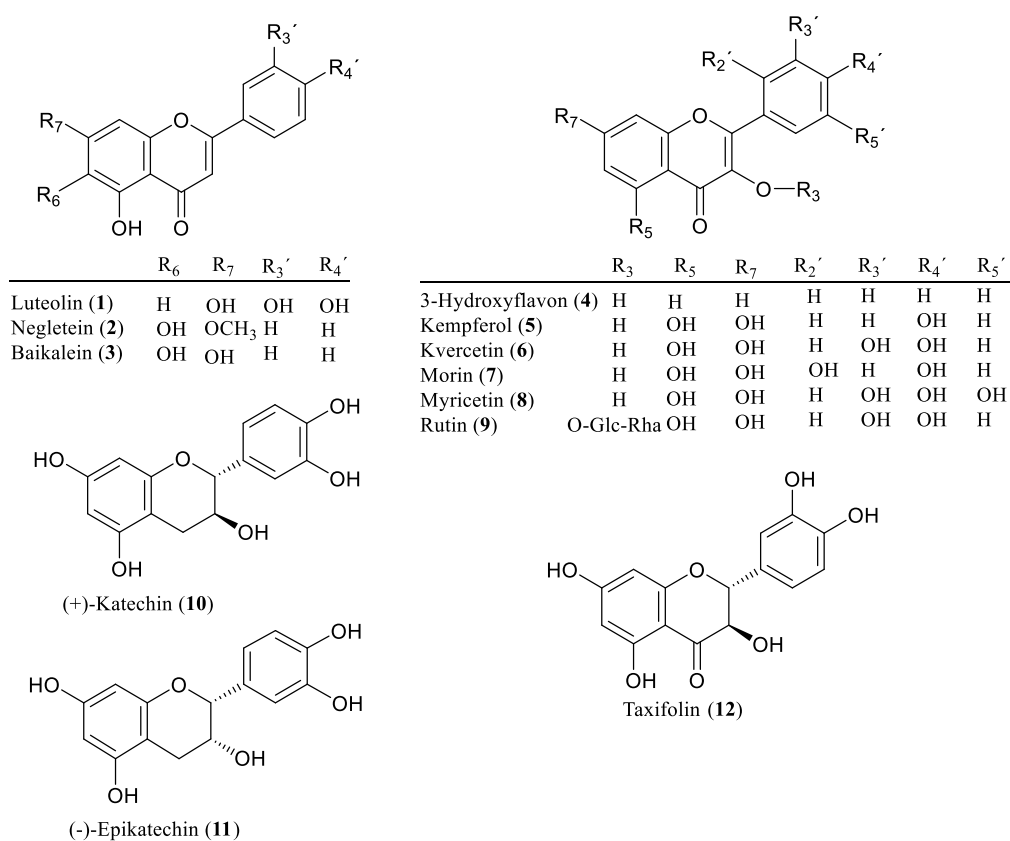
Chelatace přechodných kovů je jedním z mechanismů účinků antioxidantů. Tato aktivita je spojována především s polyfenolickými látkami, z nichž jsou na prvním místě flavonoidy, které jsou běžnou součástí stravy. Studie hodnotící závislost železo-chelatační aktivity na celkovém obsahu polyfenolů a flavonoidů ve vybraných extraktech z léčivých rostlin však ukázala, že tato závislost je poměrně nízká (36). U některých rostlin byla chelatační aktivita nízká i přes vysoký obsah polyfenolů. Jak vyplývá z následujících studií, je tato aktivita velmi závislá na struktuře. U flavonoidů jsou již jasně definovány strukturní požadavky, tedy chelatační místa. U dalších skupin přírodních látek tomu tak není. Dalšími testovanými látkami jsou kumariny. Bohužel prozatím nebylo testováno příliš přírodních látek z této skupiny. Závislost aktivity na struktuře však lze odvodit ze studií se syntetickými látkami a poté aplikovat na látky přírodní (13, 37). Flavonoidy, stejně jako jiné polyfenolické látky, jsou v lidském těle rychle metabolisovány, a proto je třeba zaměřit se nejen na látky samotné, ale i jejich metabolity (38). Existují ale také možnosti, jak zvýšit biologickou dostupnost parentních polyfenolických látek. Příkladem je inkorporace těchto látek do lipidních nanočástic, které je ochrání a umožní transport do místa potřeby v nezměněné formě (39). Mezi přírodní antioxidanty patří kromě již zmíněných skupin látek také další polyfenolické látky jako jsou fenolové kyseliny, třísloviny, lignany a stilbeny dále karotenoidy a některé vitaminy (40). Vzhledem k zaměření mé experimentální práce však není těmto látkám věnována v tomto přehledu pozornost.

Některé přírodní látky ze zmiňovaných skupin jsou také schopny redukovat přechodné kovy, což vede k zintenzivnění Fentonovy reakce, tedy ke zvýšené produkci volných radikálů. V průběhu Fentonovy reakce dvojmocné železo katalyzuje produkci hydroxylového radikálu, zatímco je oxidováno na železo trojmocné a proto činidlo redukující železo umožňuje jeho opakovaný vstup do této reakce. Podobná reakce byla popsána i u mědi. Tento proces je považován za jeden z mechanismů prooxidačního působení některých polyfenolů (41).

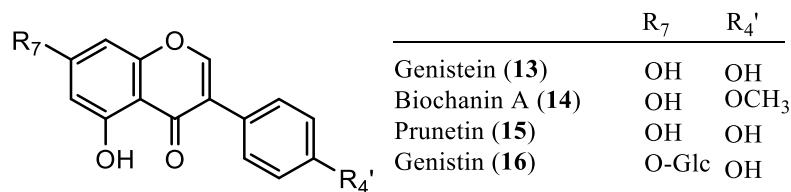
2.2.1 Flavonoidy

Závislost železo-chelatační aktivity flavonoidů na struktuře byla popsána v mnoha studiích, jak uvádí i přehledové práce (21, 42). I když výsledky mnoha studií jsou těžko porovnatelné, protože medium má velký vliv na výsledky (např. pH, hydrofilní x lipofilní prostředí), jsou díky velkému množství výsledků vazebná místa pro kovy u flavonoidů jasně definována. Jedná se o vazebná místa mezi 5-hydroxyl- a 4-karboxylovou skupinou, 3-hydroxyl- a 4-karboxylovou

skupinou a mezi 3',4'-dihydroxylovou skupinou na kruhu B (21). V naší studii (15) bylo testováno 26 flavonoidů různých strukturních typů při čtyřech pato/fyziologických pH (4,5; 5,5; 6,8 a 7,5). V neutrálním prostředí je většina flavonoidů schopna chelátovat železo. Látky s hydroxylovými skupinami v *o*-poloze na kruhu A nebo B a/nebo 3-hydroxylovou skupinou (obr. 1) dosahovaly účinnosti standardního chelátoru deferoxaminu. Flavonoidy bez katecholového B kruhu byly signifikantně méně účinné. Při pH 5,5 dosahoval účinnosti deferoxaminu v chelataci železnatých iontů pouze baikalein, stejně jako při nejnižším pH. U flavonoidů s katecholovým B kruhem dochází při poklesu pH ke snížení aktivity. Vytvořené komplexy byly v neutrálním prostředí stabilní, stejně jako komplex baikaleinu s železnatými ionty při pH 4,5. Ze 13 testovaných isoflavonů chelatovaly železo pouze ty, které mají ve své struktuře 5-hydroxy-4-ketoskupinu (obr. 2, genistein (látka č. 13), biochanin A (látka č. 14), prunetin (látka č. 15) a genistin (látka č. 16)). Tato aktivita je však poměrně nízká (43).



Obrázek 1. Struktury flavonoidů s chelatační aktivitou.



Obrázek 2. Struktury isoflavonů s chelatační aktivitou

Flavonoidy testované ve zmíněné studii byly podrobeny i testování měď-chelatačních účinků pomocí dvou metod. V mírně kompetitivním prostředí byla většina flavonoidů schopna chelatovat měďnaté ionty. Mezi neaktivnější patří flavony luteolin a baikalain a flavonol myricetin s aktivitou vyšší než u trientinu, standardního chelátoru mědi. Ve více kompetitivních podmínkách byly schopny chelatovat měďné i měďnaté ionty pouze flavony a flavonoly. Pro stabilní chelataci je důležitá především dvojná vazba mezi C-2 a C-3. Neaktivnějšími měď chelatačními místy u flavonů jsou 3-hydroxy-4-ketoskupina a 5,6,7-trihydroxyskupina. V kyselém prostředí byly 3-hydroxyflavon (Obr.1, látka č.4), kempferol (Obr.1, látka č.5) a baikalain (Obr.1, látka č.3) účinnější než trientin. V neutrálních podmínkách nedosahoval účinnost standardu žádný flavonoid. Detailní popis závislosti aktivity na struktuře je uveden v naší studii (14). Stejně jako v případě chelatace železa, tak i u měďnatých iontů bylo potvrzeno, že nejdůležitější strukturou pro chelataci u isoflavonů je 5-hydroxy-4-ketoskupina. U isoflavonů nedosahuje však chelatace měďnatých iontů významných hodnot (43).

Ve srovnání s železo a měď chelatační aktivitou je počet studií zabývajících se chelatací zinku flavonoidy výrazně nižší. Zinek se váže na 3- nebo 5-hydroxy-4-keto skupinu či katecholický kruh (44). Flavonoly (+)-katechin (Obr.1, látka č.10) a (-)-epikatechin (Obr.1, látka č.11) jsou schopny chelatovat zinek, který je volně v roztoku (ZnCl₂) stejně jako vyvázat zinek z komplexu Zn-zinquin (45). Dá se tedy očekávat, že i další flavonoidy budou schopny chelatovat ionty zinku. Nedostatek těchto dat je zřejmě dán absencí jednoduché metody pro stanovení této aktivity. V minulém roce pracovní skupina, se kterou spolupracuji, publikovala jednoduchou metodu pro stanovení zinek chelatační aktivity, která umožní rychlé, ale přesné testování většího množství vzorků (46).

V další studii byly hodnoceny železo-redukční schopnosti flavonoidů a možný podíl této vlastnosti na intenzitě Fentonovy reakce (tvorbu hydroxylového radikálu). Nejvyšší redukce byla zaznamenána při pH 4,5. Z výsledků vyplývá, že pozice hydroxylových skupin je důležitější

než jejich celkový počet. Sousedící hydroxylové skupiny, obzvláště katecholový B kruh bez 4-ketoskupiny mají velký vliv na redukční vlastnosti. Železo není redukováno v případě izolovaných 3-, 5-, 7-hydroxyskupin, 5,7-dihydroxyskupin současně s dvojnou vazbou mezi C-2 a C-3, absence katecholového B kruhu nebo 3-hydroxyskupiny. Redukční schopnost je velmi závislá na koncentraci. Křivka aktivity má obvykle zvonovitý tvar u látek, které jsou schopny chelatovat železo, s maximálním redukčním potenciálem při různých poměrech flavonoid/železité ionty. Při pH 5,5 dochází pouze k velmi slabé redukci a při vyšších pH již k redukci nedochází vůbec. Nejúčinnějšími reduktanty byly flavanoly (+)-katechin (Obr.1, látka č. 10) a (-)-epikatechin (Obr.1, látka č.11). Po zjištění redukčních vlastností flavonoidů byla také testována schopnost indukce tvorby hydroxylového radikálu Fentonovou reakcí. Podle aktivity můžeme flavonoidy rozdělit do několika skupin:

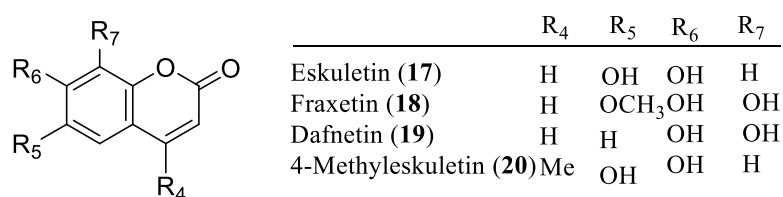
- a) čisté antioxidanty (7-hydroxyflavon, hesperetin) – jejich antioxidační aktivita roste s jejich koncentrací,
- b) antioxidanty s nízkou aktivitou (3-hydroxyflavon (Obr.1, látka č.4), taxifolin (Obr.1, látka č.12) a daidzein)
- c) látky, které při nízké koncentraci měly mírný antioxidační efekt, při poměru cca 1:1 byly výrazně prooxidační a s dalším zvyšováním koncentrace docházelo ke snížení prooxidačního účinku až k mírné antioxidaci (kempferol (Obr.1, látka č.5), kvercetin (Obr.1, látka č.6), chrysin)
- d) čisté prooxidanty (morin (Obr.1, látka č.7), rutin (Obr.1, látka č.9), naringin, genistein (Obr.2, látka č.13)), tj. látky, kdy se prooxidační účinek stupňuje s jejich zvyšující se koncentrací
- e) a flavonoidy, které neměly žádný efekt na tvorbu hydroxylového radikálu (flavanoly) (41).

Isoflavony nejsou obecně schopny redukovat železité ionty, ale látky s 4'-hydroxyskupinou na kruhu B jsou schopny redukovat měďnaté ionty (43). Jejich vliv na Fentonovu reakci jsme zatím netestovali, ale v současné době připravujeme citlivou metodiku, která jejich testování umožní.

2.2.2 Kumariny

Vzhledem k tomu, že většina prací s kumariny, studující vztah mezi aktivitou a strukturou, je zaměřena nejen na přírodní, ale také na syntetické deriváty kumarinů, není možné tyto dvě

skupiny oddělit. Obecně je možné shrnout, že kumariny mající ve své struktuře *orto*-dihydroxy nebo *orto*-diacetoxyskupinu jsou schopny chelatovat železo, zatímco látky s jednou hydroxylovou skupinou, dvěma methoxyskupinami, nebo hydroxy-/acetoxyskupiny v *meta*-poloze jsou prakticky neaktivní (13, 47). *Orto*-dihydroxy-4-methylkumariny a *orto*-diacetoxi-4-methylkumariny brání iniciaci a propagaci peroxidace lipidů indukovanou železem. Nejvyšší aktivitu vykazují kumariny s 7,8-dihydroxyskupinou na kruhu B (48). Výsledky této studie jsou ve shodě s naší studií, kde byla testována poměrně velká skupina syntetických 4-methylkumarinů a přírodních kumarinů. Žádný z přírodních kumarinů nevykázal železo-chelatační aktivitu. Ze skupiny 4-methylkumarinů byl opět nejaktivnější 7,8-dihydroxy-4-methylkumarin, který při pH 7,5 dosahoval aktivity deferoxaminu. S klesajícím pH všechny kumariny ztrácejí svoji aktivitu, zatímco deferoxamin je aktivní ve všech podmínkách (13). Thuong et al. (49) testoval 21 přírodních kumarinů na antioxidační aktivitu. Z výsledků vyplývá, že látky mající ve své struktuře katecholovou skupinu (eskuletin (Obr.3, látka č.17), fraxetin (Obr.3, látka č.18) a dafnetin (Obr.3, látka č.19)), jsou schopny ochrany proti železem indukované peroxidaci lipidů. 6,7-Dihydroxykumarin eskuletin a 4-methyleskuletin (látka č. 20 na obr. 3) inhibují Fentonovu reakci indukovanou železem (50). Stejně jako pro chelataci železa i pro chelataci mědi platí, že kumariny s *orto*-dihydroxy nebo *orto*-diacetoxyskupinu jsou schopné chelatace, ale pouze za mírně kompetitivních podmínek, zatímco za vysoce kompetitivních podmínek nejsou schopny měď chelatovat. *Orto*-dihydroxykumariny mají také schopnost redukovat měďnaté ionty na měďné (51).



Obrázek 3. Kumariny s antioxidační aktivitou.

Některé kumariny jsou považovány za účinné antioxidanty, a to na základě tzv. FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) testu (52). Tato metodika ale měří antioxidační účinky podle míry redukce železa, a proto mohou být její výsledky zavádějící a naopak tyto

antioxidanty mohou mít za následek intenzifikaci Fentovy reakce a tím i zvýšenou produkci volných radikálů, jak je to popsáno např. u některých flavonoidů (41).

3 Kardiovaskulární onemocnění

Kardiovaskulární choroby (KVO) jsou veškerá onemocnění srdce a cév. Jsou to onemocnění, která, jak bylo uvedeno výše, způsobují nejvíce úmrtí ve vyspělých zemích. Podle statistiky American Heart Association (53) je jedno ze tří úmrtí v USA způsobeno KVO a jedno ze šesti ischemickou chorobou srdeční, která je nejčastější z KVO. Většina KVO má souvislost s aterosklerotickými degenerativními změnami cév. Mezi tato onemocnění patří, kromě již zmíněné ischemické choroby srdeční, také ischemická choroba dolních končetin, či ischemické cévní mozkové příhody. Rizikové faktory těchto onemocnění jsou obecně známé, jak bylo uvedeno výše (9). Jsou to rizikové faktory spojené s životním stylem a jsou většinou ovlivnitelné. Jedním z možných preventivních opatření je úprava stravy zahrnující snížení obsahu soli a tuků bohatých na nasycené mastné kyseliny a především zvýšený příjem ovoce a zeleniny, které má pravděpodobně pozitivní vliv na omezení výskytu KVO (4). Tento pozitivní vliv je připisován polyfenolickým látkám, které jsou v ovoci a zelenině přítomny ve významném množství. Polyfenoly jsou známé především přímou i nepřímou antioxidační aktivitou, ale mají i jiné účinky, jako je např. antiagregační aktivita, vazodilatační a protizánětlivý potenciál (21).

