

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

---

RIGORÓZNÍ PRÁCE

**BIOLOGICKÁ AKTIVITA OBSAHOVÝCH LÁTEK ROSTLIN XV.  
VLIV ALKALOIDŮ Z *CHELIDONIUM MAJUS* L. NA  
ACETYLCHOLINESTERÁZU**

**BIOLOGICAL ACTIVITY OF PLANT METABOLITES XV.  
INFLUENCE OF ALKALOIDS FROM *CHELIDONIUM MAJUS* L. ON  
ACETYLCHOLINESTERASE**

Školitel: doc. RNDr. Lubomír Opletal, CSc.

HRADEC KRÁLOVÉ, ZÁŘÍ 2007

Mgr. JANA NAGYOVÁ

Děkuji panu doc. RNDr. Lubomíru Opletalovi, CSc. za vedení, odbornou literaturu, materiály, poskytnutí cenných rad, zkušeností a připomínek při vypracování mé rigorózní práce a rovněž ostatním pracovníkům Katedry farmaceutické botaniky a ekologie. Zároveň děkuji panu doc. RNDr. Lubomíru Opletalovi, CSc a dalším třem doktorandkám Mgr. Šárce Bryndové, Mgr. Evě Vítkové a Mgr. Dagmar Kubincové za spolupráci při přípravě jednotlivých výřepků. Dále děkuji Mgr. Danielu Junovi, PhD. (Univerzita obrany v Praze, fakulta vojenského zdravotnictví v Hradci Králové) za změření biologické aktivity izolované látky a propracování použité metody. A také děkuji svým rodičům a příteli Radkovi.

## OBSAH

<b>1. ÚVOD</b>	6
<b>2. CÍL PRÁCE</b>	8
<b>3. TEORETICKÁ ČÁST</b>	10
<b>3.1. Alzheimerova demence (AD)</b>	11
3.1.1. Rizikové faktory	11
3.1.2. Anatomické změny, diagnóza a patogeneze	12
3.1.3. Terapie	13
3.1.3.1. Farmakoterapie kognitivních poruch	14
3.1.3.1.1. Látky ovlivňující acetylcholinergní systém	14
3.1.3.1.2. Látky likvidující volné kyslíkové radikály nebo tlumící jejich nadměrnou tvorbu	16
3.1.3.1.3. Látky tlumící excitotoxicitu	17
3.1.3.1.4. Látky zlepšující neuronální metabolismus	17
3.1.3.1.5. Protizánětlivé látky, estrogeny a statiny	18
3.1.3.2. Farmakoterapie nekognitivních poruch	18
<b>3.2. Vliv acetylcholinesterázy a butyrylcholinesterázy</b>	18
<b>3.3. Inhibitory acetylcholinesterázy (AChEI)</b>	19
<b>3.4. Vlaštovičník větší – <i>Chelidonium majus</i> L.</b>	20
3.4.1. Systematika	20
3.4.2. Lidové názvy vlaštovičníku většího	20
3.4.3. Botanický popis	21
3.4.4. Původ a rozšíření	21
3.4.5. Obsahové látky	22
3.4.5.1. Alkaloidy	22
3.4.5.2. Nealkaloidní sekundární metabolity	26
3.4.6. Účinnost a působení	26
3.4.7. Využití drogy v lidovém léčitelství	29
3.4.8. Využití rostliny v praxi	30
3.4.8.1. Farmakologické účinky	30
3.4.8.1.1. Protinádorové a antivirové působení	30
3.4.8.1.2. Hepatotropní a spasmolytické účinky	31
3.4.8.2. Biologické účinky hlavních obsahových látek	32

<b>4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST A VÝSLEDKY</b>	<b>35</b>
<b>4.1. Všeobecné postupy</b>	<b>36</b>
4.1.1. Destilace	36
4.1.2. Odpařování	36
4.1.3. Chromatografie	36
4.1.3.1. Sloupcová (kolonová) chromatografie	36
4.1.3.2. Tenkovrstvá chromatografie (TLC)	36
<b>4.2. Potřeby</b>	<b>37</b>
4.2.1. Rozpouštědla	37
4.2.2. Chemikálie	37
4.2.3. Detekční činidla	37
4.2.4. Vytvájecí soustava pro tenkovrstvou chromatografii	38
4.2.5. Chromatografické adsorbenty	38
4.2.6. Standardní látky	39
4.2.7. Chemikálie a materiál pro stanovení biologické aktivity	39
4.2.8. Přístroje pro stanovení biologické aktivity	39
<b>4.3. Izolace alkaloidů</b>	<b>40</b>
4.3.1. Materiál	40
4.3.2. Příprava extraktu a jeho čištění	40
4.3.2.1. Příprava alkaloidního výtřepku A z primárního extraktu	41
4.3.2.2. Čištění surového výtřepku A	41
4.3.2.3. Příprava pseudokyanidů	41
4.3.2.4. Separace výtřepku A po odstranění benzofenanthridinových bazí	42
4.3.2.5. Příprava fenolových alkaloidů z výtřepku A	42
4.3.2.6. Příprava vyčištěného výtřepku A	42
4.3.2.7. Příprava chloridů nerozpustných ve vodě z výtřepku A a alkaloidů z nich	43
4.3.2.8. Příprava alkaloidů z chloridů rozpustných v chloroformu (AC)	43
4.3.2.9. Příprava alkaloidů z chloridů nerozpustných v chloroformu (AD)	43
4.3.3. Sloupcová chromatografie benzofenanthridinových alkaloidů připravených z pseudokyanidů	46

<b>4.4. Stanovení účinku alkaloidu na erytrocytární AChE (IC<sub>50</sub>)</b>	50
4.4.1. Podmínky měření	50
4.4.2. Stanovení hodnot IC <sub>50</sub>	50
4.4.3. Matematické zpracování experimentálních dat	51
4.4.4. Výsledky testů vlivu alkaloidu chelerythrinu na aktivitu acetylcholinesterázy	51
<b>5. DISKUSE</b>	52
<b>6. SOUHRN</b>	57
<b>7. LITERATURA</b>	59
<b>ABSTRAKT</b>	65

# 1. ÚVOD

V dnešní době, kdy dochází k prodlužování průměrného věku života, dochází rovněž ke stárnutí obyvatelstva. Přibývá stále více seniorů a s tím i spojených onemocnění. Kromě civilizačních chorob, které s sebou přináší dnešní doba a kterými můžeme trpět již od mladšího věku, narůstá počet poruch neurodegenerativních. A to zejména právě u starší populace. S nadsázkou můžeme hovořit o jakési tiché epidemii.

Jednou z těchto chorob je také Alzheimerova demence. Jedná se o onemocnění, které se projevuje nejprve velmi nenápadně. Bývá často spojováno s normálním stárnutím. Pacienti mají problémy s krátkodobou pamětí, později i s dlouhodobou, bývají zmatení a dezorientovaní, mají problémy s prostorovou orientací, nepoznávají prostředí, ve kterém jsou, ani své blízké. Je postižena i emoční stránka pacienta, přestávají o sebe dbát a dochází k degradaci osobnosti.

Příčiny vzniku Alzheimerovy demence nejsou zcela přesně známy. Podílí se na nich celá řada faktorů. Určitou roli hrají genetické dispozice, dále také vliv prostředí a životního stylu. Mezi některé rizikové faktory patří např. úrazy hlavy, kouření, nezdravý životní styl, hlavně nedostatek pohybu, stres, přejídání tučnými jídly, nedostatečná konzumace ovoce a zeleniny, nadměrná konzumace alkoholu. Negativní dopad má také neúměrná spotřeba léků jako jsou hypnotika, sedativa, antidepressiva. Svou roli může hrát i intelekt a nízká duševní aktivita. To vše přispívá k rozvoji Alzheimerovy demence.

Je nutné si uvědomit, že se jedná o velice náročné onemocnění nejen ze zdravotního, ale také sociálního a ekonomického hlediska. Pacienti jsou v pozdějších stádiích nemoci zcela odkázáni na pomoc okolí, ať už se jedná o profesionální pečovatele nebo rodinné příslušníky. Zejména pro příbuzné je péče o nemocné velice náročná a zatěžující.

Při tomto onemocnění bývá nejvíce postižen acetylcholinergní systém, a proto se hledají léčivé látky působící právě v této oblasti. I na poli přírodních látek se provádí řada výzkumů zabývajících se touto problematikou. Jednou z rostlin, jejíž obsahové látky ovlivňují acetylcholinesterázu, je *Chelidonium majus* L. z čeledi Papaveraceae. Právě alkaloidy izolované z kořene nebo nati vlašovičnicku většího by mohly být snad jednou z možností léčby této demence.

## **2. CÍL PRÁCE**

Cílem rigorózní práce bylo spolu s dalšími doktorandkami (Mgr. Šárkou Bryndovou, Mgr. Evou Vítkovou a Mgr. Dagmar Kubincovou):

1. provést extrakci 41,8 kg suché nati s kořeny z celé sušené rostliny *Chelidonium majus* L., tento primární extrakt vyčistit a připravit sekvenčním postupem výtřepky s jednotlivými typy alkaloidů,
2. zpracovat směs benzofenanthridinových bazí a získat jeden alkaloid v čisté formě,
3. podílet se na stanovení biologické aktivity vůči erytrocytární acetylcholinesteráze *in vitro*.

## **3. TEORETICKÁ ČÁST**

## 3.1. Alzheimerova demence (AD)

Choroba se projevuje jako demence, s typickým postižením tří typů funkcí: s postižením poznávacích funkcí, schopnosti vykonávat běžné aktivity denního života a s postižením chování, spánku a emotivity (tzv. behaviorální a psychologické symptomy demence).<sup>1</sup>

AD můžeme rozdělit na tři stadia:

1) mírná forma – zhoršování paměti, přechodná časová dezorientace, neschopnost vybavit si, který je den, měsíc, rok, prostorová dezorientace, ztráta iniciativy, pokles zájmu o zaměstnání a koníčky, stále obtížnější rozhodování, obtížné hledání slov,

2) středně těžká forma – významné výpadky paměti, snížená schopnost postarat se sám o sebe, zhoršení řečových schopností, halucinace, bludy,

3) těžká forma – úplná závislost, obtíže při příjmu potravy, neschopnost rozpoznat přátele, členy vlastní rodiny, obtíže s chůzí, inkontinence moči a/nebo stolice.<sup>2</sup>

### 3.1.1 Rizikové faktory

Ověřenými rizikovými faktory jsou věk a familiární agregace včetně genetických vlivů. Diskutovanými rizikovými vlivy jsou ženské pohlaví, poranění hlavy, nižší vzdělání, hypertenze, kouření a hliník, nově se uvádí vyšší hladina sérového homocysteinu.

Obě formy Alzheimerovy nemoci, raná (nástup příznaků obvykle do 60. roku věku) i pozdní (po 60. roce věku), vykazují familiární agregaci.

První gen, u něhož byl prokázán vztah k rané podobě familiární Alzheimerovy nemoci, je gen, jenž kóduje amyloidový prekurzorový protein (Amyloid Precursor Protein, APP). Přibližně v 90 % případů nemoci se prokazuje kongofilní amyloidová angiopatie. V průběhu jejího vývoje se ukládá amyloid ve stěně mozkových tepen.

Příčinou familiární formy Alzheimerovy nemoci je dále do současnosti popsanych přibližně 80 typů mutací genu kódujícího presenilin 1 (PS-1) a do současnosti popsanych 5 typů mutací genu kódujícího presenilin 2 (PS-2).

Tři výše uvedené typy genových mutací se nazývají deterministické geny, protože téměř všichni nositelé mutací onemocní.

Čtvrtým rizikovým genetickým faktorem ovlivňujícím vývoj Alzheimerovy choroby je gen APOE kódující vznik apolipoproteinu E. APOE se označuje jako lokus vnímavosti pro Alzheimerovu nemoc.<sup>1</sup>

### **3.1.2. Anatomické změny, diagnóza a patogeneze**

Anatomické změny mozku při Alzheimerově nemoci se do jisté míry překrývají se změnami doprovázejícími stárnutí. Hmotnost i velikost mozku se zmenšují v průběhu obou procesů, podobně jako se rozšiřují mozkové komory. Rozdíly mezi stárnutím a Alzheimerovou nemocí jsou nápadnější jen u jejích presenilních forem. Ty doprovází globální atrofie mozku, zatímco pozdní formu nemoci makroskopicky charakterizuje atrofie spánkového laloku.

Numerická atrofie neuronů v průběhu Alzheimerovy nemoci převyšuje numerickou atrofii doprovázející stárnutí jak v mozkové kůře, tak v podkorových oblastech. Ve spánkové kůře převyšuje numerická atrofie v průběhu nemoci stárnutí o 40 - 80 %.

Vývoj Alzheimerovy nemoci doprovázejí regresivní (ale i progresivní) změny dendritických systémů. Jsou úměrné stupni kognitivních poruch. Synapse numericky atrofují, postižení však není v mozkové kůře rovnoměrné.

Klasickými diagnostickými znaky doprovázejícími Alzheimerovu nemoc jsou senilní plaky a neuronální klubka (tangles).<sup>1</sup>

Důležitou roli při AD hraje extracelulární ukládání degenerativního proteinu  $\beta$ -amyloidu. Tento protein vzniká z bílkoviny tělu vlastní (z amyloidového prekurzorového proteinu APP, který je obsažen v neuronech). Za normálních podmínek je APP štěpen na krátké rozpustné částice  $\alpha$ - a  $\beta$ -sekretázou. Za patologických podmínek se uplatňuje  $\gamma$ -sekretáza, štěpící delší fragmenty, které mají tendenci ke koagulaci a tak dochází k tvorbě  $\beta$ -amyloidu. Shluky  $\beta$ -amyloidu tvoří základ senilních tzv. Alzheimerových plaků. V placích dochází okolo drúz amyloidu k odumírání neuronů. Jsou aktivovány gliové buňky, které začnou produkovat cytokiny, reaktivní formy kyslíku a další látky akutní zánětlivé fáze. Dochází k aktivaci

enzymu cyklooxygenázy II a tím ke zvýšené tvorbě prostaglandinů. Uvolněné zánětlivé reaktanty vedou k dalšímu poškození neuronů.

Neuronální klubka (tangles) jsou synonymem pojmu Alzheimerovy změny neurofibril. V mikroskopu se jeví jako párová spirální vlákna a jejich podstatnou součástí je  $\tau$ -protein. Tento protein, spjatý s neuronálními mikrotubuly, degeneruje odštěpením krajních aminokyselin, látka pak vytváří filamenta, která jsou základem neuronálních klubek.

V patogenezi Alzheimerovy demence se může uplatňovat oxidační stres a reaktivní formy kyslíku. To jsou atomy nebo molekuly, které jsou vedlejším produktem oxidačních a redukčních reakcí a jsou nositeli nepárového elektronu. Některé volné radikály jsou vysoce reaktivní a mohou poškodit DNA, buněčné proteiny, lipidy membrán. Volné kyslíkové radikály jsou součástí patogenetického řetězu, ale není zcela jasné, zda jsou jeho příčinou či následkem.<sup>2</sup>

Apolipoprotein E (ApoE) je protein, který se podílí na redistribuci lipidů mezi buňkami jednotlivých orgánů i mezi buňkami téhož orgánu. Gen pro ApoE se vyskytuje ve třech podobách, které kódují vznik tří různých izoform ApoE 2, ApoE 3, ApoE 4. Nosičství alely ApoE 4 je význačným rizikovým faktorem vzniku Alzheimerovy nemoci.

Z neurotransmitterových systémů je nejvíce postižen systém acetylcholinergní. Typicky je postižena presynaptická oblast, je snížena aktivita enzymu syntetizujícího acetylcholin (cholinacetyltransferáza), je snížen vstup prekurzorů (cholin, acetylkoenzym A), zpětné vychytávání acetylcholinu i jeho uvolnění z presynaptického zakončení. Z dalších systémů je postižen systém serotoninergní, je snížena hladina somatostatinu. S věkem klesá i syntéza dopaminu a stoupá jeho inaktivace monoaminoxidázami (MAO). Zvláště stoupá aktivita MAO typu B, jak s věkem, tak výrazněji u Alzheimerovy nemoci.<sup>2</sup>

### **3.1.3. Terapie**

Vzhledem k faktu, že komplexní etiopatogeneze Alzheimerovy choroby není dosud plně objasněna, není možno provádět kauzální terapii, která je terapií ideální. Farmakoterapii můžeme velmi schématicky a nepřesně rozdělit na farmakoterapii kognitivních a nekognitivních poruch. Farmakoterapie kognitivních poruch by měla

ovlivňovat především primárně postižené kognitivní funkce, měla by se tedy blížit terapii kauzální. Farmakoterapie nekognitivních poruch pak ovlivňuje nekognitivní funkce – náladu, spánek, chování.<sup>2</sup>

### **3.1.3.1. Farmakoterapie kognitivních poruch**

#### **3.1.3.1.1. Látky ovlivňující acetylcholinergní systém**

Acetylcholinergní systém je nejpostiženějším ze všech neuromediátorových systémů u Alzheimerovy nemoci. Specificky je postižen presynaptický oddíl acetylcholinergního neuronu. Je snížena hladina enzymu syntetizujícího acetylcholin, cholinacetyltransferázy (CAT). Acetylcholin je vytvářen pomocí tohoto enzymu z cholinu a acetylkoenzymu A. Po uvolnění z presynaptického zakončení se acetylcholin váže na své postsynaptické i presynaptické muskarinové a nikotinové receptory. Tyto receptory bývají u Alzheimerovy choroby zachovány. Důležité pro paměťové mechanismy jsou muskarinové receptory typu M<sub>1</sub>, a zřejmě také M<sub>3</sub>, M<sub>4</sub> a M<sub>5</sub>. Naopak receptory typu M<sub>2</sub> jsou autoregulační a jejich stimulace zhoršuje acetylcholinergní transmissi.