3.1 Funkce krevních destiček

Hemostáza je odpověď organismu na poranění cévy. Je to fyziologický proces, který má několik fází: vazokonstrikci, primární hemostázu a sekundární hemostázu. Tyto fáze se mohou časově částečně překrývat a probíhat tak téměř současně. Vazokonstrikce se objevuje okamžitě po poranění cévy. Stažení cévy snižuje průtok krve a tím krevní ztráty. Cílem primární hemostázy je vytvoření primární zátky, která rychle stabilizuje poranění cévy - zde se uplatňují krevní destičky. V první fázi dochází k adhezi destiček na poraněnou část cévy, dále k jejich aktivaci, kdy dochází k uvolňování thromboxanu A_2 (TxA_2) a ADP a tím aktivaci dalších destiček. V průběhu sekundární hemostázy, známé jako koagulační kaskáda, dochází k vlastní hemokoagulaci a vytvoření trvalé zátky. Tento proces musí být citlivě regulován, aby nedošlo k uvolnění sraženiny (54). U pacientů s aterosklerózou dochází k poškození cév, jejichž stěny jsou méně pružné, endotel má sníženou schopnost produkovat protektivní působky, a tím snáze nastává zvýšená tvorba sraženin, které mohou způsobit např. akutní infarkt myokardu nebo cévní mozkovou příhodu (55). V současnosti se u rizikových pacientů uplatňuje antiagregační léčba založená na inhibici cyklooxygenasy 1 (COX-1) kyselinou acetylsalicylovou

(ASA) a/nebo antagonismu na ADP receptorech. Někteří pacienti jsou však k této léčbě rezistentní. V minulosti bylo prokázáno, že kombinace některých látek s výše uvedenou léčbou přináší lepší výsledky, a proto je hledání látek s jiným mechanismem účinku v popředí zájmu (56, 57).

3.2 Vliv vybraných skupin přírodních látek na agregaci krevních destiček

Studium přírodních látek s antiagregační aktivitou se soustřeďuje především na polyfenolické látky, hlavně flavonoidy a kumariny, případně třísloviny, které jsou běžnou součástí stravy. Látky s touto aktivitou však můžeme nalézt v širokém spektru přírodních sloučenin, např. mezi alkaloidy, monoterpeny, diterpeny, seskviterpeny, lignany, fenolickými kyselinami, organickými sirnými sloučeninami (58), steroidní laktony (59), polysacharidy a peptidy (60).

Příznivý vliv polyfenolů na kardiovaskulární systém již byl zmíněn. Jak bylo rovněž uvedeno, tak kromě antiagregační aktivity jsou také schopny rozšiřovat cévy, tlumit zánět a různými mechanismy snižovat riziko rozvoje aterosklerózy.

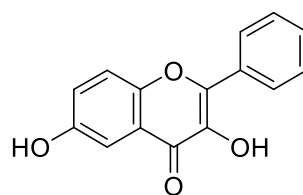
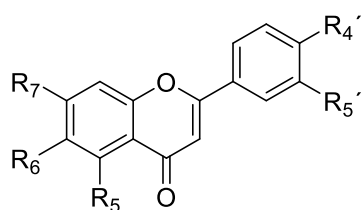
Agregace destiček může být ovlivněna různými mechanismy. Nejčastěji je studována inhibice agregace indukovaná různými aktivátory krevních destiček, jako jsou kyselina arachidonová (AA), thrombin, kolagen, ADP, destičky aktivující faktor (PAF) nebo agonista thromboxanových receptorů U-46619. Dále je studována inhibice aktivity enzymů, které ovlivňují agregaci na různých úrovních, mezi které patří např. COX-1, thromboxansynthasa, lipooxygenasa, fosfodiesterasa nebo destičková fosfolipasa C a další (58). Některé z těchto enzymů se uplatňují v metabolismu kyseliny arachidonové. Porovnání výsledků jednotlivých studií je velmi obtížné vzhledem k rozdílným podmínkám měření (různá koncentrace aktivátorů destiček, standardů, použití celé krve, plazmy bohaté na destičky, čistěné destičky, časté testování pouze jedné koncentrace látek).

3.2.1 Flavonoidy

Vliv flavonoidů na agregaci destiček je velmi často studován a to jak *in vitro*, tak *in vivo*. Struktury flavonoidů, které vykazují antiagregační aktivitu, jsou uvedeny na obr. 4. Byla provedena řada studií hodnotících účinek různých potravin bohatých na flavonoidy, jako je třeba kakao (čokoláda), šťáva z hroznového vína, pomerančů, grapefruitů nebo kiwi, cibule a další. U některých bylo potvrzeno, že pravidelný příjem těchto potravin způsobuje významné snížení agregace (61). Přestože výsledky některých studií poukazují na to, že agregace je

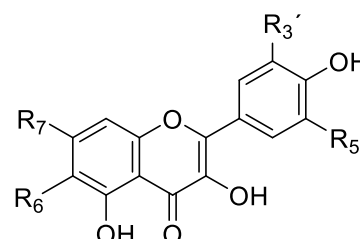
inhibována až u nefyziologických koncentrací fenolických látek (62), tak Bojić (63), který testoval široké spektrum flavonoidních aglykonů na inhibici agregace destiček indukovanou ADP, prokázal, že některé flavonoidy jsou schopny signifikantní inhibice i při velmi nízkých koncentracích. Minimální antiagregační koncentrace (MINaAC) byla u neaktivnější látky, syringetinu (Obr. 4 – látka č. **21**), 0,119 μM . Studie, které hodnotily dostupnost flavonoidů (jejich dosažitelnou koncentraci v plazmě), uvádějí koncentrace až ve stovkách nM či jednotkách μM u jednotlivých flavonoidů (64, 65). MINaAC testovaných látek se pohybovaly v rozmezí 0,119-122 μM . Mezi nejúčinnější látky patřil kromě již zmíněného syringetinu, isosakuranetin (Obr. 4 – látka č. **22**), pinocembrin-7-methyleter (Obr. 4 – látka č. **23**), 6-hydroxyflavon (Obr. 4 – látka č. **24**), tektochrysin (Obr. 4 – látka č. **25**), 3,6-dihydroxyflavon (Obr. 4 – látka č. **26**) a rhamnetin (Obr. 4 – látka č. **27**), jejichž MINaAC byla nižší než 1 μM . Na základě výsledků byly nalezeny důležité vztahy mezi strukturou a aktivitou, které zahrnují vliv dvojnásobné vazby mezi C-2 a C-3 na kruhu C, přítomnost hydroxyskupiny v poloze C-3, která zvyšuje aktivitu, substituce v poloze C-6 na kruhu A, která také zvyšuje aktivitu stejně jako O-methylace na kruzích A a B. Zásadní je také karbonylová skupina v poloze C-4. Poloha kruhu B má také významný vliv. Isoflavony jsou výrazně méně aktivní než flavony s obdobnou strukturou. Tyto strukturální požadavky byly potvrzeny i v další studii, kde byly společně s aglykony testovány i některé jejich glykosidy. Z této studie také vyplývá, že přítomnost cukerné složky glykosidu mírně snižuje antiagregační aktivitu, která byla testována stejně jako v předchozí studii (66). Velmi nízká aktivita glykosidů byla zjištěna i v naší studii, kde bylo z *Leuzea carthamoides* L (Asteraceae) izolováno několik flavonoidů, které byly testovány na inhibici agregace indukované AA, ADP, kolagenem a thrombinem. Aglykony eriodiktyol (Obr. 4 – látka č. **28**) a patuletin (Obr. 4 – látka č. **29**) inhibovaly pouze agregaci indukovanou kolagenem a AA. Aktivita je však v porovnání s ASA nízká (67). U některých aktivních látek jsou již k dispozici studie, které podrobněji popisují jejich mechanismus účinku. Rutin (Obr. 1 – látka č. **9**), i přes to, že se jedná o glykosid, vykazuje v porovnání s různými flavonoidy poměrně vysokou aktivitu, která zahrnuje více mechanismů. Rutin je schopen inhibovat aktivaci fosfolipasy C a následně inhibovat protein kinasu C a tvorbu TxA_2 vedoucí k inhibici fosforylace P47 a mobilizaci Ca^{2+} což vede k inhibici agregace destiček (68). Další látkou, u které byl sledován mechanismus účinku, byl hesperetin (Obr. 4 – látka č. **30**), který inhibuje agregaci indukovanou kolagenem a AA. Antiagregační aktivita hesperetinu je způsobena inhibicí fosforylace fosfolipasy C a účinku COX-1 (69). Slibnou inhibiční aktivitu vykázal extrakt

z *Artemisia princeps* Pampanini (Asteraceae) a dva flavonoidy z něho izolované. Byly aktivní pouze u agregace indukované AA, zatímco u kolagenu a ADP nevykázaly žádnou aktivitu. Flavonoidy eupatilin (Obr. 4 – látka č. **31**) a jaceosidin (Obr. 4 – látka č. **32**) snižovaly tvorbu TxA₂ (70). V další studii provedené v naší laboratoři byl testován zásah 29 flavonoidů do kaskády kyseliny arachidonové. Pro inhibici COX-1 byla zásadní přítomnost kruhu B v poloze 3 a zároveň 7-hydroxyskupiny, jak je tomu u isoflavonů genisteinu (Obr. 2 – látka č. **13**) a daidzeinu (Obr. 4 – látka č. **33**), zatímco nahrazení 7-OH skupiny glukosou nemělo vliv na antagonistický účinek na tromboxanových A₂ receptorech (apigenin (Obr. 4 – látka č. **34**) vs. apigenin-7-glukosid (Obr. 4 – látka č. **35**)). Poloha kruhu B na tento efekt také neměla vliv (genistein (Obr. 2 – látka č. **13**) vs. apigenin (Obr. 4 – látka č. **34**)). Žádná z testovaných látek neinhibovala tromboxansyntasu ve farmakologicky dosažitelných koncentracích. Nejméně aktivními inhibitory byly apigenin, 7-hydroxyflavon (Obr. 4 – látka č. **36**) a epikatechin (Obr. 4 – látka č. **11**) (71). Další naše studie zaměřená na antiagregační aktivitu isoflavonů a jejich 2 komerčně dostupných metabolitů ukázala, že pro inhibici AA indukované agregace je důležitá přítomnost 7,4'-hydroxyskupiny. Nahrazením jedné nebo obou těchto volných OH-skupin methoxyskupinou dojde ke snížení aktivity, vazba glukosy v poloze 7 pak způsobí téměř úplnou ztrátu aktivity. Přítomnost 5-hydroxyskupiny nebo 4-methoxyskupiny zvyšuje inhibici agregace v případě, že jsou ve struktuře zároveň se 7- nebo 5-hydroxyskupinou. Aktivní inhibitory AA indukované agregace byly podrobeny testovní vlivu na jednotlivé kroky kaskády AA. Při koncentraci 200 μM vykazaly COX-1 (ovčí) inhibiční aktivitu srovnatelnou s ASA genistein (**13**) a glycitein (**37**) zatímco při nižších koncentracích byly glycitein a tectorigenin (**38**) aktivnější než ASA. V případě použití lidské destičkové COX-1 byla však aktivita výrazně nižší, takže tento stupeň kaskády AA nemá pravděpodobně vliv na antiagregační aktivitu, která byla pozorována v plné krvi. Žádná z testovaných látek nevykázala inhibici vůči tromboxansyntase. Nejúčinnějším inhibitorem agregace indukované agonistou tromboxanových receptorů U46619 byl tectorigenin (72). Podrobný výpis možných mechanismů antiagregační aktivity flavonoidů je např. v přehledu El Haouariho a Rosada (73).

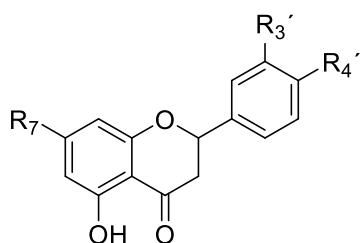


3,6-Dihydroxyflavon (26)

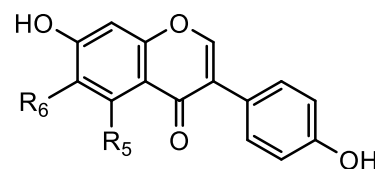
	R ₅	R ₆	R ₇	R ₄ '	R ₅ '
6-Hydroxyflavon (24)	H	OH	H	H	H
Tektochrysin (25)	OH	H	OCH ₃	H	H
Jaceosidin (32)	OH	OCH ₃	OH	OH	OCH ₃
Eupatilin (31)	OH	OCH ₃	OH	OH	OH
7-Hydroxyflavone (36)	H	H	OH	H	H
Apigenin (34)	OH	H	OH	OH	H
Apigenin-7-glukosid (35)	OH	H	O-Glc	OH	H



	R ₆	R ₇	R ₃ '	R ₅ '
Syringetin (21)	OCH ₃	OH	OCH ₃	OCH ₃
Rhamnetin (27)	H	OCH ₃	OH	H
Patuletin (29)	H	OH	OH	H



	R ₇	R ₃ '	R ₄ '
Isosakuranetin (22)	OH	OCH ₃	H
Pinocembrin-7-methyleter (23)	OCH ₃	H	H
Eriodiktyol (28)	OH	OH	OH
Hesperetin (30)	OH	OH	OCH ₃



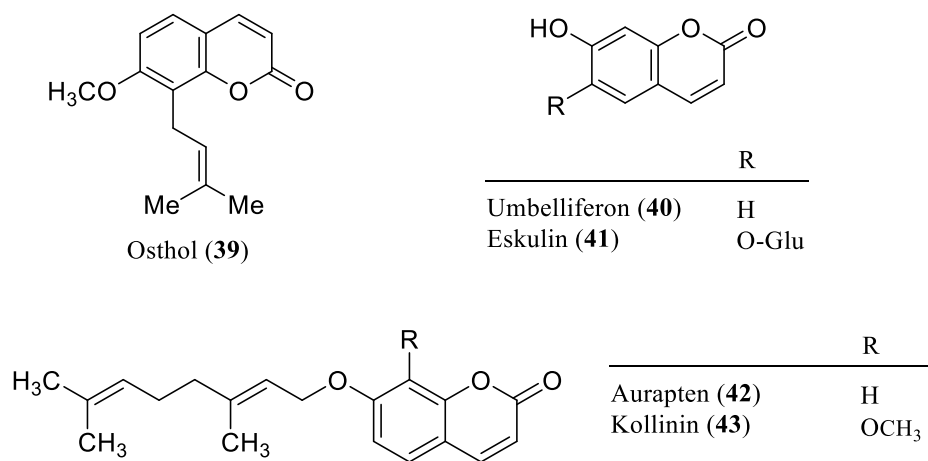
	R ₅	R ₆
Daidzein (33)	H	H
Glycitein (37)	H	OCH ₃
Tektorigenin (38)	OH	OCH ₃

Obrázek 4. Flavonoidy s antiagregační aktivitou.