V synaptické štěrbině jsou molekuly acetylcholinu odbourávány enzymy cholinesterázami. Za normálních podmínek se uplatňují acetylcholinesterázy. U Alzheimerovy choroby se však také uplatňuje butyrylcholinesteráza, která je u zdravých lidí naprosto minoritní a jejíž význam za fyziologických podmínek není znám. Butyrylcholinesteráza je novotvořena v aktivovaných gliových elementech, tvořících lem plaku, a rovněž se podílí na odbourávání acetylcholinu.<sup>1</sup>

#### ***Prekurzory tvorby acetylcholinu***

Substituce samotným acetylcholinem není možná pro jeho příliš krátký poločas, cholin se nepoužívá, protože může působit depresogenně. Používají se proto různé typy lecitinu. Z lecitinu se postupně uvolňuje cholin pro syntézu acetylcholinu.<sup>2</sup>

## **Inhibitory cholinesteráz**

Acetylcholinesteráza je enzym, který odbourává acetylcholin, jejím zablokováním se zvýší množství acetylcholinu schopného vazby na receptory. Důležité je, aby tyto látky specificky blokovaly mozkovou acetylcholinesterázu bez ovlivnění její periferní formy<sup>2</sup> (na periférii převládá butyrylcholinesteráza)<sup>3</sup>. To by totiž mohlo vést k řadě nežádoucích účinků, jako např. svalové křeče, průjmy, pocení, tachyarytmie.<sup>2</sup>

Inhibitory acetylcholinesteráz jsou různého chemického složení. Byly zjištěny tři způsoby inhibice cholinesteráz (reverzibilní, ireverzibilní a pseudoreverzibilní způsob).<sup>1</sup>

**Skupina akridinových přípravků** se vyznačuje reverzibilním způsobem inhibice acetylcholinesterázy. Tetrahydroaminoakridin – tacrin je účinná látka, která musí být podávána 4krát denně. Po počátečním nadšení byl však tacrin stažen z klinického užití pro hepatotoxicitu. Další deriváty z této skupiny jsou klinicky zkoušeny, ale zatím se nedostaly do klinického užití.

**Skupina piperidinových derivátů:** tyto látky jsou velmi čisté inhibitory acetylcholinesterázy. Klinicky je používán donepezil (Aricept), zatím nejrozšířenější inhibitor acetylcholinesteráz v celém světě. Je to látka relativně velmi bezpečná. Ještě čistší inhibitor acetylcholinesteráz bez podstatného ovlivnění butyrylcholinesteráz je icopezil, který však je ve stádiu klinického zkoušení.

**Karbamátové deriváty:** fysostigmin je látka užívaná spíše experimentálně, má velmi krátký poločas a množství nežádoucích vedlejších účinků. Jsou však vyvíjeny retardované nebo depotní fysostigminové přípravky, které by uvedené nepříznivé vlastnosti postrádaly. Eptastigmin je látka perspektivní, klinicky zkoušená. Rivostigmin (Ešelon) je široce klinicky používaná látka. Kromě acetylcholinesteráz výrazně blokuje molekuly butyrylcholinesterázy.

**Alkaloidy:** huperzin A, alkaloid čínské rostliny *Huperzia serrata*, je klinicky ověřován studii především v Číně, dosavadní výsledky naznačují, že je to perspektivní látka. Galanthamin (Reminyl) je klinicky užívaná látka, která je zvláštní tím, že je to acetylcholinergní dualista, kromě reverzibilní inhibice acetylcholinesterázy alostericky moduluje presynaptické i postsynaptické nikotinové receptory. Touto alosterickou modulací se zvyšuje acetylcholinergní přenos a do jisté míry se brání vzniku hyposenzivity muskarínových receptorů.<sup>1</sup>

### ***Přímí muskarinová a nikotinová agonisté***

Tato léčebná strategie je ve fázi klinického zkoušení, nikoli užití. Zkoušejí se muskarinová agonisté receptoru typu M<sub>1</sub>, event. M<sub>3</sub> a M<sub>4</sub>, ale také antagonisté autoreceptoru M<sub>2</sub>.<sup>1</sup> Látky, které působí agonisticky na M<sub>2</sub> receptorech, kognitivní buňky poškozují.<sup>2</sup> Mezi M<sub>1</sub> agonisty náleží např. xanomelin. Zatím není používán žádný nikotinový agonista s výjimkou duálně působícího galanthaminu.<sup>1</sup>

### ***Další látky zlepšující acetylcholinergní přenos***

Indolexazin stimuluje uvolnění acetylcholinu z presynaptického zakončení. Nicergolin je nootropikum a působí jako vasodilatans. Po dlouhodobém podávání bylo pozorováno zvýšení aktivity enzymu acetylcholintransferázy (syntetizující acetylcholin) a naopak pokles aktivity acetylcholinesterázy. Acetyl-L-karnitin zlepšuje příjem prekursoru pro syntézu acetylcholinu do neuronu.<sup>2</sup>

### ***Látky ovlivňující acetylcholinergní systém pomocí jiných transmitterových systémů***

Acetylcholinergní systém je aktivně tlumen GABAergním systémem. Proto jsou hledány látky působící parciálně antagonisticky ke GABA-systému tak, aby byl odtlumen tlumivý vliv na acetylcholinergní systém.<sup>1</sup>

### **3.1.3.1.2. Látky likvidující volné kyslíkové radikály nebo tlumící jejich nadměrnou tvorbu**

Volné kyslíkové radikály (hydroxylový ion, peroxid vodíku, singletový kyslík, oxid dusnatý) jsou látky, které v celém těle včetně tkáně centrálního nervového systému stále vznikají a zanikají, mají velmi krátký poločas a mají také své fyziologické úlohy (např. informačního charakteru). Mozek je vybaven několika enzymy, které volné kyslíkové radikály likvidují (superoxiddismutáza, kataláza, glutathionperoxidáza). Za normálních okolností jsou jejich vznik a likvidace v rovnováze. Za patologických okolností, jak je tomu u Alzheimerovy choroby, je

jejich vznik podstatně vyšší než likvidace. Nadbytečné radikály se pak váží na enzymy, které poškozují, a některé tkáně, např. na lipidy neuronální membrány, dochází k jejich poškození (lipoperoxidaci) a poškozené neurony pak zanikají, podléhají apoptóze.

K likvidaci nadměrného množství volných kyslíkových radikálů se používají tzv. scavengery (zhášače, zametače) volných radikálů. Mezi ně patří např. vitamin E. Z nootropních farmak má prokazatelný, i když slabý scavengerový efekt pyritinol. Scavengerový efekt má také jedna skupina složek extraktu z *Ginkgo biloba* – flavonové glykosidy a terpenoidy.

Inhibitor monoaminoxidázy B (MAO-B) selegilin snižuje tvorbu volných kyslíkových radikálů. Velké množství těchto radikálů vzniká při odbourávání dopaminu a MAO-B dopamin odbourává. Navíc ve stáří, a ještě více u Alzheimerovy choroby, je hladina MAO-B zvýšena.<sup>1</sup>

#### **3.1.3.1.3. Látky tlumící excitotoxicitu**

Nadměrné působení excitačních aminokyselin (aspartát, glutamát) na NMDA-receptory (*N*-methyl-D-aspartátový receptor) vede ke zvýšenému vstupu kalcia do neuronů, které vede k destabilizaci vnitřního prostředí a následné smrti neuronu. Hledají se proto látky, které blokují NMDA-receptory. Takto působí některé látky obsažené v extraktu z *Ginkgo biloba*, selegilin, memantin, cykloserin.<sup>2</sup>

#### **3.1.3.1.4. Látky zlepšující neuronální metabolismus**

U pacientů s Alzheimerovou demencí bývá popisován snížený neuronální metabolismus, zejména oxidativní metabolismus glukózy a buněčná proteosyntéza. V terapii se používají např. piracetam, pyritinol, nicergolin, extrakt z *Ginkgo biloba*.<sup>2</sup>

### **3.1.3.1.5. Protizánětlivé látky, estrogeny a statiny**

U Alzheimerovy nemoci dochází k projevům zánětlivé reakce, která přispívá k zániku neuronů. Podávání protizánětlivých látek, které procházejí hematoencefalickou bariérou, pravděpodobně působí jako protektivní faktor.

Řada údajů dokládá důležitou úlohu estrogenů v procesu stárnutí, estrogeny byly považovány za protektivní faktor ke snížení rizika Alzheimerovy nemoci u žen, ale pozdější studie tuto protektivní roli neprokázaly.

Statiny snižují krevní hladinu cholesterolu a jiných lipidů. Poslední studie prokázaly příznivý vliv u všech forem demence. Statiny pravděpodobně mohou významně redukovat riziko rozvoje Alzheimerovy choroby.<sup>2</sup>

### **3.1.3.2. Farmakoterapie nekognitivních poruch**

Tento typ farmakoterapie se používá k léčbě přidružených, nekognitivních symptomů Alzheimerovy nemoci. Mezi takovéto příznaky náleží např. paranoidně-halucinatorní syndromy, stavy neklidu, poruchy spánku, depresivní nebo úzkostné stavy.<sup>3</sup>

## **3.2. Vliv acetylcholinesterázy a butyrylcholinesterázy**

### **Acetylcholinesteráza a butyrylcholinesteráza**

Savčí mozek obsahuje dvě hlavní formy cholinesteráz: acetylcholinesterázu (AChE) a butyrylcholinesterázu (BuChE). Obě formy jsou rozlišeny geneticky, strukturně a také reakční kinetikou. Butyrylcholin není fyziologickým substrátem v savčím mozku a role BuChE je dosud obtížně interpretovatelná. V lidském mozku se BuChE nachází v neuronech, gliových buňkách, stejně tak jako v neuritovém plaku a tangles u pacientů s Alzheimerovou chorobou (AD). Zatímco acetylcholinová aktivita snižuje progresivitu AD v mozku nemocných pacientů, BuChE aktivita může zvýšit progresivitu, záleží však na dalších faktorech. Na základě různých modelů (a u pacientů s pokročilou AD) se však zdá, že BuChE může určitou měrou nahradit AChE při hydrolýze mozkového acetylcholinu.<sup>4</sup> BuChE se ukázala skutečně novým cílem v terapii AD.<sup>5</sup> AChE je predominantní ve zdravém mozku, BuChE hraje patrně určitou minoritní roli v regulaci hladiny mozkového acetylcholinu. V případě mozku

s AD se aktivita BuChE progresivně zvyšuje, zatímco aktivita AChE zůstává nezměněna, resp. se snižuje.<sup>5</sup>

### 3.3. Inhibitory acetylcholinesterázy (AChEI)

Velmi významnou roli hraje studium přírodních látek, protože struktura těchto poměrně složitých molekul významně modifikuje účinek nejen ve smyslu vlastního efektu, ale především vedlejších účinků. Inhibice AChE byla pozorována např. u obsahových látek z Tea Tree Oil<sup>6</sup>, steroidních alkaloidů ze *Sarcococca saligna*<sup>7</sup>,  $\alpha$ -onocerinu z *Lycopodium clavatum*.<sup>8</sup> Velmi významné je však studium (resp. použití) alkaloidů především isochinolinového typu, vyskytujících se v různých zdrojích: zástupcích čeledi Amaryllidaceae: galanthaminu a jeho současných derivátů<sup>9,10,11,12</sup> a chinolinové baze z čeledi Lycopodiaceae, jako je huperzin A a jeho deriváty.<sup>13,14,15</sup> U některých přírodních látek byla pozorována spřažená aktivita: inhibují jak AChE tak butyrylcholinesterázu (BuChE).<sup>7,16</sup> Při syntéze nových léčiv tohoto typu je velmi zásadní stereochemie: terapeuticky významně aktivní jsou pouze některé stereoizomery<sup>17</sup> (a tento stav se uplatňuje i z hlediska ovlivnění AChE a BuChE, jak je to vidět např. u stereoizomerů huperzinu A<sup>16</sup>). Tento faktor musí být významně zohledněn, protože jinak dochází v řadě případů k výraznému vzestupu nežádoucích účinků.

Mezi další perspektivní inhibitory acetylcholinesterázy patří např.:

Lipokrin – kombinace aminoakridinového derivátu s  $\alpha$ -lipoovou kyselinou, inhibuje katalytickou aktivitu AChE a BuChE, inhibuje také agregaci  $\beta$ -amyloidu indukovanou AChE, chrání proti účinkům reaktivního kyslíku.

Ganstigmin – patří mezi pseudoirreverzibilní inhibitory, je strukturálně podobný alkaloidu genserinu, inhibuje více AChE než BuChE, zvyšuje také hladinu serotoninu a mohl by příznivě ovlivňovat deprese, které se u pacientů s AD často vyskytují, nachází se v II. fázi klinického hodnocení.

Ladostigil – kombinace rivastigminu (AChEI) a rasagilinu (MAO-B-I), zesiluje cholinergní i aminergní transmissi v CNS, má neuroprotektivní a anti-apoptotické účinky, aktivuje  $\alpha$ -sekretázu, měl by být vhodný pro léčbu demenčních pacientů trpících zároveň depresí.<sup>18</sup>

Přírodní látky působící na AChE najdeme v celé řadě rostlin různých čeledí:

Saligenamid C (*Sarcococca saligna*, Buxaceae), výraznější zásah do BuChE.

Zeatin (*Fiatoua villosa*, Orchidaceae, *Zea mays*, Poaceae), inhibice tvorby  $\beta$ -amyloidu, přírodní cytokinin, široce rozšířen.

Dekursinol (*Angelica gigas*, Apiaceae), vysoká inhibiční aktivita vůči AChE *in vitro*.

Dehydroevodiamin (*Evodia rutaecarpa*, Rutaceae).

Homomoenjodaramin, moenjodaramin (*Buxus hyrcana*, Buxaceae).

Cykloprotobuxin C, Cyklovirobuxein A, Cyklomikrofilin A (*Buxus papillosa*, Buxaceae).

$\alpha$ -Viniferin (*Caragana chamlague*, Fabaceae).

Cynatrosidy A, B, C (*Cynanchum atratum*, Ranunculaceae), signifikantní inhibice.<sup>19</sup>

Jak již bylo zmíněno také obsahové látky vlašovičnicku většího, *Chelidonium majus* L. z čeledi Papaveraceae, ovlivňují acetylcholinesterázu. Jedná se především o alkaloidy obsažené jak v nati, tak i v kořeni této rostliny.

## 3.4. Vlaštovičnick větší – *Chelidonium majus* L.

### 3.4.1. Systematika

Vlašovičnick větší (*Chelidonium majus* L.) je rostlinný druh z čeledi makovitých (Papaveraceae).

V rodu *Chelidonium majus* L. existují různé morfologické variety:

var: *crenatum*, *fumariifolium*, *majus*, *tenuifolium*.

Existují různé karyotypy:  $2n = 12$ , jedná se o rostliny mnoha stanovišť v Evropě a Asii;  $2n = 10$ , rostou v Japonsku a východní Evropě;  $2n = 20$ , rostoucí v Japonsku; v Polsku existuje tetraploidní vyšlechtěná odrůda  $2n = 24$ . Je zde pěstována a označována jako *Chelidonium majus* "Cynober".<sup>20</sup>

### 3.4.2. Lidové názvy vlašovičnicku většího

Hadí mléč, mlíč, psí mléko, hadí mlíčí, krvavník, celidon, nebezky dar.<sup>21</sup>

### 3.4.3. Botanický popis

Středně vysoká, vytrvalá, jedovatá, charakteristicky páchnoucí a mléčivá, roztroušeně chlupatá, léčivá bylina. Na stanovišti dobře vytrvává tlustým krátkým oddenkem s četnými kořeny. Nadzemní část i podzemní orgány jsou prostoupeny mléčnicemi, jež po poranění pletiv roní žluté až oranžové jedovaté mléko. Již časně na jaře vyrůstá z oddenku přímá oblá listnatá lodyha, dorůstající výšky až 100 cm. Dolní střídavé listy jsou řapíkaté, horní přisedlé, obojí jednoduše a přetrhovaně lichozpeřené. Mají křídlaté řapíčky a jednotlivé lístky vejčité, na obvodě nestejně zastříhané, laločnatě zubaté, na líci sytě zelené a na rubu sivě zelené. Konečný lístek je největší, obvykle se třemi laloky. Velké oboupohlavné pravidelné volnoplátečné květy se objevují od května až do září i později. Mají čtyři vejčité žluté až oranžové korunní lístky a dva stejně zbarvené opadavé lístky kališní. Květy obsahují četné žluté tyčinky s kyjovitě ztlustlými nitkami a protáhlý pestík, jehož semeník je tvořen dvěma plodolisty. Za deštivého počasí jsou květy uzavřené a opylují se vlastním pylem. Za příznivého počasí se otevřené květy opylují pylem cizím. Oplozený semeník dozrává v dlouhou hrbolatou jednopouzdrnou vícesemennou tobolku, která se otvírá zdola nahoru dvěma chlopněmi. Z otevřené tobolky vypadávají drobná černohnědá až černá válcovitá semena.<sup>21</sup>