3.2.2 Kumariny

Z přírodních kumarinů byla testována řada látek izolovaných především z rostlin čeledí Apiaceae a Rutaceae (74, 75). Tyto látky byly velmi rozmanité struktury a byly testovány různými metodami a není proto možné jednoznačně formulovat strukturní požadavky nutné pro antiagregační aktivitu a také porovnat jejich aktivitu. Na rozdíl od flavonoidů zde také nebyl obvykle testován možný mechanismus tohoto účinku. Látky byly testovány *in vitro* pomocí metod, které využívají různé látky, které indukují agregaci destiček (AA, kolagen, thrombin, PAF). Chemické struktury některých aktivních kumarinů jsou uvedeny na obr. 5. V naší studii, kde byla testována řada syntetických 4-methylkumarinů a čtyři přírodní kumariny, nebylo u přírodních látek dosaženo vysoké aktivity u žádného z použitých agonistů agregace. Z přírodních kumarinů byl neaktivnější skopoletin (AA, kolagen), nižší aktivitu

vykázal umbelliferon a ostatní látky byly neaktivní. Ze syntetických derivátů byly neaktivnější 5,7-dihydroxy-4-methylkumariny, které dosáhly účinku ASA při AA indukované agregaci. Tyto látky jsou kompetitivní antagonisté thromboxanových A₂ receptorů a současně inhibitory COX-1 (76). Osthol (Obr. 5 – látka č. 39), kumarin z *Angelica pubescens* Maxim. (Apiaceae), rostliny, která je využívána v čínské medicíně, inhibuje agregaci destiček a snižuje produkci TxA₂. Má také vazorelaxační účinek. Inhibiční aktivita vůči agregaci destiček byla popsána také u některých dihydrofurano- a dihydropyranokumarinů z miříkovitých rostlin, které inhibovaly fosfodiesterasu a ovlivňovaly vstup vápníku do destiček, čímž může dojít k ovlivnění agregace (77). Dva kumariny izolované z listů *Murraya omphalocarpa* Hayata (Rutaceae), minumikrolin acetonid a epimurpanikulol, inhibovaly agregaci destiček indukovanou AA a kolagenem, minumikrolin acetonid dokonce i PAF indukovanou agregaci (78). Umbelliferon (Obr. 5 – látka č. 40), eskuletin (Obr. 3 – látka č. 17) a jeho glykosid eskulin (Obr. 5 – látka č. 41) byly testovány na inhibici destičkové lipoxygenasy a COX-1. Eskuletin inhiboval tyto dva enzymy s IC₅₀ 0,65 μM a 0,45 mM. Z hlediska mechanismu šlo o nekompetitivní inhibici lipoxygenasy. Další dva kumariny inhibovaly pouze lipoxygenasu (79). Chen et al. (74) izoloval z kůry *Zanthoxylum schinifolium* Siebold & Zucc. (Rutaceae) 13 kumarinů, z nichž některé byly testovány na antiagregační aktivitu indukovanou AA, kolagenem a PAF. Při testované koncentraci 100 μg.ml⁻¹ některé látky inhibovaly zcela agregaci indukovanou AA (schinikumarin, acetoxaurapten, schiniallylol, aurapten, kollinin a acetoxykollinin). Aurapten (Obr. 5 – látka č. 42) a kollinin (Obr. 5 – látka č. 43) zcela nebo téměř zcela zabránily agregaci i při poloviční koncentraci. Všechny zmíněné látky kromě schiniallylolu a schinikumarinu zcela inhibovaly také agregaci indukovanou kolagenem a PAF. V této studii není uvedena aktivita žádné standardní látky (74). Některé angulární pyranokumariny z 26 kumarinů izolovaných z *Peucedanum formosanum* Hay. (Apiaceae) byly také podrobeny testu inhibice agregace indukované AA, kolagenem, thromboxanem a PAF. Žádný z testovaných kumarinů nebyl aktivní vůči AA a thromboxanem indukované agregaci, ale isosamidin a (+)-*cis*-3'-acetoxo-4'-(2-methylbutyroxyloxy)-3',4'-dihydroseselin při nejvyšší testované koncentraci zcela inhibovaly agregaci indukovanou kolagenem a (-)-*cis*-3'-isovaleryl-4'-senecoylehellakton a (+)-*cis*-3'-acetoxo-4'-(2-methylbutyroxyloxy)-3',4'-dihydroseselin agregaci indukovanou PAF a dosahovaly tak účinku ASA. Při poloviční koncentraci již byla aktivita nižší než u ASA, ale i přes to stále poměrně vysoká (75).



Obrázek 5. Kumariny s antiagregační aktivitou.

4 Alzheimerova choroba

Alzheimerova choroba je závažné neurodegenerativní onemocnění, které vzhledem ke stárnutí populace postihuje stále více lidí. Jak již bylo uvedeno v úvodu, u tohoto onemocnění je předpokládán poměrně velký nárůst – v roce 2030 by podle odhadů mělo být 1,4 % úmrtí způsobeno touto chorobou (tj. nárůst o 180 % oproti roku 2001 (12)). AD se projevuje zejména poruchami paměti, se kterými souvisí i další kognitivní poruchy týkající se učení a intelektu. U pacientů s AD se vyskytuje mnoho neuropatologických změn, které jsou pro toto onemocnění typické. Hlavními známými znaky jsou senilní extracelulární plaky tvořené fibrilárním peptidem A β , které jsou obklopeny reaktivními astrocyty, aktivovanými mikroglie a poškozenými neurony, a intracelulární NFTs, která jsou tvořena hyperfosforylovaným τ -proteinem. Plaky a NFTs jsou přítomny především v těch oblastech mozku, které jsou zodpovědné za učení, paměť a emocionální chování. Nejvíce jsou zahrnuty neuronální dráhy, ve kterých působí jako neurotransmitter acetylcholin. Součástí tohoto patologického stavu je zvýšená tvorba RONS a sterilní zánět (18, 80). Genetické rizikové faktory uvádí ve svém přehledu (81). Podle databáze AlzGene bylo provedeno přes 1000 studií, které hodnotily genetické variace související se zvýšeným rizikem AD. V těchto studiích bylo zkoumáno téměř 700 různých genů. Nejčastěji jsou se zvýšeným rizikem AD spojovány poruchy metabolismu amyloidního prekurzorového proteinu (APP), polymorfismus apolipoproteinu E4 a mutace presenilinu 1 a 2. Všechny tyto poruchy jsou spojovány především s tvorbou peptidu A β složeného ze 42 aminokyselin, který je součástí senilních plaků (80). Genetické faktory jsou řazeny mezi neovlivnitelné stejně jako pohlaví (u žen je vyšší riziko). Zvýšené riziko je spojováno také s některými jinými chorobami, jako jsou kardiovaskulární onemocnění, diabetes 2. typu, deprese, ale také s traumaty mozku. Dále jsou uváděny vlivy stravy (např. vyšší příjem antioxidantů snižuje riziko AD), fyzické aktivity (nízká aktivita zvyšuje riziko AD), spánku (chronický nedostatek spánku zvyšuje riziko AD), vzdělání (nižší úroveň vzdělání zvyšuje riziko AD)(81).

4.1 Patofyziologie Alzheimerovy choroby

AD je komplexní onemocnění, jehož vznik není prozatím objasněn. Existuje řada neuropatologických změn, jejichž znalost vedla ke dvěma obecně uznávaným teoriím: amyloidní a cholinergní. Podle amyloidní hypotézy dochází k ukládání A β , který je nejčastěji

složen ze 42 aminokyselin (A β 42) a tím tvorbě senilních plaků. A β se zřejmě následně podílí na degeneraci neuronálního τ -proteinu. Hyperfosforylace tohoto proteinu má za následek poruchu stavby mikrotubulů a následně tvorbu NFTs. Patologické snížení tvorby a výdeje neurotransmiteru acetylcholinu (ACh) je předmětem cholinergní teorie. ACh je významný pro procesy učení, paměti, motoriky a pozornosti. Tento neurotransmitter je syntetizován v cholinergních neuronech pomocí enzymu cholinacetyltransferasy (ChAT). AChE štěpí ACh zpět na acetát a cholin. Štěpení ACh v CNS je za normálních okolností významným faktorem v regeneraci neuronů. Druhý enzym, jehož hladina se u pacientů s AD zvyšuje, je BChE. BChE byla nalezena v neuronech, gliích, senilních placích a NFTs. Dojde-li ke snížení aktivity AChE, může ji BChE nahradit. Nedostatečná cholinergní transmise však dnes již není považována za samotnou příčinu choroby. Nejdůležitějším prvkem ve vývoji AD se zdá být porucha metabolismu APP s následnou tvorbou A β . Významnou úlohu v rozvoji AD hrají také RONS, které se ve zvýšené míře vyskytují především v senilním plaku. Podrobná patofyziologie AD je uvedena v přehledu vypracovaném naší výzkumnou skupinou ADINACO (18).

4.2 Současná léčba Alzheimerovy choroby

V současné době je léčba založena pouze na znalosti některých neurotransmiterových abnormalit (zmíněné nízké uvolňování acetylcholinu a naopak vysoké u glutamátu v synapsích), protože příčina choroby není objasněna. Portfolio léčiv je velmi úzké, a proto je zájem o nalezení nových, ať přírodních nebo syntetických látek, které by v léčbě AD byly využitelné. Dnes se pro léčbu využívají pouze kognitiva – inhibitory cholinesteras (donepezil, rivastigmin a galanthamin) a antagonisty na *N*-methyl-D-aspartátových (NMDA) receptorech (memantin). V současné době je ve fázi klinického testování několik látek, které ovlivňují progresi AD. Některé z těchto látek uvádí Vazhayil et al. (82) ve svém přehledu. Huperzin A je chinolizidinový alkaloid z vrance *Huperzia serrata* (Thumb) Trevis, který je reverzibilním a selektivním inhibitorem AChE a vyznačuje se rychlou absorpcí a širokou distribucí v těle. Ukončená druhá fáze klinického hodnocení ukázala, že je na rozdíl od používaných kognitiv velmi dobře snášen. Tato látka je pro léčbu AD využívána v Číně, odkud pochází. Další látkou s ukončenou II. fází klinického hodnocení je ZT-1, látka odvozená od huperzinu A. Tato látka je také inhibitorem AChE a její testování přineslo pozitivní výsledky. 7 β -Hydroxyepiandrosteron je testován pro jeho neuroprotektivní vlastnosti. Jeho účinnost při léčbě AD již byla prokázána v I. fázi klinického hodnocení. Cyklický peptid z 11 aminokyselin cyklosporin A, který je

produkován houbou *Tolypocladium inflatum*, vykázal neuroprotektivní účinky a je v II. fázi klinického hodnocení pro jeho využití při mozkové mrtvici a poranění mozku. Současně je považován za nadějnou látku v léčbě AD. Polyfenolická látka kurkumin z *Curcuma longa* L. vykazuje řadu efektů využitelných v léčbě AD. V *in vivo* studiích byla prokázána inhibice ukládání A β , oligomerizace A β a fosforylace τ -proteinu po podání *per os* u myší. Tato látka je nyní v II. fázi klinického hodnocení. Další slibnou přírodní látkou je resveratrol s širokým spektrem účinků. Vazhayil uvádí i další látky, které jsou v II. či III. fázi klinického hodnocení včetně některých monoklonálních protilátek.

Z uvedeného přehledu je zřejmé, že pozice přírodních látek a látek z nich odvozených v léčbě AD je velmi významná. Některé přírodní látky jsou také doporučovány jako podpůrná léčba. Jsou to především antioxidanty (hlavně polyfenolické látky), ale také extrakt z *Ginkgo biloba* L. EGb 761, u kterého byl prokázán mírný pozitivní účinek u lehkého až středního stadia AD (83). Adams et al. (84) publikoval přehled rostlin, které jsou tradičně využívány ve vztahu k různým degenerativním onemocněním mozku. V přehledu uvádí více než 150 rostlinných druhů, z nichž některé již byly podrobeny testování biologických aktivit a vykázaly účinky využitelné v léčbě AD.

4.3 Přírodní látky potenciálně využitelné v léčbě Alzheimerovy choroby

Studium přírodních látek ve vztahu k AD se v současné době ubírá mnoha směry v souladu s poznáním dalších aspektů patofyziologie choroby. U jednotlivých patologických procesů se uplatňuje více možností zásahu. Některé látky se uplatňují v ovlivnění více procesů najednou, což zvyšuje jejich hodnotu. K zabránění tvorby A β se dají uplatnit stimulatory α -sekretasy, inhibitory β -sekretasy a modulátory γ -sekretasy. Dalším procesem, jehož ovlivnění přírodními látkami je zkoumáno, je agregace A β . V tomto procesu se uplatňují inhibitory tvorby A β oligomerů a chelátory přechodných kovů (především Fe a Cu), které společně s antioxidanty a inhibitory prooxidačních enzymů také snižují oxidační stres. Inhibitory A β indukovaného neuronálního zánětu, glutaminylykasy a tvorby A β oligomerů, agonisté transkripčního faktoru peroxisome proliferator - activated receptor γ (PPAR- γ) a antagonisté receptorů pro konečné produkty glykace (receptors for advanced glycation products, RAGEs) ovlivňují tvorbu senilních plaků a neuronální zánět. Tvorbu NFTs mohou omezit inhibitory glykogensyntasy kinasy 3 β , modulátory γ -sekretasy a antioxidanty. Hladina ACh může být ovlivněn nejen známými inhibitory AChE a BChE, ale také pomocí látek, které zvyšují aktivitu

ChAT. Antioxidanty mohou působit na mnoha úrovních. Kromě výše uvedených, mohou mít vliv i na mitochondriální dysfunkci. Spektrum studovaných látek je velmi široké. Přehled účinků přírodních látek na jednotlivé patologické procesy je uveden v našem souhrnném článku (18). Doposud nejvíce studovanou aktivitou je inhibice AChE a BChE, protože do skupiny inhibitorů těchto enzymů patří již používaná léčiva, která mají významný účinek na zpomalení progresu AD, a pro testování této aktivity je znám jednoduchý test, díky kterému lze testovat velké množství vzorků. V tomto přehledu je tedy pozornost věnována některým skupinám inhibitorů ChE a to pouze těch, kterým se věnujeme ať jako inhibitorům ChE, tak z pohledu jiných aktivit.

4.3.1 Přírodní inhibitory acetylcholinesterasy a butyrylcholinesterasy

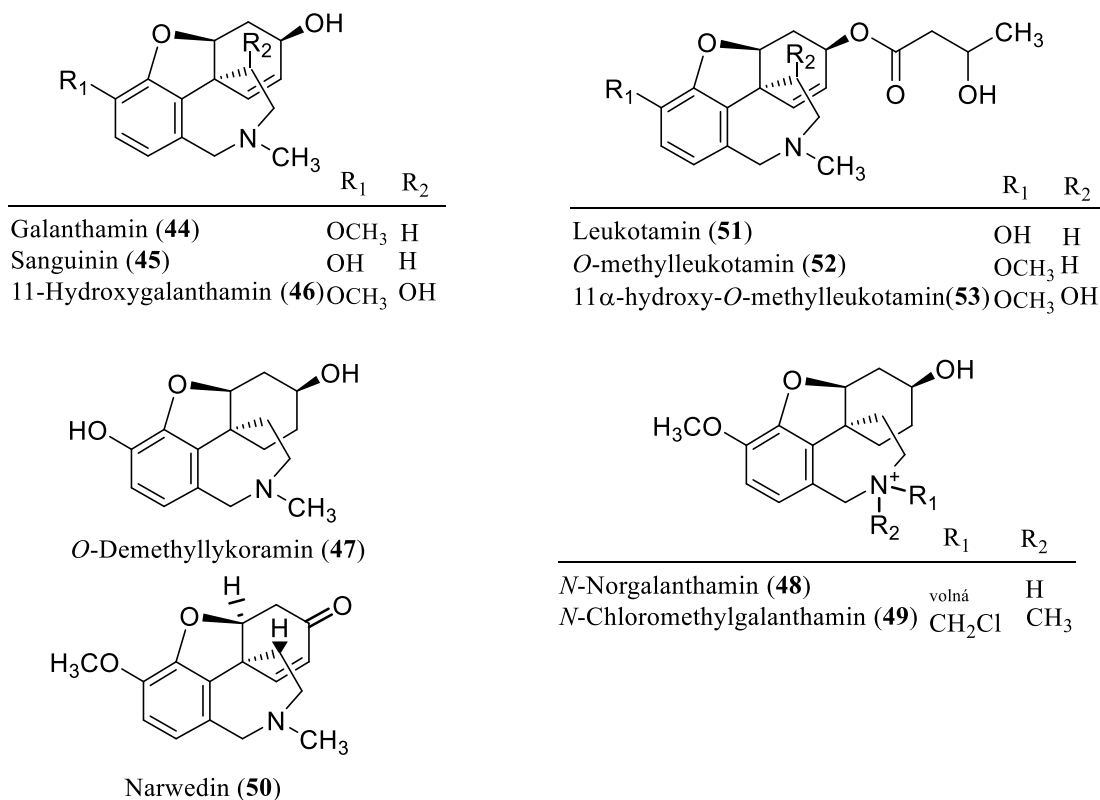
Přírodním inhibitorům AChE bylo věnováno stovky publikací a výsledky těchto prací jsou shrnuty v mnoha přehledech stejně jako účinky vůči BChE (85-87). Výsledky jednotlivých studií jsou však velmi obtížně srovnatelné: pro stanovení IC_{50} byly použity různé enzymové systémy (AChE: nejčastěji elektrický úhoř (88), lidská erytrocytární pouzdra (89), erytrocytární homogenát (90); BChE: nejčastěji enzym z lidského (89) nebo koňského (91) séra) a studie porovnávající výsledky s použitím enzymů různého původu není k dispozici. Původ enzymu není navíc vždy specifikován (92, 93). V některých případech jsou rozdíly v IC_{50} látky až řádové (desetiny až desítky μM) (94-96). V některých studiích dokonce chybí srovnání aktivity se standardním inhibitorem (97). U většiny látek není určen typ inhibice (inhibiční konstanta K_i ; konstanta Michaelise-Mentenové K_m), a proto široké spektrum literárních údajů podává pouze obrysovou informaci o biologické aktivitě. Významnou roli v hledání nových látek hrají především alkaloidy, ale i mezi dalšími látkami lze najít velmi účinné inhibitory. Velmi účinnými inhibitory jsou například některé triterpeny, diterpeny, lignany, steroly a další (98). Některé skupiny přírodních látek nevykazují výraznou aktivitu, ale mohou sloužit jako vůdčí struktury pro syntézu aktivnějších derivátů, což bylo potvrzeno například u kumarinů (87) a flavonoidů (99). Některé připravené deriváty těchto přírodních látek jsou aktivnější než standardní inhibitory. V následující části jsou uvedeny příklady perspektivních látek ze skupiny alkaloidů rostlin čeledi Amaryllidace a různých nealkaloidních látek, které vykazují řadu jiných efektů využitelných v léčbě AD, např. antioxidační účinek.