### 3.4.4. Původ a rozšíření

Vlaštovičník se vyskytuje zvláště v Evropě a Asii. V našich podmínkách je rozšířen od nížin až do subalpínského pásma. Zde je především významným průvodcem lidských sídlišť. Roste hojně na rumišťích, zbořenišťích, zdech, v hájích a křovinách u břehu, v houštinách a na jiných stanovištích.<sup>21</sup>

### 3.4.5. Obsahové látky

#### 3.4.5.1. Alkaloidy

Hlavními obsahovými látkami vlaštovičníku většího jsou alkaloidy. V rostlině jich bylo popsáno již více než třicet. Za zmínku stojí, že z tohoto počtu jich 15 poprvé izoloval a převážně určil profesor Slavík. S výjimkou sparteinu patří popsané alkaloidy k derivátům izochinolinu.<sup>22</sup>

**Kvartérní benzo[c]fenanthridiny** – sanguinarin, chelerythrin, chelirubin, chelilutin, makarpin.

**Terciární benzo[c]fenanthrididiny** – chelidonin, homochelidonin, chelamin, chelamidin, dihydrosanguinarin, dihydrochelerytrin, dihydrochelirubin, chelidimerin, norchelidonin, izochelidonin, oxysanguinarin, „methoxychelidonin“ (není individuální alkaloid, ale směs homochelidoninu, chelaminu a chelamidinu).

**Terciární protoberberiny** – stylopin.

**Kvartérní protoberberiny** – methylstylopinium, berberin, koptisin, korysamin.

**Protopyny** – protopin, allokryptopin.

.. **Kvartérní aporfiny** – magnoflorin, turkiyenin, spartein.<sup>22</sup>

Je známo, že distribuce alkaloidů v rostlině je nerovnoměrná, mění se v průběhu vegetace, v závislosti na klimatických podmínkách a stáří rostliny. Nejbohatším orgánem je kořen, obsah alkaloidů v něm často dosahuje až 2 - 3 %, kulminuje na konci vegetačního období, zatímco při kvetení rostliny klesá. U víceletých rostlin je obsah alkaloidů v kořeni výrazně vyšší než v prvním roce vegetace.

Hlavními alkaloidy kořene jsou koptisin a chelidonin, významný je i obsah sanguinarinu, chelerythrinu, berberinu a kvartérního aporfinového alkaloidu magnoflorinu. V nadzemních částech rostliny je zastoupení alkaloidů nižší (0,5 - 1,5 %) a podléhá v průběhu vegetace významným kvalitativním změnám. Jako hlavní alkaloidy jsou uváděny chelidonin, koptisin, stylopin, sanguinarin a chelerythrin. Hlavním alkaloidem je po celé vegetační období koptisin. Jeho obsah v nadzemních částech činil 0,4 - 0,8 %. Na počátku vegetačního období byl jako

druhý hlavní alkaloid nadzemní části stanoven stylopin, přičemž obsah chelidoninu, sanguinarinu a chelerythrinu byl v této době relativně nízký. Po odkvětu rostliny však obsah tří posledně jmenovaných alkaloidů narůstal a ke konci vegetace již patřily k hlavním, zatímco obsah stylopinu výrazně poklesl.<sup>22</sup>

Tab. 1. Obsah alkaloidů v nadzemní části vlaštovičnicku většího<sup>23</sup>

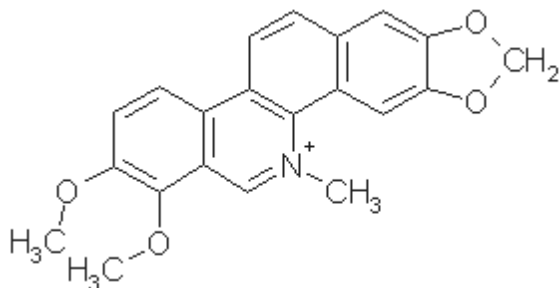
	% celkových basí	% nadzemních částí
chelidonin	38,9	0,114
<i>l</i> - a <i>dl</i> -stylopin	12,2	0,036
sanguinarin	9,3	0,027
chelerythrin	8,6	0,025
protopin	5,9	0,018
koptisin	5,2	0,015
$\alpha$ -allokryptopin	1,7	0,005
chelirubin	0,5	0,002
fenolické base	1,7	0,005
amorfní nefenolické base	11,0	0,032

Tab. 2. Obsah alkaloidu v kořeni vlaštovičnicku většího (září – říjen 1950)<sup>24</sup>

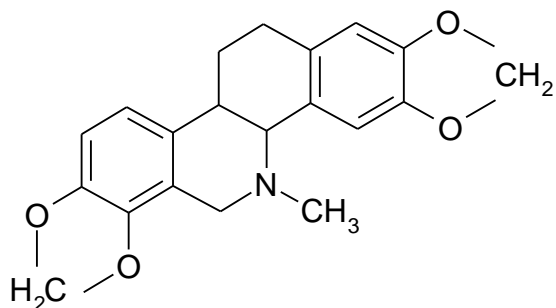
	% celkových basí	% kořene
chelidonin	47,35	0,958
base kyanidové frakce (chelerythrin, sanguinarin, chelirubin a chelilutin)	20,80	0,421
base berberinové frakce (berberin a koptisin)	8,64	0,175
protopin	6,36	0,128
$\alpha$ -allokryptopin	4,55	0,092
homochelidonin	2,17	0,044
$\beta$ -allokryptopin	1,15	0,023
amorfní zbytek basí	0,36	0,007

## Chemická struktura vybraných alkaloidů

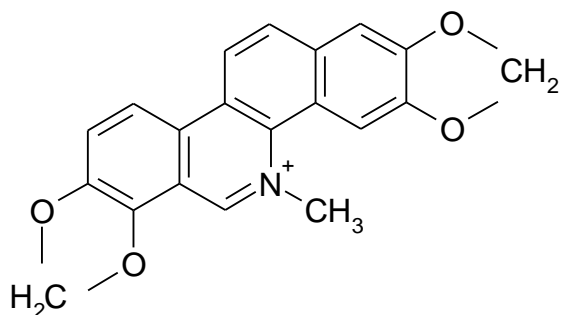
- Chelerythrin



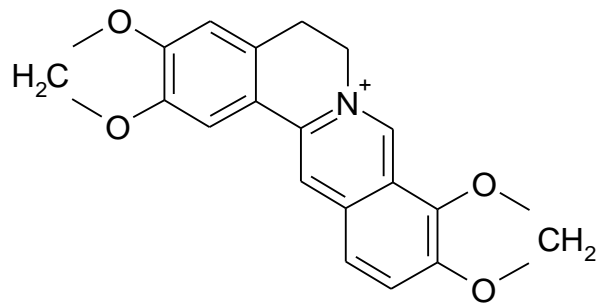
- Chelidonin



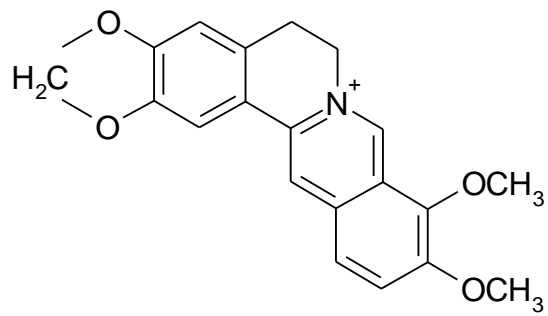
- Sanguinarin



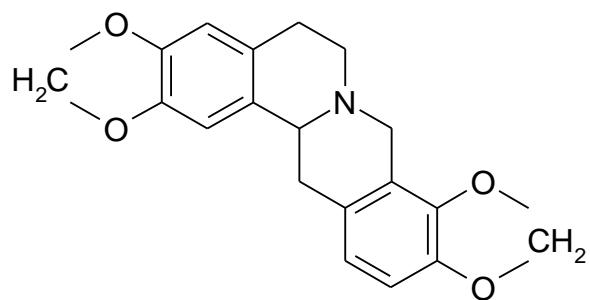
- Berberin



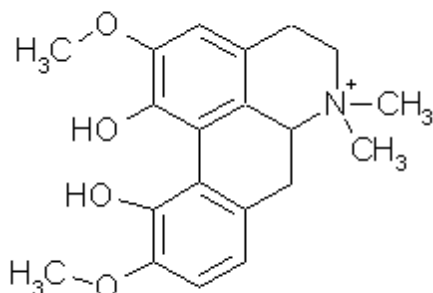
- Koptisin



- Stylopin



- Magnoflorin



### 3.4.5.2. Nealkaloidní sekundární metabolity

Nealkaloidním sekundárním metabolitům byla dosud ve srovnání s alkaloidy věnována menší pozornost. Dřívější práce uvádějí přítomnost alkoholu chelidonolu, kyselin chelidonové, kávové, ferulové a kumarové, dale vysoký obsah karotenů a kyseliny askorbové, flavonoidů rutinu a kvercetinů. Z minoritních složek byly prokázány blíže nespecifikované triterpenoidy, silice a saponiny, kyselina nikotinová, cholin, methylamin, histamin, tyramin. Z nadzemních částí rostlin byly izolovány estery kyseliny kávové: 2-kafeoylglycerová, 2-kafeoylthreonová, 2-kafeoyljablečná a ester kávové kyseliny s 1,4-laktonem kyseliny threonové.<sup>22</sup> Dále byla v rostlině prokázána proteáza, peroxidáza, glukóza a fruktóza, třísloviny, kaučuk. V celé rostlině je obsaženo hojně pryskyřičnatých látek, z nichž jedna (žlutě zbarvená) se uvádí v souvislosti s toxicitou čerstvé rostliny.<sup>24</sup>

### 3.4.6. Účinnost a působení

Pro posouzení výzkumů z vlašovičnicku provedených až k roku 1970 je důležité to, že byla zkoumána výlučně čerstvá droga. Převládlo mínění, že droga při sušení ztrácí své účinné látky, což se může doopravdy stát i při nejlepších podmínkách sušení. Většina farmakologických výzkumů byla tudíž provedena s extrakty z čerstvé rostliny, vzácněji pak se sušenou celou rostlinou nebo s výtažky z čerstvé rostliny, případně s alkaloidy izolovanými z celé rostliny. Ale stabilita látek obsažených v čerstvé droze také nebyla optimální, proto se často popisoval nejistý

účinek získaných preparátů. Výsledky těchto studií jsou tudíž jen obtížně převeditelné na sušený vzorek drogy. A proto jsou v podstatě nepoužitelné (nejsou stejné podmínky experimentu).<sup>20</sup>

Celkové alkaloidy izolované z celé sušené rostliny vedou ve střevě zacévkovaných králíků (20 mg/kg) k přechodnému zvýšení tonu. Následuje snížení a zpomalení velkých peristaltických pohybů, které vede k zácpě. Zpomalení střevní pasáže je způsobeno centrálním sympatomimetickým působením. Na izolovaném tenkém střevě králíků chelidonin způsobuje nejprve silné zvýšení střevní činnosti a poté delší útlum. Podle starších prací má alkaloid chelidonin na všechno hladké svalstvo působit zvýšením napětí: pozorováno bylo snížení spontánních kontrakcí různých izolovaných orgánů (jícen, žaludeční fundus a pylorus žab, děloha morčat, kočičí a králičí střevo). Pozorováno bylo vymizení spasmogenum indukovaných křečí (spasmogeny: histamin, pilokarpin, barium chlorid) na ne blíže určených orgánech a také vymizení histaminem indukovaného bronchospasmu u morčat, resp. potlačení spasmu při současném podání chelidoninu a spasmogenu. 1g chelidoninu má na králičím tenkém střevě vykazovat stejnou spasmolytickou aktivitu jako 0,53 g papaverinu. Extrakty z čerstvé nati a z celé rostliny (izolované alkaloidy) působí spasmolyticky a ruší pilokarpinem navozený bronchospasmus.<sup>21</sup>

Existuje řada klinických studií provedených především v třicátých letech hlavně na pacientech s afekcemi žaludku, střeva a jater (také s chronickým městnáním žluči či zánětem žlučníku). Pacienti byli léčeni preparáty z čerstvé rostliny (vylisovaná šťáva nebo rozetřená celá rostlina s mléčným cukrem) p.o. Bylo pozorováno snížení bolesti a vymizení křečí (zlepšení subjektivních obtíží). Na podkladě těchto preklinických a klinických výzkumů (převážně na celé rostlině nebo na celkových alkaloidech – výsledky nejsou převoditelné) bylo vlašovičnicku přiřazeno spasmolytické působení na GIT a žlučové cesty. Působení bylo přičítáno především chelidoninu.

K otázce zda má vlašovičnick cholagogní působení či zda se jedná o efekt choleretický nebo cholekinetický neexistují žádné dostačující důkazy. Podle klinických studií, provedených hlavně v třicátých letech, mají mít preparáty celé čerstvé rostliny podávané p.o. u pacientů s cholestázou cholagogní působení. V jedné z novějších prací bylo zkoumáno působení alkoholického suchého extraktu ze sušené nati na sekreci žluče a pankreatické šťávy u pacientů se smíšenými hepatopatiemi (část pacientů měla znatelný syndrom cholestázy). U osmi pacientů

byla zavedena duodenální sonda k odsávání duodenální šťávy a žaludeční sonda určená k odsávání žaludeční sekrece a podání extraktu látky. Třicet minut po zavedení sond byla zachycena klidová sekrece žluči a pankreatické šťávy v duodenu (v 10-ti min. periodách) a stanoven objem i koncentrace bilirubinu, cholesterolu, lipázy a  $\alpha$ -amylázy. Nápadné je, že průměrná bazální hodnota 10-ti min. klidové sekrece u hepatopatických pacientů se odchyluje od průměrných bazálních hodnot 22 zdravých dobrovolníků.<sup>20</sup>

Tab. 3. Průměrná bazální hodnota sekrece žluči a pankreatické šťávy

Látka	Hepatopatici (mg)	Zdraví (mg)
bilirubin	0,086	0,543
cholesterol	4,58	10,65
lipáza	0,267 E	2,52 E
$\alpha$ -amyláza	4166 E	1633 E

Po podání extraktu drogy (100 mg suchého extraktu s 1,5 mg celkových alkaloidů přepočítáno na chelidonin, suspendováno v 10 ml vody) byla získávána duodenální šťáva v 10-min. periodách. Celková délka pokusu byla 100 min. Skutečné působení drogy bylo pozorováno až v posledních 30-ti minutách. Maximální hodnoty byly dosaženy v posledních 10-ti minutách (hodnoty jsou oproti bazálním hodnotám signifikantně zvýšené).<sup>20</sup>

Tab. 4. Sekrece žluči a pankreatické šťávy po podání extraktu

Bilirubin	Cholesterol	Lipáza	$\alpha$ -amyláza
1,008 mg	26,94 mg	4982 E	14569 E

Pomalé, ale kontinuální zvyšování sekrece žluči bylo autorem označeno jako choleretický účinek. Zda má cholagogní působení drogy pro terapii nemocí žlučových cest praktické uplatnění, zůstává otázkou.

Ačkoliv je často popisováno antimikrobiální působení jednotlivých alkaloidů vlašovičnicku, je na toto téma provedeno jen minimum pokusů. Vysušený, se 70%

ethanolem upravený extrakt ze sušené drogy *Chelidonii herba* ukazuje na agarovém kultivačním testu (400 µg/misku) slabé antibakteriální působení proti *Staphylococcus aureus*, *Escherischia coli* a *Shigella sonnei* (minimální inhibiční zóny: méně než 10 mm v průměru). Ethanolický tekutý extrakt ze sušené celé rostliny (nerozlišuje se, jestli z celé rostliny nebo jen z nati) ukazuje v agarovém difúzním testu od slabého do silného antimykotického působení proti různým druhům *Candida*, *Trichophyton*, *Microsporium* a *Epidermatophyton* (inhibiční průměr 12 – 30 mm, bez udání dávky). Inhibiční působení extraktu se liší také podle doby sběru drogy (inhibiční průměr extraktu u *Candida albicans*: doba sběru červenec = 12 – 13 mm, září = 24 – 30 mm).<sup>20</sup>

### 3.4.7. Využití drogy v lidovém léčitelství

Využití rostliny má bohatou historii v lidovém léčitelství. Není téměř choroby, proti které vlaštovičník v průběhu staletí nebyl použit. Léčivá moc jí byla přisuzována již za starověku a od té doby byla v léčitelství hojně používána. Byla doporučována proti chorobám jater, zimnici a vodnatelnosti, na zlepšení zraku, k odstraňování bradavic i k léčbě tumoru.<sup>22</sup>

Sbírá se nať (*Herba chelidonii*) na počátku květu (duben až červen) nebo oddenek i s kořeny (*Radix chelidonii*). Nať se seřezává asi 10 cm nad zemí s suší se při teplotě do 35 °C. Usušenou drogu je nutno chránit před světlem a občas je dobré ji dosušovat, neboť snadno plesniví. Oddenek s kořeny se sbírá na podzim, kdy obsahuje nejvíce účinných látek. Suší se co možná nejrychleji, nejlépe umělým teplem do 75 °C.