4.3.1.1 Alkaloidy

Alkaloidy jsou v popředí zájmu při hledání nových účinných inhibitorů cholinesteras. Vzhledem k tomu je počet látek, které již byly testovány, velmi vysoký a není proto možné detailně uvádět všechny alkaloidy. Alkaloidním inhibitorům se věnuje řada přehledů (např. (86, 98)). Z pohledu inhibice ChE patří mezi často sledované alkaloidy látky izolované z rostlin čeledi Amaryllidaceae (obr. 6-8). Tento zájem vychází z klinického využití alkaloidu galanthaminu (Obr.6 – látka č. 44), izolovaného poprvé z *Galanthus woronowii* Losinsk. Tato látka je společně s jejími deriváty obsažena v mnoha druzích amarylkovitých rostlin (89, 100, 101). Naše pracovní skupina se již řadu let věnuje izolaci těchto alkaloidů z cibulí různých druhů rostlin. Pro izolaci jsou vybírány takové druhy, jejichž extrakty vykazují výraznou inhibiční aktivitu a v jejichž profilu látek jsou látky nové, u nás doposud neizolované. Doposud bylo u nás testování inhibice ChE podrobno přes 30 druhů/variet rostlin z této čeledi. Na základě výsledků biologických testů a GC/MS analýzy byly pro izolaci alkaloidů vybrány *Zephyranthes robusta* Baker, *Chlidanthus fragrans* Herb., *Nerine bowdenii* Watson, *Narcissus poeticus* cv. Pink Parasol a *Eucharis grandiflora* Planch. & Linden. Izolační práce na prvních dvou druzích již byly uzavřeny a výsledky publikovány (89, 101, 102). Jak vyplývá z doposud uvedených studií i z našich výsledků, jsou vůči AChE aktivní zejména galanthaminové (obr. 6) a lykorinové (obr. 7) strukturní typy. Definitivní závislosti aktivity na struktuře jednotlivých látek však prozatím nelze jednoznačně formulovat vzhledem k relativně malému počtu testovaných látek.

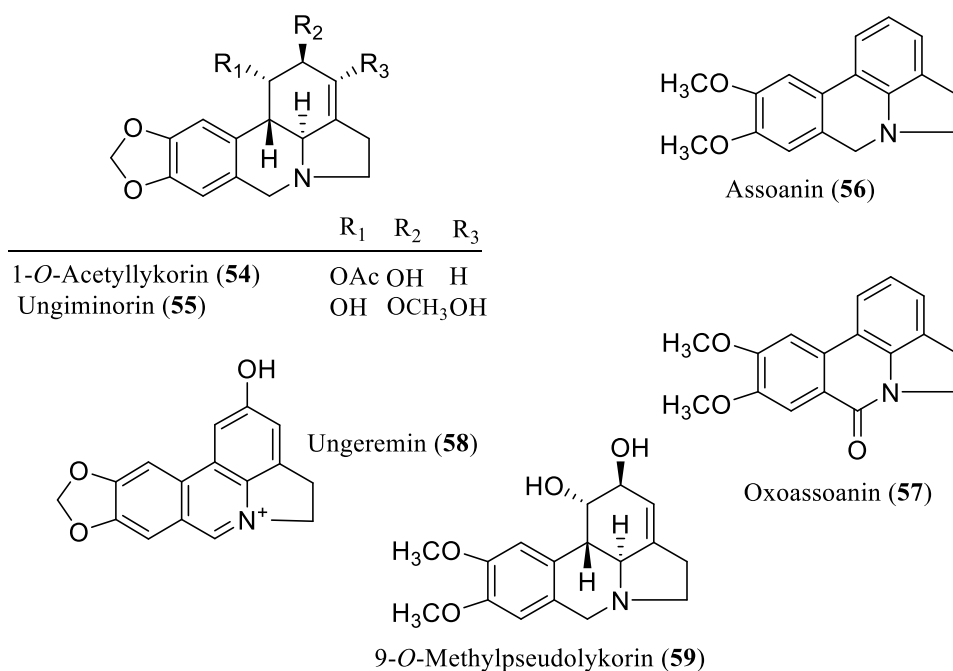
Galanthamin je hlavním zástupcem galanthaminového strukturního typu s IC_{50} v jednotkách μM (100). Je u něj popsána selektivita pro AChE, podle Kulhánkové et al. (89) je v případě BChE IC_{50} 43,3 μM . Galanthamin je reverzibilní kompetitivní inhibitor s biologickým poločasem okolo 6 hodin. Má vysokou biodostupnost a je metabolisován na 4 látky, z nichž jedna je aktivnější než samotný galanthamin. Kromě ChE inhibiční aktivity je také schopen modulovat nikotinové receptory (103). Důležitými strukturními požadavky pro vazbu na enzym jsou cyklohexanový kruh s hydroxylovou skupinou, methoxyskupina a terciární aminoskupina. Tato látka však není neaktivnějším zástupcem tohoto strukturního typu. Doposud neaktivnějším galanthaminovým alkaloidem je sanguinin (Obr.6 – látka č. 45), který má místo methoxyskupiny hydroxyskupinu. Záměna těchto skupin má za následek desetinásobné zvýšení aktivity. Podobná aktivita s IC_{50} v rozmezí 0,16-0,18 μM byla pozorována také u látek, v jejichž molekule je na atom dusíku navázána allylová skupina (104). Aktivita srovnatelná s galanthaminem byla zjištěna u 11-hydroxygalanthaminu (Obr.6 – látka

č. 46, $IC_{50} = 1,61 \mu M$). Andrade et al. (105) však uvádí u této látky IC_{50} o řád vyšší než je tomu u galanthaminu. Další látky testované v této studii, které neměly dvojnou vazbu na kruhu C (lykoramin, epinorlykoramin), byly vůči AChE neaktivní (100), zatímco *O*-demethyllykoramin (Obr.6 – látka č. 47) izolovaný z *Lycoris longituba* Y.C.Hsu & G.J.Fan vykázal vysokou aktivitu s $IC_{50} 8,13 \mu M$ (IC_{50} galanthamine $2,43 \mu M$)(95). Tento alkaloid by izolován s řadou dalších galantaminových alkaloidů z nichž neaktivnější byl *N*-norgalanthamin (Obr.6 – látka č. 48), jehož aktivita byla srovnatelná s galanthaminem, mírně slabší aktivitu vykázal *N*-chloromethylgalanthamin (Obr.6 – látka č. 49). Další látka, která má velmi podobnou strukturu jako galanthamin, je chlidanthin, polohový isomer. Tato látka však nevykázala očekávanou aktivitu (94, 101). Je-li v molekule nahrazena hydroxylová skupina na kruhu C za ketoskupinu, dochází k mírnému snížení aktivity, jak je tomu u narwedinu (105).V nedávné době byly testovány tři další galantaminové alkaloidy izolované z *Pancretium illyricum* L., které měly účinek porovnatelný s galanthaminem: leukotamin (Obr.6 – látka č. 51), *O*-methylleukotamin (Obr.6 – látka č. 52) a 11 α -hydroxy-*O*-methylleukotamin (Obr.6 – látka č. 53) se středními inhibičními koncentracemi v jednotkách μM (106).



Obrázek 6. Galantaminové alkaloidy s AChE inhibiční aktivitou.

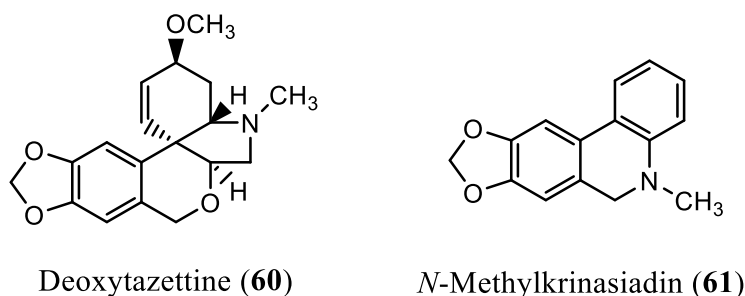
Lykorin, jako hlavní zástupce lykorinových alkaloidů, nevykazuje AChE ani BChE inhibiční aktivitu. Zatímco 1-*O*-acetylylykorin (Obr.7 – látka č. 54) má aktivitu dvakrát vyšší než galanthamin, 2-*O*-acetylylykorin a 1,2-di-*O*-acetylylykorin vykazují nízkou aktivitu (IC_{50} 169 a 211 μ M)(107). Přítomnost acetylového zbytku v poloze 2 snižuje signifikantně inhibiční aktivitu. Dalším příkladem je rozdílná aktivita pseudolykorinu a 2-*O*-acetyl-pseudolykorinu, kde druhá zmíněná látka je zcela neaktivní a pseudolykorin vykazuje mírnou inhibiční aktivitu (108). Galanthin má na rozdíl od pseudolykorinu pouze jednu hydroxyskupinu na kruhu C a jeho aktivita je výrazně vyšší ($IC_{50} = 63,1 \mu$ M)(108). Tato hodnota se však neshoduje s našimi výsledky, kde galanthin ani 9-*O*-demethylgalanthin nevykázaly žádnou aktivitu při testování až do koncentrace 100 μ M (102). Ungiminorin (Obr.7 – látka č. 55) z *Narcissus* 'Sir Winston Churchill' má na kruhu C hydroxylové skupiny v polohách 1 a 3 a 2-methoxyskupinu a jeho aktivita je porovnatelná s galanthinem (109). Podle Lópeze (100) má na zvýšení aktivity lykorinových alkaloidů vliv také aromatický kruh C, který je v molekulách assoaninu (Obr.7 – látka č. 56) a oxoassoaninu (Obr.7 – látka č. 57)($IC_{50} = 3,87$ a $47,21 \mu$ M, respektive). Další vysoce aktivní látkou ($IC_{50} = 0,35 \mu$ M) tohoto strukturního typu je ungeremin (Obr.7 – látka č. 58), alkaloid izolovaný z *Nerine bowdenii* W. Watson a z některých druhů rodů *Galanthus* L. a *Narcissus* L., který má však ve své molekule kvartérní dusík, a proto je pro inhibici ChE *in vivo* neperspektivní vzhledem k neprostupnosti přes hematoencefalickou bariéru (110). *N*-oxid inkartinu izolovaný z *Galanthus rizehensis* Stern je signifikantně aktivnější než samotný inkartin, ale aktivita obou látek není výrazná ($IC_{50} = 34,5$ a $106,97 \mu$ M)(98). 9-*O*-Methylpseudolykorin (Obr.7 – látka č. 59) izolovaný z *Galanthus fosteri* Baker vykázal aktivitu mírně slabší vůči AChE ($IC_{50}=2,84 \mu$ M) vs. galanthamin ($IC_{50}=0,15 \mu$ M), ale i výraznou aktivitu vůči BChE ($IC_{50}=1,5 \mu$ M) vs. galanthamin ($IC_{50}=0,711 \mu$ M)(94).



Obrázek 7. Lykorinové alkaloidy s AChE inhibiční aktivitou.

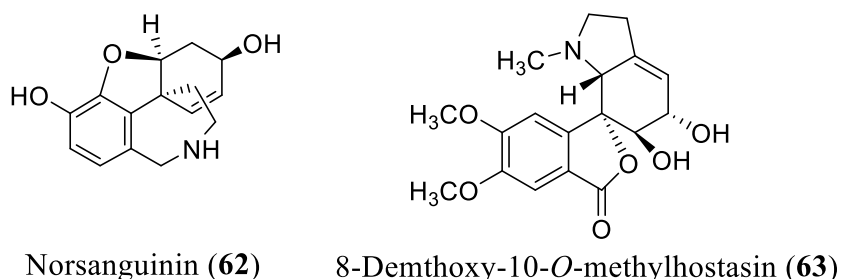
U dalších strukturálních typů (obr. 8) nebyla prozatím nalezena žádná vysoce účinná látka. Některé krininové alkaloidy izolované v naší laboratoři vykázaly nízkou AChE inhibiční aktivitu a byly neaktivní vůči BChE. Mezi aktivními alkaloidy byly testovány undulatin, 8-*O*-demethylmaritidin, bufanisin, hippeastidin, ambelin a vittatin s IC₅₀ 23, 28, 99, 100, 169, 643 μM. Ostatní krininové alkaloidy byly zcela neaktivní (89, 90, 101). Další krininový alkaloid 11-*O*-acetyl-9-*O*-demethylmaritidin vykázal poměrně silnou aktivitu vůči AChE se střední inhibiční koncentrací v jednotkách μM. Ve srovnání s galanthaminem však byla tato hodnota o jeden řád vyšší. Tato látka byla aktivní i vůči BChE, ve srovnání s galanthaminem byla aktivita mírná (94). Adewusi (93) izoloval z *Boopane distichia* (L.f.) Herb. krininový alkaloid 6α-hydroxykrinamin, který vykázal také pouze mírnou inhibici AChE. Při porovnání aktivity dvou krininových alkaloidů (bufanisinu a augustinu) a jejich *N*-oxidů se ukázalo, že *N*-oxidy vykazují mírně vyšší aktivitu. Aktivita všech látek však byla výrazně nižší než u galanthaminu (92). Další strukturou alkaloidů amarylkovitých rostlin jsou belladinové alkaloidy. Belladin vykázal velmi nízkou aktivitu vůči AChE s IC₅₀ = 699 μM a byl málo aktivní i vůči BChE (IC₅₀ = 315 μM). Výraznější BChE inhibiční aktivitu však mají jeho deriváty *N,O*-dimethylbelladin a 4'-*O*-demethylbelladin, který je aktivnější než galanthamin (90, 94). Z tazzetinových alkaloidů vykázaly nízkou inhibiční aktivitu vůči oběma ChE deoxytazzetin a 3-epimakronin (89, 101). Střední inhibiční koncentrace deoxytazzetinu (Obr.8 – látka č. **60**) byla pouze čtyřikrát vyšší

než tomu bylo u galanthaminu, což činí z této látky neúčinnější tazettinový alkaloid. Narciklasinový alkaloid *N*-methylkrinasiadin (Obr.8 – látka č. **61**) byl také silně aktivní vůči AChE a to i ve srovnání s galanthaminem, $IC_{50}=4,23 \mu M$ respektive $2,43 \mu M$ (95), zatímco ismin vykázal pouze mírnou AChE a BChE inhibiční aktivitu ($IC_{50} = 82$ a $425 \mu M$, respektive)(101). López et al. (100) testoval kromě již zmíněných lykorinových a galanthaminových alkaloidů i jiné strukturní typy alkaloidů (hemanthaminové, homolykorinové a tazzetinové), které nevykázaly žádnou inhibiční aktivitu.



Obrázek 8. Zástupci dalších strukturních typů Amaryllidaceae alkaloidů s AChE inhibiční aktivitou.

Přestože tento typ alkaloidů byl považován za unikátní pouze v rostlinách čeledi Amaryllidaceae, výzkum některých jednoděložných rostlin z jiných čeledí ukázal jejich přítomnost i jinde. Příkladem může být rostlina *Hosta plantaginea* (Lam.) Asch. z čeledi Liliaceae, ze které bylo izolováno celkem 18 alkaloidů amarylkovitých rostlin (111). Některé z nich (obr. 7 a 9) byly testovány na inhibici AChE a jako neaktivnější se ukázaly ungeremin (Obr.7 – látka č. **58**), norsanguinin (Obr.9 – látka č. **62**) a 8-demethoxy-10-*O*-methylhostasin (Obr.9 – látka č. **63**) s $IC_{50} = 3,85$; $1,43$ a $2,32 \mu M$, respektive (98).

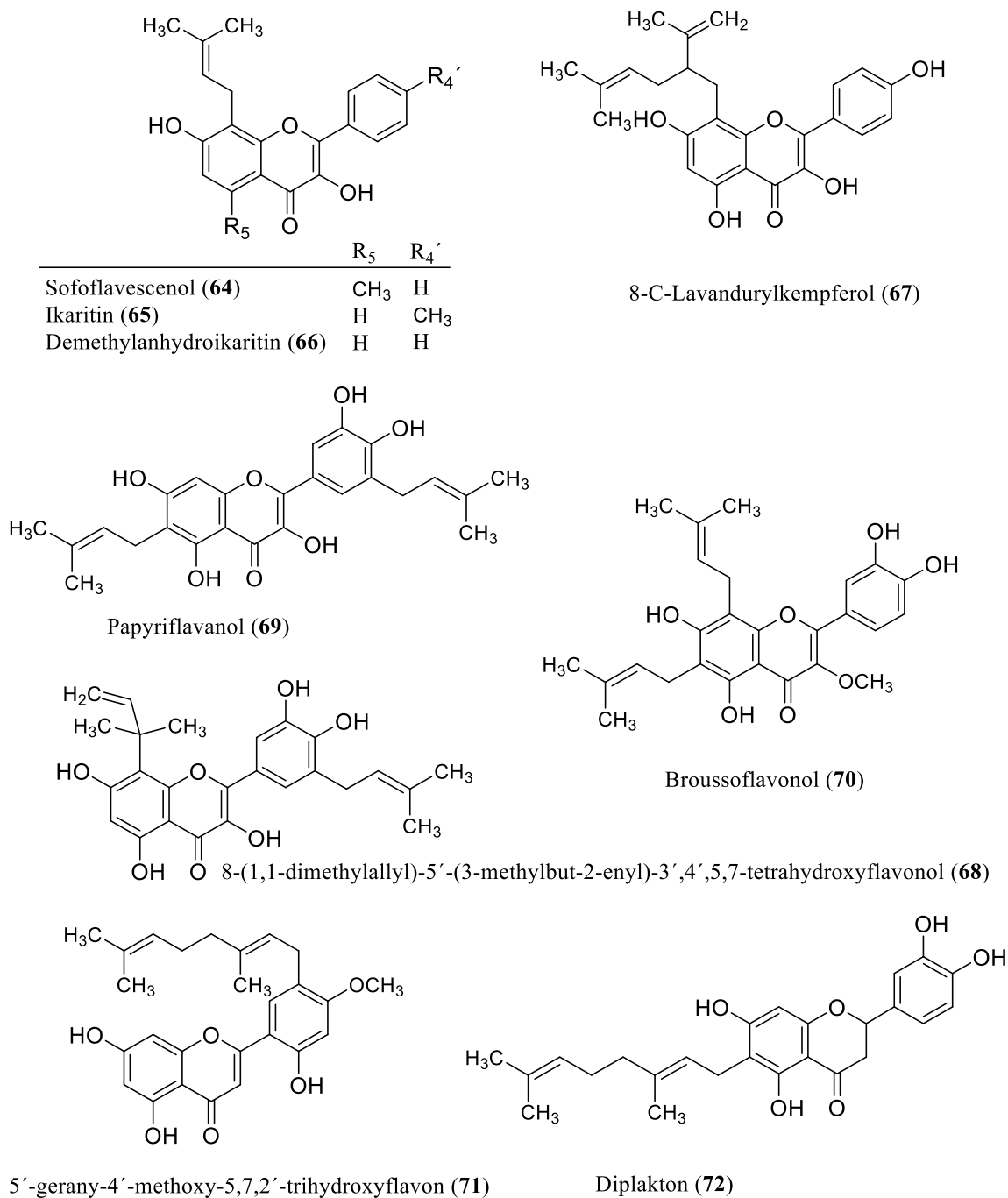


Obrázek 9. Alkaloidy izolované z *Hosta plantaginea* s AChE inhibiční aktivitou.

4.3.1.2 Flavonoidy

Příznivý vliv polyfenolických látek na různá chronická onemocnění je obecně známý. I když je jejich možný účinek u AD spojován nejčastěji s antioxidační aktivitou, jsou studie ukazující i na jejich specifické mechanismy a to včetně vlivu na ChE. Mezi fenolickými látkami najdeme obvykle inhibitory s nízkou či střední aktivitou (IC_{50} v rozmezí jednotek až desítek μM), ale také mnoho neaktivních látek. Struktury látek s AChE inhibiční aktivitou jsou na obrázku 10. K těm nejaktivnějším patří například flavonoly ze *Sophora flavescens* Aiton (Fabaceae), které byly testovány nejen na inhibici obou ChE, ale také na inhibici β -sekretasy 1. Flavonoly sofoflavescenol (Obr.10 – látka č. 64), ikaritin (Obr.10 – látka č. 65), demethylanhydroikaritin (Obr.10 – látka č. 66), 8-C-lavandurylkempferol (Obr.10 – látka č. 67) a kempferol (Obr.1 – látka č. 5) inhibovaly AChE s hodnotami IC_{50} 8,37; 6,47; 6,67; 5,16 a 3,31 μM , respektive. Všechny uvedené látky inhibovaly i další dva zmíněné enzymy. Další flavonoly se zajímavou aktivitou 8-(1,1-dimethylallyl)-5'-(3-methylbut-2-enyl)-3',4',5,7-tetrahydroxyflavonol (Obr.10 – látka č. 68), papyriflavonol (Obr.10 – látka č. 69) a brousoflavonol (Obr.10 – látka č. 70) byly izolovány z *Broussonetia papyrifera* (L.) L'Hér. ex Vent. (Moraceae). Jejich střední inhibiční koncentrace byly v rozmezí 0,82-3,1 μM . Z rostliny *Morus lhou* Koidz. patřící do stejné čeledi bylo izolováno několik flavonoidů, z nichž nejaktivnější vůči AChE byl 5'-geranyl-4'-methoxy-5,7,2'-trihydroxyflavon (Obr.10 – látka č. 71) ($IC_{50} = 10,95 \mu M$). U C-3 prenylovaných flavonů (morusin, cyklomorusin, neocyklomorusin a kuwanon C) byla zjištěna nekompetitivní inhibice, zatímco u ostatních látek bez substituentu na C-3 (5'-geranyl-4'-methoxy-5,7,2'-trihydroxyflavon, 5'-geranyl-5,7,2',4'-tetrahydroxyflavon, kuwanon U, kuwanon E) smíšená inhibice. Všechny tyto látky inhibovaly také BChE. Jiné geranylované flavonoidy byly získány z methanolového extraktu z plodů *Paulownia tomentosa* Steud.: 6-geranyl-3,3',5,5',7-pentahydroxy-4'-methoxyflavan, 6-geranyl-3,3',5,5',7-pentahydroxy-4'-methoxyflavanon a diplakon (Obr.10 – látka č. 72). Všechny tyto látky vykazaly smíšený typ inhibice lidské AChE s hodnotami $IC_{50} = 15,6; 22,9$ a $7,2 \mu M$. Flavony isoorientin a isovitexin jsou zřejmě zodpovědné za AChE inhibiční aktivitu extraktu z květů a oddenků *Iris pseudopumila* Tineo (Iridaceae). Obě látky také inhibují BChE (98). Hispidon a (2S)-5,2'-dihydroxy-7,5'-dimethoxyflavanon (*Onosma hispida* Wall.) vykazují zajímavou inhibiční aktivitu vůči oběma ChE s hodnotami IC_{50AChE} 11,6 a 28,0 μM a IC_{50BChE} 15,7 a 7,9 μM (112). Ze 17 testovaných flavonoidů z *Buddleja davidii* Franch. (Buddlejaceae) byly vůči AChE aktivní pouze linarin a tilianin. Další flavonoidní inhibitory AChE byly získány z *Agrimonia pilosa* Ledeb. (Rosaceae).

Kvercitrin, 3-methoxykvercetin, tilirosid a kvercetin (Obr.1 – látka č. 6) nevykazaly aktivitu srovnatelnou se standardními inhibitory (86). Katalinić et al. (113) testoval 6 flavonolů a 2 flavony na inhibiční aktivitu vůči lidské BChE. Inhibiční potenciál testovaných látek vzrůstal v pořadí: rutin (Obr.1 – látka č. 9) < luteolin (Obr.1 – látka č. 1) < fisetin ≤ myricetin (Obr.1 – látka č. 8) ≤ kvercetin < kempferol (Obr.1 – látka č. 5) ≤ apigenin (Obr. 4 – látka č. 34) < galangin. Jejich inhibiční konstanty byly v rozmezí 10-500 μM. Pro zjištění selektivity vůči jednotlivým ChE byla testována i inhibiční aktivita vůči AChE. Pro AChE se inhibiční konstanty pohybovaly v rozmezí 40-120 μM s výjimkou rutinu, který v testovaném rozmezí koncentrací enzym neinhiboval. Inhibiční aktivita vzrůstala v pořadí: apigenin < fisetin < kempferol < galangin < luteolin < kvercetin < myricetin. Selektivita mezi inhibicí BChE a AChE byla nejvýraznější u galanginu. Guo et al. (114) testoval 21 flavonoidů různých struktur (2 flavanony, 6 flavonů, 6 flavonolů, 7 isoflavonů). Nejaktivnější látkou byl stejně jako v předchozí studii flavonol galangin, který je přítomný např. v oddencích *Alpinia officinarum* Hance (Zingiberaceae), ale při 50 μM koncentraci inhiboval pouze 56,5 % AChE. Z flavanonů byl nejaktivnější alpinetin (50 μM koncentrace, 10,3 %), z flavonů apigenin (10 μM koncentrace, 21,5 %) a nejaktivnějším isoflavonem byl kalykosin (50 μM koncentrace, 22,8 %). Dalšími testovanými isoflavony byly osajin a pomiferin, společně s jejich iso-formami, z plodů rostliny *Maclura pomifera* (Rafin.) Schenider (Moraceae). Střední inhibiční koncentrace byly ve stovkách μM a více (100-2700)(86). V další studii vykázal nejvyšší aktivitu mezi flavony baikalein (Obr.1 – látka č. 3), což se neshoduje s výsledky předešlé studie (114), kde baikalein vykázal výrazně nižší inhibiční aktivitu než apigenin, zatímco v této studii (115) byla inhibiční aktivita apigeninu mírně slabší než u baikaleinu. Z flavonolů byly pak nejaktivnější quercetin, myricetin a kempferol (115), který se v předešlé studii ukázal jako nejslabší inhibitor mezi flavonoly (114). Velmi silnou aktivitu ve srovnání s donepezilem vykázal taxifolin (Obr.1 – látka č. 12)(116).



Obrázek 10. Flavonoidy s AChE inhibiční aktivitou.

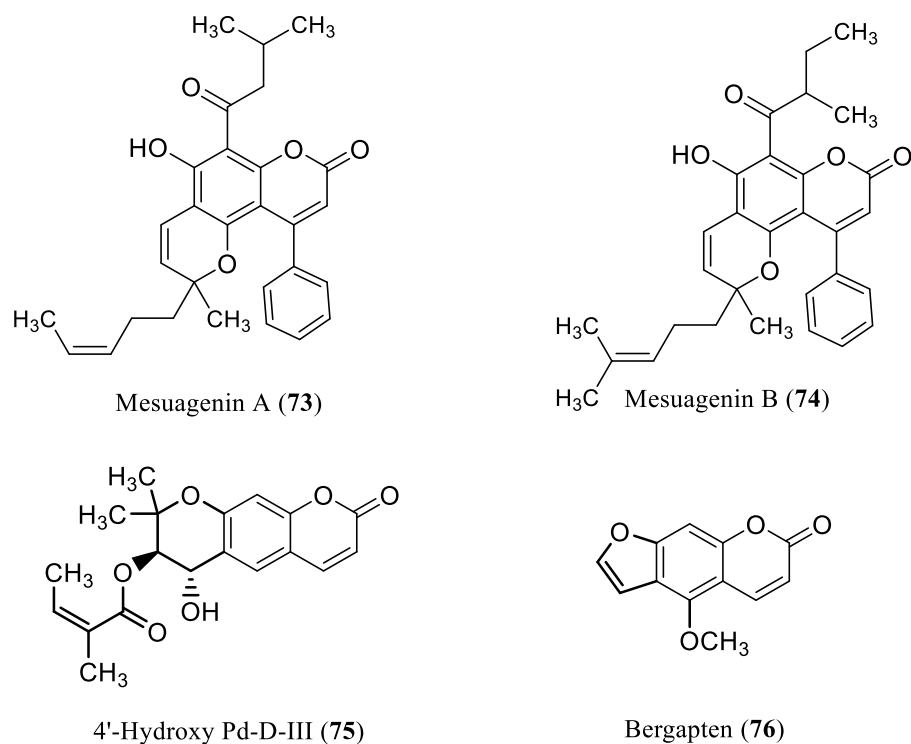
Ačkoli přírodní flavonoidy nevykazují vysokou aktivitu, mohou sloužit jako prototypové struktury pro syntézu aktivnějších derivátů, což potvrzuje studie testující syntetické deriváty chalkonů, flavonů, flavanonů a isoflavonů. Z 24 testovaných derivátů byl neúčinnější isoflavon 6,7-dimethoxy-3-[pyrrolidin-1-yl-methyl]-fenyl]-4*H*-chromen-4-on, jehož střední inhibiční koncentrace byla 4 nM. Pro srovnání, donepezil má tuto koncentraci 12 nM a 19 derivátů bylo účinnějších než rivastigmin (2,25 μM). Všechny testované deriváty byly vysoce selektivní

pro AChE, žádná z látek nebyla vůči BChE aktivnější než použité standardní inhibitory (99). V další studii bylo z naringeninů připraveno 8 derivátů akacetinu 7-O-methyletheru, kde byly v poloze 6 navázány Mannychovy base. Látka s navázaným piperidinovým kruhem vykazala vyšší AChE inhibiční aktivitu než rivastigmin ($IC_{50} = 0,82$ oproti $10,59 \mu M$). Pět látek bylo silnějšími AChE inhibitory než rivastigmin, ale žádná z nich nedosáhla jeho účinku vůči BChE (117). V případě takovýchto derivátů je však diskutabilní, zda původní flavonoidní struktura má na aktivitu nějaký vliv, protože obdobných výsledků bylo dosaženo i při vazbě piperidinového kruhu na indolový alkaloid isatin (118). I přes dobré výsledky ve zmíněných *in vitro* studiích, nelze předpokládat přímé využití flavonoidů pro léčbu, protože jsou to látky vysoce hydrofilní a proto nepřecházejí významně ani přes buňky trávicího traktu natož přes hematoencefalickou bariéru.

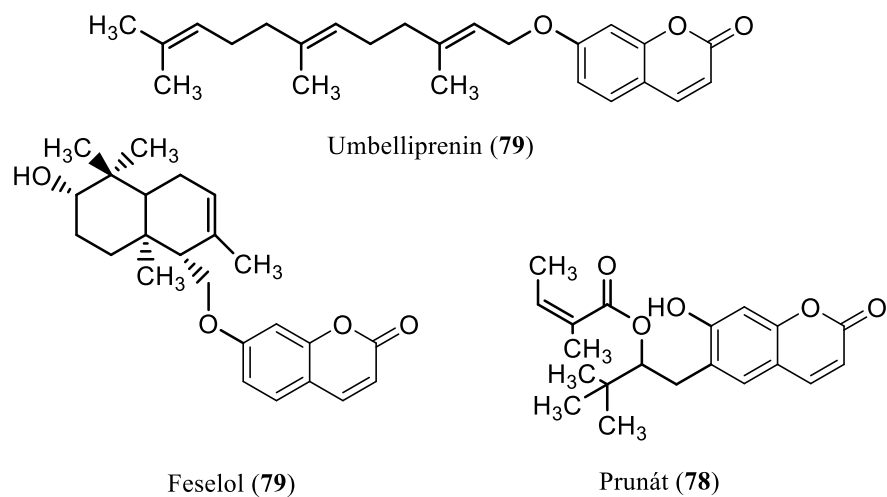
4.3.1.3 Kumariny

Přírodní kumariny jsou z pohledu testování této aktivity poměrně malou skupinou látek. Anand et al. (87) ve svém přehledu uvádí především řadu syntetických kumarinů, ale také některé kumariny přírodní. Zatímco mezi syntetickými kumariny je několik velmi účinných struktur (IC_{50} v nM koncentracích), mezi kumariny přírodními prozatím nebylo nalezeno mnoho látek, jejichž aktivita by byla porovnatelná se známými inhibitory (119) (struktury kumarinů, které vykazují AChE a BChE inhibiční aktivitu jsou na obrázcích 11 a 12). Výjimkou jsou 4-fenylkumariny izolované z *Mesua elegans* (King) Kosterm. (Clusiaceae), které vykazaly vysokou aktivitu. Nejúčinnější byly mesuageniny A a B (Obr.11 – látky č. **73 a 74**) jejichž IC_{50} byly $1,06$ a $0,7 \mu M$ (120). Další látky s poměrně vysokou aktivitou byly furanokumariny (R)-(+)-6'-hydroxy-7'-methoxybergamotin ($IC_{50} = 11,2 \mu M$) a (R)-(+)-6',7'-dihydroxybergamotin ($IC_{50} = 15,4 \mu M$) izolované z plodů druhu *Citrus hystrix* DC (Rutaceae). Kumariny izolované z podzemní části *Angelica gigas* Nakai (Apiaceae) vykazaly inhibiční aktivitu vůči AChE. Nejúčinnější látkou byl dihydropyranokumarin dekursinol, jehož IC_{50} byla $28 \mu M$. V této studii však chybí porovnání se standardem (97). Furanokumariny xanthotoxin a isopimpinelin izolované z *Angelica acutiloba* (Siebold & Zucc.) Kitag. vykazaly poměrně vysokou aktivitu (121). Rollinger et al. (122) identifikoval skopolin a skopoletin jako potenciální inhibitory AChE pomocí *in silico* testování. Následně byly tyto látky vyizolovány z *Scopolia carniolica* Jacq. (Solanaceae) a testovány na AChE inhibiční aktivitu. Obě látky vykazaly mírnou inhibiční

aktivitu. Dalšími aktivními kumariny s různou mírou aktivity jsou muranganon, isoimperatorin, 7-hydroxy-3,4-dimethylkumarin (123), 4-methylumbeliferon, feronielosid, marmesin a kolumbianetin. Inhibiční aktivita kumarinů je obecně střední až nízká. Zdá se, že větší substituenty v poloze C-7 na jednoduchém kumarinu nebo C-5 či C-8 na furanokumarinu zvyšují inhibiční aktivitu v porovnání s malými substituenty (86). V posledních letech však byly nalezeny i některé přírodní kumariny s aktivitou srovnatelnou se standardními inhibitory. Z *Angelica decursiva* (Miq.) Fr. Et Sav. bylo izolováno celkem 16 kumarinů, které byly testovány na AChE i BChE inhibiční aktivitu. Aktivita některých z nich byla srovnatelná s použitým standardem berberinem. Neaktivnější látkou byl kumarin označený jako 4'-hydroxy Pd-D-III (75), jehož aktivita byla srovnatelná s berberinem u obou ChE. I další dihydroxanthiletinové kumariny vykazovali silnou inhibiční aktivitu. Z ostatních izolovaných látek pak měly aktivitu vůči BChE srovnatelnou s berberinem eskuletin (Obr.1 – látka č. 17) a dafnetin (Obr.1 – látka č. 19)(124, 125). Další účinná látka byla bergapten (Obr.11 – látka č. 76), jehož střední inhibiční koncentrace byla dvakrát vyšší než u galanthaminu (126). Z další miříkovité rostliny *Heptaptera cilicica* (Boiss.&Bal.)Tutin. byly izolovány umbelliprenin (Obr.12 – látka č. 77) a prunát (Obr.12 – látka č. 78), jejichž aktivita vůči BChE byla srovnatelná s použitými standardy. Střední inhibiční koncentrace feselolu (Obr.12 – látka č. 79) pak byla srovnatelná s galanthaminem v případě inhibice AChE (127, 128).