Droga působí fytocidně, sedativně, uvolňuje křečovitě bolesti, roztahuje cévy, prohlubuje srdeční činnost, uvolňuje křeče bronchů a střev, zvyšuje tvorbu žluči, působí antibioticky, tlumí dráždivý kašel, preventivně působí antiastmaticky, tlumí křeče v močovém ústrojí, snižuje bušení srdce, reguluje menstruaci, zevně působí na mikrobiální ekzémy, na špatně se hojící nebo hnisavé rány, na bércové vředy. Byla prokázána i cytostatická účinnost některých alkaloidů (zejména na rakovinu kůže), pro vysokou toxicitu je však využití této vlastnosti takřka vyloučené.

Droga se nejčastěji podává ve formě tinktury, kterou lze poměrně dobře dávkovat, což je vzhledem k jedovatosti vlaštovičníku velmi důležité. V žádném

případě by se však vlaštovičnicku nemělo užívat bez dozoru odborníka, jako bezpečná se jeví snad jen aplikace mléka na bradavice. Koupele v silnějším vlaštovičnickovém odvaru se osvědčily při plísni postižených nohou.<sup>25</sup>

### **3.4.8. Využití rostliny v praxi**

V novější době je vlaštovičnick užíván ve fytoterapii jako droga s účinkem spasmolytickým, analgetickým, cholagogním, popř. jako dermatologikum, antihistaminikum a antiseptikum. Herba chelidonii i Radix chelidonii jsou popsány v řadě lékopisů např. DAB 10.

Extrakty z vlaštovičnicku jsou součástí řady galeník, produkovaných zejména v západní Evropě. Jsou indikovány při hepatopatiích, poruchách funkce žlučníku a po jeho operacích. V Číně se extrakty z *Chelidonium majus* užívají při léčbě chronické bronchitidy, dávivého kašle a jako analgetikum. Vlaštovičnick je též součástí řady homeopatik.

Uvádí se, že čerstvá rostlina je jedovatá, na kůži a sliznicích vyvolává záněty, otoky až puchýře, vnitřně zvracení, krvavé průjmy a hematurii. Na toxicitě čerstvé šťávy se dle některých údajů podílí blíže nespecifikovaná pryskyřičnatá látka, která se sušením rozkládá a ztrácí účinnost. Toxicita sušené drogy je podstatně nižší, dle některých údajů je již netoxická. V praxi jsou otravy touto rostlinou řídké pro její nepříjemnou chuť a vůni.<sup>22</sup>

#### **3.4.8.1. Farmakologické účinky**

##### **3.4.8.1.1. Protinádorové a antivirové působení**

Klinické použití vlaštovičnicku při léčbě nádorů se datuje již od minulého století. Botkin popsal dva případy karcinomu, léčené extrakty z vlaštovičnicku. Další klinické údaje z tohoto období popisují užití chelidoninsulfátu při rakovině žaludku, extraktu z vlaštovičnicku při karcinomu prsu a dalších orgánů. Dále má droga dlouhou historii při léčbě bradavic, papilomů a kondylomat. Později při testování rostlinných extraktů na antitumorovou aktivitu byl pozorován inhibiční účinek extraktů z vlaštovičnicku na sarkom 180 a Ehrlichův myší karcinom. Při intenzivním výzkumu antitumorové

aktivity v šedesátých letech byly popsány inhibiční účinky extraktů z vlaštovičníku na některé typy nádorů, současně však byla prokázána výrazná cytotoxicita alkaloidů sanguinarinu, chelerythrinu, chelidimerinu, chelidoninu, protopinu a koptisinu. V roce 1968 bylo v experimentech s tkáňovými kulturami zjištěno, že extrakty z rostliny vykazují slabou aktivitu proti viru *Herpes simplex*. Rovněž v pozdější práci byl potvrzen inhibiční efekt extraktu na virus *Herpes simplex* a některé adenoviry *in vitro*. Nejsilnější inhibiční účinek však vykazovala frakce neobsahující žádný z typických alkaloidů tohoto druhu. Aktivní složka extraktu nebyla definována.<sup>22</sup>

V nedávné době opět vzrostl zájem o využití vlaštovičníku při terapii karcinomů, a to v souvislosti s přípravkem Ukrain, vyvinutým a patentovaným rakouskými autory. Tento preparát obsahuje extrakt alkaloidů z *Chelidonium majus* konjugovaných s kyselinou thiofosforečnou a vyznačuje se imunomodulační aktivitou. Působí zvýšení počtu T-lymfocytů a normalizaci poměru Th/Ts buněk, bez ovlivnění hladiny imunoglobulinů. Přípravek byl aplikován pacientům s různými typy karcinomů. Byl pacienty dobře snášen, navodil obnovení buněčné imunity, provázené objektivním zlepšením stavu pacientů a v několika případech i regresi tumorů. V *in vivo* studiích na myších tumorech bylo prokázáno, že intravenózní podání Ukrainu snižuje rychlost růstu tumoru. V pokusech *in vivo* bylo doloženo, že preparát obnovuje porušenou schopnost makrofágů lyticky štěpit tumorové buňky prostřednictvím stimulace LPS (lipopolysacharid, endotoxin). Obnovená cytolytická aktivita je nezávislá na TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor), což naznačuje, že Ukrain aktivuje alternativní cytolytický mechanismus u makrofágů. Studiu dalších vlastností uvedeného přípravku je nadále věnována značná pozornost.<sup>22</sup>

#### **3.4.8.1.2. Hepatotropní a spasmolytické účinky**

Droga je stále v současných přehledech fytoterapie doporučována jako spasmolytikum, choleretikum a cholagogum, názory na její účinnost však nejsou jednoznačné. Údaje o pozitivních účincích drogy na sekreci žluče, aktivitu  $\alpha$ -amylázy i spazmy hladké svaloviny pochází vesměs ze starších prací. Významné je zvýšení sekrece bilirubinu, cholesterolu a zvýšení aktivity pankreatických enzymů lipázy a  $\alpha$ -amylázy po aplikaci 100 mg suchého extraktu z vlaštovičníku. Příznivé účinky preparátu Panchelidon obsahujícího extrakt z čerstvých rostlin s obsahem

20 % alkaloidů při léčbě chronické cholangitidy, cholelithiázy a diskinezií popsal v roce 1977 Neumann-Mangoldt.<sup>22</sup> Preparát vykazoval spasmolytický a středně analgetický účinek, výrazně omezoval diarrhoeu, vyvolanou léčbou antibiotiky. Weiss hodnotí účinky vlašovičnicku jako nekonstantní. S odvoláním na vlastní zkušenosti uvádí, že účinnost drogy klesá delším uchováváním a je tedy nutné užívat extrakty vždy z čerstvé drogy. I při podávání čerstvé šťávy z vlašovičnicku však pozoroval, že zatímco v první polovině roku byl efekt jeho působení zřetelný a pacientům přinášel úlevu, po uplynutí této doby začal slábnout, až prakticky v krátké době zcela vymizel. Je pravděpodobné, že uvedené poznatky souvisí s nestandardním složením drogy.<sup>22</sup>

Větší uplatnění mezi galeniky používanými v současnosti v západoevropských zemích nacházejí směsné extrakty, obsahující vedle vlašovičnicku výtažky dalších drog, např. preparát Chelidonium-Strath (Strath-Labor) obsahuje směs extraktů z *Herba chelidonii*, *Herba agrimoniae*, *Folium salviae* a *Herba hyperici*, přípravek Hepatofalk Planta (Falk) je směsí extraktů ze *Silybum marianum*, *Chelidonium majus* a *Curcuma xanthorrhiza*. Preparát obdobného složení Aristochol (Steiner and Co.) byl hodnocen Baumanem, který uvádí, že přípravek zvyšuje cholerezi, sekreci lipázy a amylázy. Pozitivní účinky preparátu Hepaticum-Medice (Medice) na metabolismus žlučových kyselin popsal Matzekis.<sup>22</sup>

### 3.4.8.2. Biologické účinky hlavních obsahových látek

Hlavní alkaloidy rostliny jsou koptisin a chelidonin. Přestože koptisin se strukturně jen málo liší od berberinu, jehož biologické účinky byly předmětem řady studií, o účincích samotného koptisinu je známo jen velmi málo. Ze starších prací pochází údaje o jeho cytotoxickém působení. Jsou popsány jeho antimikrobiální a protizánětlivé účinky. Podobně jako berberin inhiboval v dávkách 195 mg/kg/den srážení trombocytů u krys. Má též spasmolytickou a uterotonickou aktivitu. Lze očekávat, že koptisin vykazuje i řadu dalších efektů analogických berberinu.<sup>22</sup>