Obrázek 11. Kumariny s AChE a BChE inhibiční aktivitou I.



Obrázek 12. Kumariny s AChE a BChE inhibiční aktivitou II.

5 Závěr a výhled do budoucna

Izolace účinných látek z přírodních surovin je časově velmi náročnou činností, která někdy nemusí vést k objevení nejaktivnější látky, protože velkou roli v biologickém účinku může hrát synergismus (129, 130). I přes to již bylo nalezeno mnoho látek využitelných pro léčbu různých onemocnění právě z přírodních zdrojů (2), protože jsou to zdroje historicky prověřené, jsou to také zdroje obnovitelné a biosyntéza účinné látky a její izolace je často lacinější než totální chemická syntéza, jak je tomu například u galanthaminu (131). Uvedený přehled uvádí některé skupiny přírodních látek využitelných u dvou skupin chronických onemocnění: kardiovaskulárních chorob a Alzheimerovy choroby, jako jedné z nejčastějších neurodegenerativních onemocnění (12). Obě skupiny onemocnění jsou způsobeny nebo doprovázeny mnoha patofyziologickými mechanismy, některé z nich jsou společné (např. role RONS a zánětu)(20, 22) a v práci tohoto rozsahu nebylo možné zahrnout všechny. Práce, kterou předkládám, je proto zaměřena pouze na účinky, jejichž výzkumu se aktuálně věnuji a které jsou sledovány i v mnoha studiích výzkumných skupin po celém světě zaměřených na různá chronická onemocnění.

Na pracovišti katedry farmaceutické botaniky se věnujeme výzkumu přírodních látek s různými účinky na některá chronická onemocnění, především neurodegenerativního charakteru. Jako člen výzkumné skupiny ADINACO (Alzheimer's Diseases and NATural COMpounds) se věnuji hlavně *in vitro* testování nových (resp. potenciálních) inhibitorů lidských cholinesteras (acetylcholinesterasy a butyrylcholinesterasy), které se podílejí na progresi Alzheimerovy choroby. Jedním z klinicky používaných inhibitorů ChE je alkaloid galanthamin, izolovaný z některých rostlin čeledi Amaryllidaceae (131). Právě proto je pozornost věnována řadě taxonů z této čeledi, které ještě nebyly studovány, izolaci nových, dosud nepopsaných alkaloidů, které by mohly být z hlediska praktické využitelnosti ještě atraktivnější (modulace jiných receptorových systémů, uplatňujících se při ovlivňování kognice) a stát se tak vůdčí strukturou pro další studium tohoto typu přírodních látek. Jak je zřejmé z předloženého přehledu, je spektrum testovaných látek velmi široké a podle počtu prací, které se hledáním nových inhibitorů ChE věnují, je to stále velmi aktuální téma. V nedávné minulosti však bylo nalezeno mnoho dalších a pravděpodobně i perspektivnějších mechanismů, a stále jsou objevovány další, které mohou ovlivňovat vývoj AD, a proto je třeba se v budoucnu zaměřit i na další účinky izolovaných látek, které by mohly přispět ke zpomalení

progrese AD (132, 133). Všechny doposud známé projevy AD a především mechanismy, kterými je pravděpodobně možné vývoj nemoci ovlivnit včetně přehledu přírodních látek, které již byly testovány, jsou shrnuty v práci " Natural compounds (small molecules) as potential and real drugs of Alzheimer's disease: A critical review", která může sloužit jako vodítko pro další výzkum nejenom naší skupině, ale i dalším vědcům (18). Ačkoliv je tzv. cholinergní teorie jednou ze stále intenzívně diskutovaných teorií (i když se *de facto* nejedná o příčinu, ale důsledek), existují další teorie vzniku AD, které jsou patrně pravděpodobnější (především mitochondriální dysfunkce založená na dosud neobjasněných genetických faktorech)(133). V současné době probíhá řada klinických studií, které jsou zaměřeny na různé cíle, které mohou ovlivnit průběh AD (134). Kolegové z výzkumné skupiny ADINACO tak v rámci různých spoluprací testují jimi izolované látky i na další aktivity jako je inhibice prolyl oligopeptidasy (102), glykogen synthasy kinasu 3 β (135) nebo β -sekretasy 1 (136).

V patofyziologii AD se také významně uplatňuje účinek RONS(28). Antioxidační působení látek je studováno mnoho let. Proces antioxidačního nebo prooxidačního působení mnoha látek přírodního charakteru (přítomných ve stravě) je velmi složitý (137). Na tento účinek je bohužel často pohlíženo poněkud zjednodušeně. V průběhu dlouholetého výzkumu došlo k jistému posunu od samotného testování vychytávání volných radikálů či různých testů celkové antioxidační kapacity k metodám, které jsou využívány k podrobnějšímu a biologicky relevantnějšímu popisu mechanismu působení jednotlivých látek, ať již používaných nebo nových, které na své využití teprve čekají. Kromě přímého vychytávání volných radikálů, případně vlivu látek na peroxidaci lipidů, jsou v antioxidačních mechanismech zahrnuty i chelatace přechodných kovů (13, 15) a vliv látek na různé dráhy spojené se vznikem volných radikálů (138-140). Jako podklad pro další práci jsme nedávno připravili souhrnnou publikaci ukazující, že pro velkou část, ne-li všechny alkaloidy, je právě relevantnější specifický antioxidační účinek než neselektivní reakce s volnými radikály (141).

Svoji práci v této oblasti jsem rozšířila spoluprací s laboratoří kardiovaskulární farmakologie (Faf HK, UK) a v této souvislosti se věnuji testování interakcí vybraných skupin přírodních fenolických látek s přechodnými kovy. Podílela jsem se na vypracování postupů pro měření železo-chelatačního a měď-chelatačního účinku látek a také na redukci železitých a měďnatých iontů. V průběhu 5 let od zavedení metodiky na měření měď-chelatačních účinků jsme si v případě použití mírně kompetitivního indikátoru hematoxylinu povšimli určité chelatační aktivity i u látek, která nemají ve své molekule žádné chelatační místo. Byly to látky,

u kterých je známá jejich přímá antioxidační aktivita, z čehož vyplývá, že mohou mít kovy redukující vlastnosti. Experimentálně jsme ověřili, že látky, které redukují měďnaté ionty, mohou při použití této metodiky dávat falešně pozitivní výsledky a proto je třeba při testování měď-chelatačních účinků použít u takovýchto látek pro ověření i metodiku využívající jako indikátor disodnou sůl bathocuproindisulfonové kyseliny (142). V práci, kterou předkládám, jsou shrnuty nejen výsledky, na nichž jsem se podílela, ale také výsledky dalších studií. Ve srovnání s počtem studií zabývajících se interakcemi fenolických látek s železem, je počet prací zaměřených na interakce s mědí poměrně malý. Naše studie, hodnotící měď-chelatační účinky je prozatím nejrozsáhlejší prací zahrnující 26 flavonoidů (14). Vzhledem k tomu, že tyto fenolické látky jsou v organismu snadno a rychle metabolisovány (143), je třeba stanovit nejen účinnost látek samotných, ale také jejich metabolitů. Metabolismus některých flavonoidů lidskými enzymy je dobře znám a proto v současné době věnujeme i testování metabolitů těchto látek, aby bylo možné komplexně zhodnotit přínos těchto látek, jejichž antioxidační působení je známé již řadu let. Velkou skupinu flavonoidů však bude nutné podrobit v blízké budoucnosti biotransformačním studiím, aby se zjistilo, které sloučeniny se mohou v celkovém antioxidačním a chelatačním účinku projevit a se kterými lze počítat jako s látkami reálně účinnými. Na druhé straně je nutno lépe identifikovat a charakterizovat účinky malých fenolických látek, které vznikají činností lidské mikroflóry v trávicím traktu, vstřebávají se do systémové cirkulace a to jak ve volné formě, tak konjugované s kyselinou sírovou a glukuronovou. Jejich výzkum bude určitě patřit k čelním tématům mé další práce.

I mezi alkaloidy jsou také látky, které již byly testovány na železo chelatační aktivitu. Jedná se o některé bisbenzylisochinolinové, aporfinové a benzylisochinolinové alkaloidy (144-146). Jejich střední efektivní koncentrace se pohybují ve stovkách μM , takže tato aktivita nemá klinický význam. Navíc z našich zatím nepublikovaných výsledků vyplývá, že hlavní roli hraje atom dusíku, protože jakékoliv strukturní obměny nezpůsobují výrazné změny aktivity, z čehož vyplývá, že každý alkaloid je v určité koncentraci schopen železo chelatovat. Většina studií s alkaloidy je prováděna bez použití pufrů, tj. ignorují patofyziologické rozdíly ve vztahu k pH. V přítomnosti pufrů snižujících pH však většina alkaloidů nemá chelatační vlastnosti, zřejmě proto, že přechází do ionizovaného stavu.

Všechny fenolické látky, které jsme testovali na chelataci a redukci železa a mědi, byly podrobeny také testování antiagregačního účinku. Ten je, zejména u flavonoidů, již dobře znám (147, 148). Existuje však pouze úzká skupina látek, u kterých byl zjištěn i mechanismus

tohoto působení. Agregace destiček je velmi složitý proces, na kterém se podílí řada mechanismů. Většina studií testuje látky pouze z pohledu inhibice agregace indukované různými agonisty, které se podílejí na tomto procesu, což je zřejmé i z předloženého přehledu. Pro pochopení působení těchto inhibitorů je však třeba sledovat jejich účinek na jednotlivé procesy vedoucí ve výsledku k agregaci, a proto se v současné době intenzivně podílím také na této problematice. Zaměřujeme se na vliv látek na jednotlivé kroky kaskády AA (inhibice COX-1, TxA₂ syntasy a antagonismus na thromboxanových receptorech)(72). Stejně jako u chelatace přechodných kovů se nyní věnujeme i testování některých metabolitů flavonoidů. Z rešerše na téma antiagregační aktivita alkaloidů vyplývá, že řada z nich má vliv na agregaci destiček. Jediný alkaloid známý pro jeho antiagregační vlastnosti je papaverin, který je v některých studiích s alkaloidy používán jako standard (149). I přes to, že již bylo testováno více než 100 látek, nelze říci, zda je některá z látek perspektivní pro další výzkum. Většinou se jedná o screening mnoha látek v jedné koncentraci, která bývá nejčastěji 100 µg/ml, což odpovídá koncentraci ve stovkách µM, tedy koncentraci v lidském těle nedosažitelné (150, 151). Otázkou tedy zůstává, jaká je aktivita při nižší koncentraci alkaloidu. V budoucnu tedy budou některé alkaloidy izolované na našem pracovišti podrobeny testování antiagregační aktivity.

V této práci je uvedena řada látek, které mají různé příznivé účinky na řadu procesů v lidském těle. Některé působí na více procesů najednou, a proto budu v budoucnu pokračovat s testováním dalších látek na výše uvedené účinky, kterým z hlediska komplexnosti účinku nebyla dosud věnována širší pozornost, a u látek již testovaných se zaměřím na hlubší studium jejich účinku.

6 Seznam zkratek

AA	Kyselina arachidonová z anglického arachidonic acid
A β	β -Amyloid
ACh	Acetylcholin
AChE	Acetylcholinesterasa
AD	Alzheimerova choroba z anglického Alzheimer disease
ADP	Adenosindifosfát
APP	Amyloid precursor protein
ASA	Kyselina acetylsalicylová z anglického acetylsalicylic acid
BChE	Butyrylcholinesterasa
BMI	index tělesné hmotnosti z anglického Body mass index
COX-1	Cyklooxygenasa 1
ChAT	Cholinacetyltransferasa
ChE	Cholinesterasy
ECGC	(-)-Epigallokatechin-3-gallát
KVO	Kardiovaskulární onemocnění
NFTs	Neurofibrilární klubka z anglického Neurofibrillary tangles
PAF	Destičkový aktivační faktor z anglického platelet activating factor
PRP	Plazma bohatá na destičky z anglického platelet rich plasma
RONS	Reaktivní formy kyslíku a dusíku z anglického reactive oxygen and nitrogen species
TxA ₂	Thromboxan A ₂

7 Literatura

1. Ganesan A. The impact of natural products upon modern drug discovery. *Current opinion in chemical biology*. 2008;12(3):306-17.
2. Newman DJ, Cragg GM. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. *Journal of natural products*. 2016;79(3):629-61.
3. Verpoorte R. Pharmacognosy in the new millennium: leadfinding and biotechnology. *The Journal of pharmacy and pharmacology*. 2000;52(3):253-62.
4. Bazzano LA, He J, Ogden LG, Loria CM, Vupputuri S, Myers L, et al. Fruit and vegetable intake and risk of cardiovascular disease in US adults: the first national health and nutrition examination survey epidemiologic follow-up study. *The American journal of clinical nutrition*. 2002;76(1):93-9.
5. Ding EL, Hutfless SM, Ding X, Girotra S. Chocolate and prevention of cardiovascular disease: a systematic review. *Nutrition & metabolism*. 2006;3:2.
6. Nakachi K, Matsuyama S, Miyake S, Suganuma M, Imai K. Preventive effects of drinking green tea on cancer and cardiovascular disease: epidemiological evidence for multiple targeting prevention. *BioFactors (Oxford, England)*. 2000;13(1-4):49-54.
7. Rimm EB, Klatsky A, Grobbee D, Stampfer MJ. Review of moderate alcohol consumption and reduced risk of coronary heart disease: is the effect due to beer, wine, or spirits. *BMJ (Clinical research ed)*. 1996;312:731-6.
8. Galès-Camus CL, Beaglehole R, Epping-Jordan J. Preventing chronic diseases : a vital investment : WHO global report. Geneve: WHO Press; 2005. 182 p.
9. Bauer UE, Briss PA, Goodman RA, Bowman BA. Prevention of chronic disease in the 21st century: elimination of the leading preventable causes of premature death and disability in the USA. *Lancet (London, England)*. 2014;384(9937):45-52.
10. --- https://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/estimates/en/index1.html. [cited 2019 9.1.]
11. Levav I, Rutz W. The WHO World Health Report 2001 new understanding--new hope. *The Israel journal of psychiatry and related sciences*. 2002;39(1):50-6.
12. Mathers C, Boerma T, Fat DM. The global burden of disease: 2004 update. Geneve: WHO Press; 2008. 146 p.
13. Mladenka P, Macakova K, Zatloukalova L, Rehakova Z, Singh BK, Prasad AK, et al. *In vitro* interactions of coumarins with iron. *Biochimie*. 2010;92(9):1108-14.
14. Riha M, Karlickova J, Filipsky T, Macakova K, Rocha L, Bovicelli P, et al. *In vitro* evaluation of copper-chelating properties of flavonoids. *RSC advances*. 2014;4(62):32628-38.
15. Mladenka P, Macakova K, Filipsky T, Zatloukalova L, Jahodar L, Bovicelli P, et al. *In vitro* analysis of iron chelating activity of flavonoids. *Journal of inorganic biochemistry*. 2011;105(5):693-701.
16. Keli SO, Hertog MG, Feskens EJ, Kromhout D. Dietary flavonoids, antioxidant vitamins, and incidence of stroke: the Zutphen study. *Archives of internal medicine*. 1996;156(6):637-42.
17. Mursu J, Voutilainen S, Nurmi T, Tuomainen TP, Kurl S, Salonen JT. Flavonoid intake and the risk of ischaemic stroke and CVD mortality in middle-aged Finnish men: the Kuopio ischaemic heart disease risk factor study. *The British journal of nutrition*. 2008;100(4):890-5.
18. Cahlikova L, Macakova K, Benesova N, Chlebek J, Hostalkova A, Opletal L. Chapter 6 - Natural compounds (small molecules) as potential and real drugs of Alzheimer's disease: A critical review. In: Atta ur R, editor. *Studies in natural products chemistry*. 42: Elsevier; 2014. p. 153-94.
19. Waris G, Ahsan H. Reactive oxygen species: role in the development of cancer and various chronic conditions. *Journal of carcinogenesis*. 2006;5:14.
20. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free radicals in biology and medicine*: OUP Oxford; 2015.
21. Mladenka P, Zatloukalova L, Filipsky T, Hrdina R. Cardiovascular effects of flavonoids are not caused only by direct antioxidant activity. *Free radical biology & medicine*. 2010;49(6):963-75.

22. Lee R, Margaritis M, Channon KM, Antoniades C. Evaluating oxidative stress in human cardiovascular disease: methodological aspects and considerations. *Current medicinal chemistry*. 2012;19(16):2504-20.
23. Tsutsui H, Kinugawa S, Matsushima S. Oxidative stress and heart failure. *American journal of physiology-Heart and circulatory physiology*. 2011;301(6):H2181-90.
24. Indo HP, Yen H-C, Nakanishi I, Matsumoto K-i, Tamura M, Nagano Y, et al. A mitochondrial superoxide theory for oxidative stress diseases and aging. *Journal of clinical biochemistry and nutrition*. 2015;56(1):1-7.
25. Huang WJ, Zhang X, Chen WW. Role of oxidative stress in Alzheimer's disease. *Biomedical reports*. 2016;4(5):519-22.
26. Zhao Y, Zhao B. Oxidative stress and the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2013;2013:316523.
27. Smith DG, Cappai R, Barnham KJ. The redox chemistry of the Alzheimer's disease amyloid beta peptide. *Biochimica et biophysica acta*. 2007;1768(8):1976-90.
28. Butterfield DA, Boyd-Kimball D. Oxidative stress, amyloid-beta peptide, and altered key molecular pathways in the pathogenesis and progression of Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's disease*. 2018;62(3):1345-67.
29. Rivera-Mancia S, Perez-Neri I, Rios C, Tristan-Lopez L, Rivera-Espinosa L, Montes S. The transition metals copper and iron in neurodegenerative diseases. *Chemico-biological interactions*. 2010;186(2):184-99.
30. Valko M, Jomova K, Rhodes CJ, Kuca K, Musilek K. Redox- and non-redox-metal-induced formation of free radicals and their role in human disease. *Archives of toxicology*. 2016;90(1):1-37.
31. Jomova K, Valko M. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology*. 2011;283(2):65-87.
32. Kozłowski H, Janicka-Kłos A, Brasun J, Gaggelli E, Valensin D, Valensin G. Copper, iron, and zinc ions homeostasis and their role in neurodegenerative disorders (metal uptake, transport, distribution and regulation). *Coordination chemistry reviews*. 2009;253(21):2665-85.
33. Ambrosio G, Zweier JL, Jacobus WE, Weisfeldt ML, Flaherty JT. Improvement of postischemic myocardial function and metabolism induced by administration of deferoxamine at the time of reflow: the role of iron in the pathogenesis of reperfusion injury. *Circulation*. 1987;76(4):906-15.
34. Strain JJ. Newer aspects of micronutrients in chronic disease: copper. *The Proceedings of the Nutrition society*. 1994;53(3):583-98.
35. Liu G, Men P, Harris PL, Rolston RK, Perry G, Smith MA. Nanoparticle iron chelators: a new therapeutic approach in Alzheimer disease and other neurologic disorders associated with trace metal imbalance. *Neuroscience letters*. 2006;406(3):189-93.
36. Ebrahimzadeh MA, Nabavi SM, Nabavi SF. Correlation between the *in vitro* iron chelating activity and poly phenol and flavonoid contents of some medicinal plants. *Pakistan journal of biological sciences*. 2009;12(12):934-8.
37. Filipisky T, Riha M, Macakova K, Anzenbacherova E, Karlickova J, Mladenka P. Antioxidant effects of coumarins include direct radical scavenging, metal chelation and inhibition of ROS-producing enzymes. *Current topics in medicinal chemistry*. 2015;15(5):415-31.
38. Terao J. Dietary flavonoids as antioxidants. *Forum of nutrition*. 2009;61:87-94.
39. Leonarduzzi G, Testa G, Sottero B, Gamba P, Poli G. Design and development of nanovehicle-based delivery systems for preventive or therapeutic supplementation with flavonoids. *Current medicinal chemistry*. 2010;17(1):74-95.
40. Xu D-P, Li Y, Meng X, Zhou T, Zhou Y, Zheng J, et al. Natural antioxidants in foods and medicinal plants: extraction, assessment and resources. *International journal of molecular sciences*. 2017;18(1):96.
41. Macakova K, Mladenka P, Filipisky T, Riha M, Jahodar L, Trejtnar F, et al. Iron reduction potentiates hydroxyl radical formation only in flavonols. *Food chemistry*. 2012;135(4):2584-92.
42. Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of nutritional biochemistry*. 2002;13(10):572-84.

43. Karlickova J, Macakova K, Riha M, Pinheiro LM, Filipicky T, Hornasova V, et al. Isoflavones reduce copper with minimal impact on iron *in vitro*. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2015;2015:437381.
44. Wei Y, Guo M. Zinc-binding sites on selected flavonoids. *Biological trace element research*. 2014;161(2):223-30.
45. Quesada IM, Bustos M, Blay M, Pujadas G, Ardevol A, Salvado MJ, et al. Dietary catechins and procyanidins modulate zinc homeostasis in human HepG2 cells. *The Journal of nutritional biochemistry*. 2011;22(2):153-63.
46. Catapano MC, Tvrdy V, Karlickova J, Mercolini L, Mladenka P. A simple, cheap but reliable method for evaluation of zinc chelating properties. *Bioorganic Chemistry*. 2018;77:287-92.
47. Paya M, Halliwell B, Houlst JR. Interactions of a series of coumarins with reactive oxygen species. Scavenging of superoxide, hypochlorous acid and hydroxyl radicals. *Biochemical pharmacology*. 1992;44(2):205-14.
48. Raj HG, Parmar VS, Jain SC, Goel S, Poonam, Himanshu, et al. Mechanism of biochemical action of substituted 4-methylbenzopyran-2-ones. Part I: Dioxygenated 4-methyl coumarins as superb antioxidant and radical scavenging agents. *Bioorganic & medicinal chemistry*. 1998;6(6):833-9.
49. Thuong PT, Hung TM, Ngoc TM, Ha do T, Min BS, Kwack SJ, et al. Antioxidant activities of coumarins from Korean medicinal plants and their structure-activity relationships. *Phytotherapy research*. 2010;24(1):101-6.
50. Lin HC, Tsai SH, Chen CS, Chang YC, Lee CM, Lai ZY, et al. Structure-activity relationship of coumarin derivatives on xanthine oxidase-inhibiting and free radical-scavenging activities. *Biochemical pharmacology*. 2008;75(6):1416-25.
51. Catapano MC, Karlickova J, Tvrdy V, Sharma S, Prasad AK, Saso L, et al. Mono and dihydroxy coumarin derivatives: Copper chelation and reduction ability. *Journal of trace elements in medicine and biology*. 2018;46:88-95.
52. Rehakova Z, Koleckar V, Jahodar L, Opletal L, Macakova K, Cahlikova L, et al. Evaluation of the antioxidant activity of several naturally occurring coumarins and their synthesized analogues by "ferric reducing antioxidant power" assay. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*. 2014;29(1):49-54.
53. Go AS, Mozaffarian D, Roger VL, Benjamin EJ, Berry JD, Borden WB, et al. Heart disease and stroke statistics--2013 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*. 2013;127(1):e6-e245.
54. Golan DE, Armstrong EJ, Armstrong AW. *Principles of pharmacology : the pathophysiologic basis of drug therapy*. New York: Lippincott Williams & Wilkins, 2017, 954 p.
55. Gawaz M. Role of platelets in coronary thrombosis and reperfusion of ischemic myocardium. *Cardiovascular research*. 2004;61(3):498-511.
56. Angiolillo DJ, Capranzano P, Goto S, Aslam M, Desai B, Charlton RK, et al. A randomized study assessing the impact of cilostazol on platelet function profiles in patients with diabetes mellitus and coronary artery disease on dual antiplatelet therapy: results of the OPTIMUS-2 study. *European heart journal*. 2008;29(18):2202-11.
57. J Angiolillo D. The evolution of antiplatelet therapy in the treatment of acute coronary syndromes. *Drugs*. 2012;72(16): 2087-116.
58. Fuentes E, Palomo I. Antiplatelet effects of natural bioactive compounds by multiple targets: Food and drug interactions. *Journal of functional foods*. 2014;6:73-81.
59. Ku SK, Bae JS. Antiplatelet, anticoagulant, and profibrinolytic activities of withaferin A. *Vascular pharmacology*. 2014;60(3):120-6.
60. Atanassov A, Tchorbanov B. Synthetic and natural peptides as antithrombotic agents—A view on the current development. *Biotechnology & biotechnological equipment*. 2009;23(1):1109-14.
61. Wang S, Melnyk JP, Tsao R, Marccone MF. How natural dietary antioxidants in fruits, vegetables and legumes promote vascular health. *Food research international*. 2011;44(1):14-22.

62. Ostertag LM, O'Kennedy N, Horgan GW, Kroon PA, Duthie GG, de Roos B. *In vitro* anti-platelet effects of simple plant-derived phenolic compounds are only found at high, non-physiological concentrations. *Molecular nutrition & food research*. 2011;55(11):1624-36.
63. Bojic M, Debeljak Z, Tomicic M, Medic-Saric M, Tomic S. Evaluation of antiaggregatory activity of flavonoid aglycone series. *Nutrition journal*. 2011;10:73.
64. Paganga G, Rice-Evans CA. The identification of flavonoids as glycosides in human plasma. *FEBS letters*. 1997;401(1):78-82.
65. Erlund I, Silaste ML, Alfthan G, Rantala M, Kesaniemi YA, Aro A. Plasma concentrations of the flavonoids hesperetin, naringenin and quercetin in human subjects following their habitual diets, and diets high or low in fruit and vegetables. *European journal of clinical nutrition*. 2002;56(9):891-8.
66. Guo C, Liu S, Guo Y, Yin Y, Lin J, Chen X, et al. Comparative function-structural analysis of antiplatelet and antiradical activities of flavonoid phytochemicals. *The journal of animal & plant sciences*. 2014;24(3): 926-35.
67. Koleckar V, Brojerova E, Rehakova Z, Kubikova K, Cervenka F, Kuca K, et al. *In vitro* antiplatelet activity of flavonoids from *Leuzea carthamoides*. *Drug and chemical toxicology*. 2008;31(1):27-35.
68. Sheu JR, Hsiao G, Chou PH, Shen MY, Chou DS. Mechanisms involved in the antiplatelet activity of rutin, a glycoside of the flavonol quercetin, in human platelets. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2004;52(14):4414-8.
69. Jin YR, Han XH, Zhang YH, Lee JJ, Lim Y, Chung JH, et al. Antiplatelet activity of hesperetin, a bioflavonoid, is mainly mediated by inhibition of PLC-gamma2 phosphorylation and cyclooxygenase-1 activity. *Atherosclerosis*. 2007;194(1):144-52.
70. Ryu R, Jung UJ, Kim HJ, Lee W, Bae JS, Park YB, et al. Anticoagulant and antiplatelet activities of *Artemisia princeps* Pampanini and its bioactive components. *Preventive nutrition and food science*. 2013;18(3):181-7.
71. Karlickova J, Riha M, Filipsky T, Macakova K, Hrdina R, Mladenka P. Antiplatelet effects of flavonoids mediated by inhibition of arachidonic acid based pathway. *Planta medica*. 2016;82(1-2):76-83.
72. Applova L, Karlickova J, Riha M, Filipsky T, Macakova K, Spilkova J, et al. The isoflavonoid tectorigenin has better antiplatelet potential than acetylsalicylic acid. *Phytomedicine*. 2017;35:11-7.
73. El Haouari M, Rosado JA. Modulation of platelet function and signaling by flavonoids. *Mini reviews in medicinal chemistry*. 2011;11(2):131-42.
74. Chen IS, Lin YC, Tsai IL, Teng CM, Ko FN, Ishikawa T, et al. Coumarins and anti-platelet aggregation constituents from *Zanthoxylum schinifolium*. *Phytochemistry*. 1995;39(5):1091-7.
75. Chen Y-J, Chen PY, Wu CC, Tsai IL, Chen IS. Chemical constituents and anti-platelet aggregation activity from the root of *Peucedanum formosanum*. *Journal of food and drug analysis*. 2008;16(3):15-25.
76. Macakova K, Rehakova Z, Mladenka P, Karlickova J, Filipsky T, Riha M, et al. *In vitro* platelet antiaggregatory properties of 4-methylcoumarins. *Biochimie*. 2012;94(12):2681-6.
77. Hoult JR, Paya M. Pharmacological and biochemical actions of simple coumarins: natural products with therapeutic potential. *General pharmacology*. 1996;27(4):713-22.
78. Wu L, Wang X, Xu W, Farzaneh F, Xu R. The structure and pharmacological functions of coumarins and their derivatives. *Current medicinal chemistry*. 2009;16(32):4236-60.
79. Sekiya K, Okuda H, Arichi S. Selective inhibition of platelet lipoyxygenase by esculetin. *Biochimica et biophysica acta*. 1982;713(1):68-72.
80. Natarajan S, Shunmugiah KP, Kasi PD. Plants traditionally used in age-related brain disorders (dementia): an ethanopharmacological survey. *Pharmaceutical biology*. 2013;51(4):492-523.
81. Herrera-Rivero M. Late-onset Alzheimer's disease: Risk factors, clinical diagnosis and the search for biomarkers. *Neurodegenerative diseases*. Uday Kishore: IntechOpen; 2013. p. 35-53.

82. Vazhayil BK, Sundaram RS, Annapandian VM, Abhirama BR, Sudha M, Thiyagarajan T, et al. Natural products and its derived drugs for the treatment of neurodegenerative disorders: Alzheimer's disease-a review. *British biomedical bulletin*. 2014;2(2):359-70.
83. Maurer K, Ihl R, Dierks T, Frolich L. Clinical efficacy of *Ginkgo biloba* special extract EGb 761 in dementia of the Alzheimer type. *Phytomedicine*. 1998;5(6):417-24.
84. Adams M, Gmunder F, Hamburger M. Plants traditionally used in age related brain disorders--a survey of ethnobotanical literature. *Journal of ethnopharmacology*. 2007;113(3):363-81.
85. Mukherjee PK, Satheeshkumar N, Venkatesh P, Venkatesh M. Lead finding for acetyl cholinesterase inhibitors from natural origin: structure activity relationship and scope. *Mini reviews in medicinal chemistry*. 2011;11(3):247-62.
86. Williams P, Sorribas A, Howes MJ. Natural products as a source of Alzheimer's drug leads. *Natural product reports*. 2011;28(1):48-77.
87. Anand P, Singh B, Singh N. A review on coumarins as acetylcholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. *Bioorganic & medicinal chemistry*. 2012;20(3):1175-80.
88. Zhan G, Zhou J, Liu J, Huang J, Zhang H, Liu R, et al. Acetylcholinesterase inhibitory alkaloids from the whole plants of *Zephyranthes carinata*. *Journal of natural products*. 2017;80(9):2462-71.
89. Kulhankova A, Cahlikova L, Novak Z, Macakova K, Kunes J, Opletal L. Alkaloids from *Zephyranthes robusta* BAKER and their acetylcholinesterase- and butyrylcholinesterase-inhibitory activity. *Chemistry & biodiversity*. 2013;10(6):1120-7.
90. Vaneckova N, Hostalkova A, Safratova M, Kunes J, Hulcova D, Hrabnova M, et al. Isolation of Amaryllidaceae alkaloids from *Nerine bowdenii* W. Watson and their biological activities. *RSC advances*. 2016;6(83):80114-20.
91. Ortiz JE, Pigni NB, Andujar SA, Roitman G, Suvire FD, Enriz RD, et al. Alkaloids from *Hippeastrum argentinum* and their cholinesterase-inhibitory activities: An *in vitro* and *in silico* study. *Journal of natural products*. 2016;79(5):1241-8.
92. Tallini LR, Torras-Claveria L, Borges WDS, Kaiser M, Viladomat F, Zuanazzi JAS, et al. N-oxide alkaloids from *Crinum amabile* (Amaryllidaceae). *Molecules*. 2018;23(6):1277.
93. Adewusi EA, Fouche G, Steenkamp V. Cytotoxicity and acetylcholinesterase inhibitory activity of an isolated crinine alkaloid from *Boophane disticha* (Amaryllidaceae). *Journal of ethnopharmacology*. 2012;143(2):572-8.
94. Emir A, Emir C, Bozkurt B, Ali Onur M, Bastida J, Unver Somer N. Alkaloids from *Galanthus fosteri*. *Phytochemistry letters*. 2016;17:167-72.
95. Zhu Y-Y, Li X, Yu H-Y, Xiong Y-F, Zhang P, Pi H-F, et al. Alkaloids from the bulbs of *Lycoris longituba* and their neuroprotective and acetylcholinesterase inhibitory activities. *Archives of pharmacal research*. 2015;38(5):604-13.
96. Lee J, MR C, JE L, J K, H C, WK P, et al. A New Amaryllidaceae alkaloid from the bulbs of *Lycoris radiata*. *Bulletin of the Korean chemical society*. 2014;35(12):3665-7.
97. Kang SY, Lee KY, Sung SH, Park MJ, Kim YC. Coumarins isolated from *Angelica gigas* inhibit acetylcholinesterase: structure-activity relationships. *Journal of natural products*. 2001;64(5):683-5.
98. Murray AP, Faraoni MB, Castro MJ, Alza NP, Cavallaro V. Natural AChE inhibitors from plants and their contribution to Alzheimer's disease therapy. *Current neuropharmacology*. 2013;11(4):388-413.
99. Sheng R, Lin X, Zhang J, Chol KS, Huang W, Yang B, et al. Design, synthesis and evaluation of flavonoid derivatives as potent AChE inhibitors. *Bioorganic & medicinal chemistry*. 2009;17(18):6692-8.
100. López S, Bastida J, Viladomat F, Codina C. Acetylcholinesterase inhibitory activity of some Amaryllidaceae alkaloids and *Narcissus* extracts. *Life sciences*. 2002;71(21):2521-9.
101. Cahlikova L, Hrabnova M, Kulhankova A, Benesova N, Chlebek J, Jun D, et al. Alkaloids from *Chlidanthus fragrans* and their acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase and prolyl oligopeptidase activities. *Natural product communications*. 2013;8(11):1541-4.

102. Safratova M, Novak Z, Kulhankova A, Kunes J, Hrabínova M, Jun D, et al. Revised NMR data for 9-O-demethylgalanthine: an alkaloid from *Zephyranthes robusta* (Amaryllidaceae) and its biological activity. *Natural product communications*. 2014;9(6):787-8.
103. Mukherjee PK, Kumar V, Mal M, Houghton PJ. Acetylcholinesterase inhibitors from plants. *Phytomedicine*. 2007;14(4):289-300.
104. Berkov S, Codina C, Viladomat F, Bastida J. N-Alkylated galanthamine derivatives: Potent acetylcholinesterase inhibitors from *Leucojum aestivum*. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*. 2008;18(7):2263-6.
105. de Andrade JP, Giordani RB, Torras-Claveria L, Pigni NB, Berkov S, Font-Bardia M, et al. The Brazilian Amaryllidaceae as a source of acetylcholinesterase inhibitory alkaloids. *Phytochemistry reviews*. 2016;15(1):147-60.
106. Iannello C, Pigni NB, Antognoni F, Poli F, Maxia A, de Andrade JP, et al. A potent acetylcholinesterase inhibitor from *Pancratium illyricum* L. *Fitoterapia*. 2014;92:163-7.
107. Elgorashi EE, Malan SF, Stafford GI, van Staden J. Quantitative structure–activity relationship studies on acetylcholinesterase enzyme inhibitory effects of Amaryllidaceae alkaloids. *South African journal of botany*. 2006;72(2):224-31.
108. Nair JJ, van Staden J. Acetylcholinesterase inhibition within the lycorine series of Amaryllidaceae alkaloids. *Natural product communications*. 2012;7(7):959-62.
109. Ingkaninan K, Hazekamp A, de Best CM, Irth H, Tjaden UR, van der Heijden R, et al. The application of HPLC with on-line coupled UV/MS-biochemical detection for isolation of an acetylcholinesterase inhibitor from narcissus 'Sir Winston Churchill'. *Journal of natural products*. 2000;63(6):803-6.
110. Rhee IK, Appels N, Hofte B, Karabatak B, Erkelens C, Stark LM, et al. Isolation of the acetylcholinesterase inhibitor ungeremine from *Nerine bowdenii* by preparative HPLC coupled on-line to a flow assay system. *Biological & pharmaceutical bulletin*. 2004;27(11):1804-9.
111. Li M, Wang MY, Li X. Chemical constituents and biological activities of genus *Hosta* (Liliaceae). *Journal of medicinal plants research*. 2012;6(14): 2704-13.
112. Ahmad I, Anis I, Malik A, Nawaz SA, Choudhary MI. Cholinesterase inhibitory constituents from *Onosma hispida*. *Chemical & pharmaceutical bulletin*. 2003;51(4):412-4.
113. Katalinic M, Rusak G, Domacinovic Barovic J, Sinko G, Jelic D, Antolovic R, et al. Structural aspects of flavonoids as inhibitors of human butyrylcholinesterase. *European journal of medicinal chemistry*. 2010;45(1):186-92.
114. Guo AJ, Xie HQ, Choi RC, Zheng KY, Bi CW, Xu SL, et al. Galangin, a flavonol derived from *Rhizoma Alpiniae Officinarum*, inhibits acetylcholinesterase activity *in vitro*. *Chemico-biological interactions*. 2010;187(1-3):246-8.
115. Balkis A, Tran K, Lee YZ, Ng K. Screening flavonoids for inhibition of acetylcholinesterase identified baicalein as the most potent inhibitor. *Journal of agricultural science*. 2015;7(9):26-35.
116. Gocer H, Topal F, Topal M, Küçük M, Teke D, Gülçin İ, et al. Acetylcholinesterase and carbonic anhydrase isoenzymes I and II inhibition profiles of taxifolin. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*. 2016;31(3):441-7.
117. Liu H-r, Men X, Gao X-h, Liu L-b, Fan H-q, Xia X-h, et al. Discovery of potent and selective acetylcholinesterase (AChE) inhibitors: acacetin 7-O-methyl ether Mannich base derivatives synthesised from easy access natural product naringin. *Natural product research*. 2018;32(6):743-7.
118. Ozgun DO, Yamali C, Gul HI, Taslimi P, Gulcin I, Yanik T, et al. Inhibitory effects of isatin Mannich bases on carbonic anhydrases, acetylcholinesterase, and butyrylcholinesterase. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*. 2016;31(6):1498-501.
119. de Souza LG, Renna MN, Figueroa-Villar JD. Coumarins as cholinesterase inhibitors: A review. *Chemico-biological interactions*. 2016;254:11-23.
120. Awang K, Chan G, Litaudon M, Ismail NH, Martin M-T, Gueritte F. 4-Phenylcoumarins from *Mesua elegans* with acetylcholinesterase inhibitory activity. *Bioorganic & medicinal chemistry*. 2010;18(22):7873-7.

121. Miyazawa M, Tsukamoto T, Anzai J, Ishikawa Y. Insecticidal effect of phthalides and furanocoumarins from *Angelica acutiloba* against *Drosophila melanogaster*. Journal of agricultural and food chemistry. 2004;52(14):4401-5.
122. Rollinger JM, Hornick A, Langer T, Stuppner H, Prast H. Acetylcholinesterase inhibitory activity of scopolin and scopoletin discovered by virtual screening of natural products. Journal of medicinal chemistry. 2004;47(25):6248-54.
123. Barbosa Filho J, C. Paula Medeiros K, de Fátima F.M. Diniz M, Batista L, Athayde-Filho P, S. Silva M, et al. Natural products inhibitors of the enzyme acetylcholinesterase. Revista Brasileira de farmacognosia. 2006;16(2):258-85.
124. Ali MY, Jannat S, Jung HA, Choi RJ, Roy A, Choi JS. Anti-Alzheimer's disease potential of coumarins from *Angelica decursiva* and *Artemisia capillaris* and structure-activity analysis. Asian Pacific journal of tropical medicine. 2016;9(2):103-11.
125. Ali MY, Seong SH, Jung HA, Jannat S, Choi JS. Kinetics and molecular docking of dihydroxanthyletin-type coumarins from *Angelica decursiva* that inhibit cholinesterase and BACE1. Archives of pharmacal research. 2018;41(7):753-64.
126. Kwon Y, Kim HP, Kim MJ, Chun W. Acetylcholinesterase inhibitors from *Angelica polymorpha* stem. Natural product sciences. 2017;23(2):97-102.
127. Güvenalp Z, Özbek H, Özden Yerdelen K, Yilmaz G, Kazaz C, Demirezer LÖ. Cholinesterase inhibition and molecular docking studies of sesquiterpene coumarin ethers from *Heptaptera cilicica*. Records of natural products. 2017;11(5):462-7.
128. Özbek H, Güvenalp Z, Yilmaz G, Yerdelen KÖ, Kazaz C, Demirezer ÖL. *In vitro* anticholinesterase activity and molecular docking studies of coumarin derivatives isolated from roots of *Heptaptera cilicica*. Medicinal chemistry research. 2018;27(2):538-45.
129. Garcia-Garcia R, Lopez-Malo A, Palou E. Bactericidal action of binary and ternary mixtures of carvacrol, thymol, and eugenol against *Listeria innocua*. Journal of food science. 2011;76(2):M95-100.
130. Bassole IH, Lamien-Meda A, Bayala B, Tirogo S, Franz C, Novak J, et al. Composition and antimicrobial activities of *Lippia multiflora* Moldenke, *Mentha x piperita* L. and *Ocimum basilicum* L. essential oils and their major monoterpene alcohols alone and in combination. Molecules. 2010;15(11):7825-39.
131. Fraser MD, Davies JR, Chang X. New gold in Them Thar Hills: Testing a novel supply route for plant-derived galanthamine. Journal of Alzheimer's disease. 2017;55(4):1321-5.
132. Zheng H, Fridkin M, Youdim M. New approaches to treating Alzheimer's disease. Perspectives in Medicinal Chemistry. 2015;7:1-8.
133. Kumar A, Singh A, Ekavali. A review on Alzheimer's disease pathophysiology and its management: an update. Pharmacological reports. 2015;67(2):195-203.
134. Godyń J, Jończyk J, Panek D, Malawska B. Therapeutic strategies for Alzheimer's disease in clinical trials. Pharmacological reports. 2016;68(1):127-38.
135. Hulcova D, Breiterova K, Siatka T, Klimova K, Davani L, Safratova M, et al. Amaryllidaceae alkaloids as potential glycogen synthase kinase-3 β inhibitors. Molecules. 2018;23(4):719.
136. Chlebek J, De Simone A, Hostalkova A, Opletal L, Pérez C, Pérez DI, et al. Application of BACE1 immobilized enzyme reactor for the characterization of multifunctional alkaloids from *Corydalis cava* (Fumariaceae) as Alzheimer's disease targets. Fitoterapia. 2016;109:241-7.
137. Carochi M, Ferreira ICFR. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. Food and chemical toxicology. 2013;51:15-25.
138. Schieber M, Chandel NS. ROS function in redox signaling and oxidative stress. Current biology. 2014;24(10):R453-R62.
139. Steffen Y, Gruber C, Schewe T, Sies H. Mono-O-methylated flavanols and other flavonoids as inhibitors of endothelial NADPH oxidase. Archives of biochemistry and biophysics. 2008;469(2):209-19.

140. Lin S, Zhang G, Liao Y, Pan J, Gong D. Dietary flavonoids as xanthine oxidase inhibitors: Structure–affinity and structure–activity relationships. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2015;63(35):7784-94.
141. Macakova K, Afonso R, Saso L, Mladenka P. The influence of alkaloids on oxidative stress and related signaling pathways. *Free radical biology & medicine*. 2019;in press.
142. Macakova K, Catapano MC, Tvrđy V, Klimkova K, Karlickova J, Mladenka P. Hematoxylin assay of cupric chelation can give false positive results. *Journal of trace elements in medicine and biology*. 2019; 52: 29-36.
143. Cassidy A, Minihane A-M. The role of metabolism (and the microbiome) in defining the clinical efficacy of dietary flavonoids. *The American journal of clinical nutrition*. 2017;105(1):10-22.
144. Zahari A, Ablat A, Sivasothy Y, Mohamad J, Choudhary MI, Awang K. *In vitro* antiplasmodial and antioxidant activities of bisbenzylisoquinoline alkaloids from *Alseodaphne corneri* Kosterm. *Asian Pacific journal of tropical medicine*. 2016;9(4):328-32.
145. Gülçin İ, Elias R, Gepdiremen A, Chea A, Topal F. Antioxidant activity of bisbenzylisoquinoline alkaloids from *Stephania rotunda*: cepharanthine and fangchinoline. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*. 2010;25(1):44-53.
146. Nasrullah AA, Zahari A, Mohamad J, Awang K. Antiplasmodial alkaloids from the bark of *Cryptocarya nigra* (Lauraceae). *Molecules*. 2013;18(7):8009.
147. Faggio C, Sureda A, Morabito S, Sanches-Silva A, Mocan A, Nabavi SF, et al. Flavonoids and platelet aggregation: A brief review. *European journal of pharmacology*. 2017;807:91-101.
148. Khan H, Jawad M, Kamal MA, Baldi A, Xiao J, Nabavi SM, et al. Evidence and prospective of plant derived flavonoids as antiplatelet agents: Strong candidates to be drugs of future. *Food and chemical toxicology*. 2018;119:355-67.
149. Watanabe S, Morimoto Y, Shiraishi N, Sano A, Utsumi K. The inhibition of platelet aggregation by biscoclaurine alkaloids. *Cell structure and function*. 1981;6(3):263-7.
150. Chen KS, Ko FN, Teng CM, Wu YC. Antiplatelet and vasorelaxing actions of some aporphinoids. *Planta medica*. 1996;62(2):133-6.
151. Ain QU, Khan H, Mubarak MS, Pervaiz A. Plant alkaloids as antiplatelet agent: Drugs of the future in the light of recent developments. *Frontiers in pharmacology*. 2016;7:292.

8 Tématické publikace předkladatelky

8.1 Přímé a nepřímé antioxidační účinky

Cit. 13 Mladenka P, Macakova K, Zatloukalova L, Rehakova Z, Singh BK, Prasad AK, Parmar VS, Jahodar L, Hrdina R, Saso L. *In vitro* interactions of coumarins with iron. *Biochimie*, 2010, 92, 1108-1114.

Cit. 14 Riha M, Karlickova J, Filipicky T, Macakova K, Rocha L, Bovicelli P, Silvestri IP, Saso L, Jahodar L, Hrdina R, Mladenka P. *In vitro* evaluation of copper-chelating properties of flavonoids. *RSC Adv*, 2014, 4, 32628-32638.

Cit. 15 Mladenka P, Macakova K, Filipicky T, Zatloukalova L, Jahodar L, Bovicelli P, Silvestri IP, Hrdina R, Saso L. *In vitro* analysis of iron chelating activity of flavonoids. *J Inorg Biochem*, 2011, 105, 693-701.

Cit. 41 Macakova K, Mladenka P, Filipicky T, Riha M, Jahodar L, Trejtnar F, Bovicelli P, Silvestri IP, Hrdina R, Saso L. Iron reduction potentiates hydroxyl radical formation only in flavonols. *Food Chem*, 2012, 135, 2584-2592.

Cit. 43 Karlickova J, Macakova K, Riha M, Pinheiro LM, Filipicky T, Hornasova V, Hrdina R, Mladenka P. Isoflavones reduce copper with minimal impact on iron *in vitro*. *Oxid Med Cell Longev*, 2015, vol. 2015, id. 437381.

Cit. 52 Rehakova Z, Koleckar V, Jahodar L, Opletal L, Macakova K, Cahlikova L, Jun D, Kuca K. Evaluation of the antioxidant activity of several naturally occurring coumarins and their synthesized analogues by „ferric reducing antioxidant power“ assay. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 2014, 29(1), 49-54.

Cit. 141 Macakova K, Afonso R, Saso L, Mladenka P. The influence of alkaloids on oxidative stress and related signaling pathways. *Free Rad Biol Med*, 2019, in press.

Cit. 142 Macakova K, Catapano MC, Tvrdy V, Klimkova K, Karlickova J, Mladenka P. Hematoxylin assay of cupric chelation can give false positive results. *J Trace Elem Med Biol*, 2019, 52, 29-36.

8.2 Agregace krevních destiček

Cit 67 Kolečkar V, Brojerova E, Rehakova Z, Kubikova K, Cervenka F, Kuca K, Jun D, Hronek M, Opletalova V, Opletal L. *In vitro* antiplatelet activity of flavonoids from *Leuzea carthamoides*. *Drug Chem Toxicol*, 2008, 31, 27-35.

Cit 71 Karlickova J, Riha M, Filipicky T, Macakova K, Hrdina R, Mladenka P. Antiplatelet effects of flavonoids mediated by inhibition of arachidonic acid based pathway. *Planta Med*, 2016, vol. 82, no. 1-2, pp. 76-83.

Cit 72 Applova L, Karlickova J, Riha M, Filipicky T, Macakova K, Spilkova J, Mladenka P. The isoflavonoid tectorigenin has better antiplatelet potential than acetylsalicylic acid. *Phytomedicine*, 2017, vol. 35, pp. 11-7.

Cit 76 Macakova K, Rehakova Z, Mladenka P, Karlickova J, Filipicky T, Riha M, Prasad AK, Parmar VS, Jahodar L, Pavek P, Hrdina R, Saso L. *In vitro* platelet antiaggregatory properties of 4-methylcoumarins. *Biochimie*, 2012, 94, 2681-2686.

8.3 Alzheimerova choroba

Cit. 18 Cahlikova L, Macakova K, Benesova N, Chlebek J, Hostalkova A, Opletal L. Chapter 6 - Natural compounds (small molecules) as potential and real drugs of Alzheimer's disease: A critical review. In: Atta ur R, editor. *Studies in natural products chemistry*. 42: Elsevier; 2014. p. 153-94.

Cit. 89 Kulhankova A, Cahlikova L, Novak Z, Macakova K, Kunes J, Opletal L. Alkaloids from *Zephyranthes robusta* BAKER and their acetylcholinesterase- and butyrylcholinesterase-inhibitory activity. *Chem Biodiv*, 2013, vol. 10, pp. 1120-1127.

Cit. 101 Cahlikova L, Hrabnova M, Kulhankova A, Benesova N, Chlebek J, Jun D, Novak Z, Macakova K, Kunes J, Kuca K, Opletal L. Alkaloids from *Chlidanthus fragrans* and their acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase and prolyl oligopeptidase activities. *Nat Prod Commun*, 2013, 8(11), 1541-1544.

Cit. 102 Safratova M, Novak Z, Kluhankova A, Kunes J, Hrabnova M, Jun D, Macakova K, Opletal L, Cahlikova L. Revised NMR data for 9-o-demethylgalanthine: an alkaloid from

Zephyranthes robusta (Amaryllidaceae) and its biological activity. *Nat Prod Commun*, 2014, vol. 9, no. 6, pp. 787-788.