Druhý hlavní alkaloid chelidonin má významné spasmolytické účinky. Působí na spasmusy gastrointestinálního traktu a bronchů, snižuje tonus hladkého svalstva dělohy, uretry a cév. Jeho spasmolytický účinek je poloviční ve srovnání s papaverinem. Chelidonin též snižuje krevní tlak a zpomaluje srdeční aktivitu působením přes nervus vagus. Polští autoři uvádí, že chelidonin vykazuje inhibiční

účinek na dopaminergní struktury u krys v dávkách 50 - 200 mg/kg. Snižuje spontánní motorickou aktivitu a tělesnou teplotu. Potencuje akci hypnotik, zvyšuje tlumivý účinek reserpinu. Má cholagogní a choleretický účinek a ve žlučových cestách působí antisepticky. Má také antimitotické účinky.<sup>22</sup>

Značná pozornost byla věnována biologickým účinkům benzofenanthridinových alkaloidů sanguinarinu a chelerythrinu, které byly izolovány i z jiných rostlinných druhů, přičemž kořen vlaštovičniku patří k jejich nejvýznamnějším zdrojům. Již dlouhou dobu jsou známy a v praxi využívány protizánětlivé a antimikrobiální účinky těchto alkaloidů. V zemích bývalého Sovětského svazu je vyráběn preparát Sangviritrin, obsahující směs sanguinarinu a chelerythrinu. Užívá se jako zevní antimikrobiální přípravek. V Severní Americe jsou benzofenanthridinové alkaloidy součástí některých přípravků užívaných v ústní hygieně. Byly popsány inhibiční účinky sanguinarinu a chelerythrinu na celou řadu enzymů např. na cholinesterázy, alaninaminotransferázu, Na/K-ATPázu, Ca-ATPázu. Oba alkaloidy působí též jako rozpojovače respirace a oxidační fosforylace. S nativní dvouspirálou DNA vytváří komplexy typu interkalace, inhibují syntézu RNA na DNA matrici a enzymovou hydrolýzu DNA. Nedávno byla popsána inhibice proteinkinázy C chelerythrinem. Většina těchto inhibičních účinků je připisována interakci benzofenanthridinů s SH-skupinami enzymů. Oba alkaloidy mohou reagovat v závislosti na pH buď ve formě kvarterního kationtu, nebo terciární báze. Sanguinarin rovněž zvyšuje vodivost lipidové dvojvrstvy membrán. Chelerythrin, sanguinarin a chelidonin mají též prokazatelné antimitotické účinky. Zdá se, že mechanismus jejich působení naznačuje nedávné zjištění, že uvedené tři alkaloidy inhibují polymeraci tubulinu. Lze předpokládat, že antimikrobiální i cytostatická aktivita těchto alkaloidů je podmíněna výše uvedenými účinky na řadu klíčových enzymů buněčného metabolismu.

Řada významných fyziologických účinků byla popsána u kvarterního alkaloidu berberinu, jehož zastoupení v kořeni je srovnatelné se sanguinarinem. Tento alkaloid, jehož hlavním zdrojem jsou druhy rodu *Berberis* sp., má některé účinky podobné chelidoninu. V Evropě a na Dálném východě je po mnoho staletí užíván jako prostředek proti průjmu, žloutence a chronické dysenterii. Stimuluje sekreci žluče a má rovněž hypotenzivní, vasodilatační a sedativní účinky. V *in vitro* pokusech bylo popsáno, že působí jako agonista  $\alpha$ -2 adrenoreceptorů lidských krevních destiček. Působí inhibičně na některé enzymy a má antibakteriální účinky. Řada

prací se zabývá účinkem berberinu na srdeční aktivitu. V pokusech na zvířatech byly prokázány jeho pozitivní inotropní a dromotropní a negativní chronotropní efekty.<sup>22</sup>

Rovněž některé z nealkaloidních látek prokázaných v *Chelidonium majus* mají výrazné fyziologické účinky. Kyselina kávová i její estery mají spasmolytickou, cholagogní a antibakteriální aktivitu. Nebylo dosud zkoumáno, do jaké míry se na terapeutických efektech vlaštovičnicku mohou podílet tyto látky.<sup>22</sup>

## **4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST A VÝSLEDKY**

## **4.1. Všeobecné postupy**

### **4.1.1. Destilace**

Rozpouštědla byla před použitím destilována; nejprve byl zachycen předek (většinou s vodným azeotropem), poté bylo vydestilováno zbylých cca 90 % objemu rozpouštědla. Rozpouštědla byla uchovávána v hnědých nádobách.

### **4.1.2. Odpařování**

Odpařování chromatografických frakcí bylo prováděno na vakuové odparce při 40 °C za sníženého tlaku. Odpařování malých množství bylo prováděno proudem dusíku na vodní lázni při 40 °C za normálního tlaku.

### **4.1.3. Chromatografie**

#### **4.1.3.1. Sloupcová (kolonová) chromatografie**

Sloupcová chromatografie byla prováděna systémem stupňovité eluce na neutrálním oxidu hlinitém. Sloupec byl plněn obvyklým způsobem: nalitím suspenze adsorbentu do rozpouštědla. Vzorek byl nanesen na roztěru s malým množstvím oxidu hlinitého po vysušení v exsikátoru.

#### **4.1.3.2. Tenkovrstvá chromatografie (Thin-Layer Chromatography, TLC)**

TLC byla použita v systému N–komor (N = normální). Komory byly použity nasycené mobilní fází; v případě použití malých (válcových) komor probíhalo sycení cca 30 min, u klasických komor cca 1 hod. Chromatografie byla prováděna vzestupně.

## 4.2. Potřeby

### 4.2.1. Rozpouštědla

Cyklohexan, č.

Diethylether, č. bez stabilizátoru, destilovaný

Ethanol 95% denaturovaný methanolem, č.

Chloroform, č.

Methanol, č.

Diethylamin, č.

Toluen, č.

### 4.2.2. Chemikálie

Kyselina sírová 96%, p. a.

Vodný roztok chlorovodíku 36%, p. a.

Chlorovodík plyný, č.

Kyselina octová 99%, p. a.

Dusičnan bismutitý zásaditý, č.

Kyselina vinná, č.

Jodid draselný, p. a.

### 4.2.3. Detekční činidla

**D1:** Dragendorffovo činidlo podle Muniéra<sup>26</sup>

Roztok A: 1,7 g zásaditého dusičnanu bismutitého a 20 g kyseliny vinné se rozpustí v 80 ml vody.

Roztok B: 16 g jodidu draselného se rozpustí ve 40 ml vody.

Zásobní roztok: připraví se smísením roztoků A a B v poměru 1:1; může být uložen několik měsíců v lednici.

Činidlo pro analýzu: připraví se tak, že se k roztoku 5 ml kyseliny vinné rozpuštěné v 50 ml vody přidá 5 ml zásobního roztoku.

#### **4.2.4. Vytvářecí soustava pro tenkovrstvou chromatografii**

S1: Cyklohexan-diethylamin 9:1

#### **4.2.5. Chromatografické adsorbenty**

##### **Oxid hlinitý neutrální (Reanal) 0,1 - 0,2 mm**

Komerční adsorbent se suspenduje v 3násobném množství vody, po změření výluhu se suspenze zneutralizuje octovou kyselinou na pH ~5, povaří, odsaje ostře na nuči, a suspenduje několikrát v potřebném množství horké destilované vody (80 °C) a promyje, až je pH promývací vody prakticky neutrální. Po odsátí a několikadenním vysušení na bezprašném místě se aktivuje 12 hodin při 200 °C, po zchlazení v uzavřené nádobě se deaktivuje přidávkem 6 % vody, dobře promíchá a ponechá min. 24 hodin ekvilibrovat.

##### **Oxid hlinitý kyselý 0,1 - 0,2 mm**

Byl připraven modifikací popsané metody<sup>27</sup> z oxidu hlinitého neutrálního (Reanal): 1000 g adsorbentu bylo rozmícháno s 2 litry vodného roztoku chlorovodíku, 12 hodin mícháno vrtulovou míchačkou, po dalších 12 hodinách (za občasných míchání) byla suspenze ostře odfiltrována přes fritu a ponechána sušit na vzduchu za nepřístupu prachu po dobu 3 dnů za občasných míchání ve vrstvě nepřevyšující 2 cm. Po této době byl adsorbent aktivován 12 hod. při 200 °C v sušárně. Kyselost takto připraveného adsorbentu byla sledována titračně ve vodné suspenzi a pohybovala se v rozmezí 3,4 - 3,8 ml 0,1 M NaOH/10,0 g adsorbentu.

**Silufol® UV 254, Kavalier Votice, 15x15 cm**

**Kieselgel F<sub>254</sub>, Merck, 5x10 cm**

#### **4.2.6. Standardní látky**

Sanguinarin-hydrochlorid (Sigma-Aldrich)

Chelerythrin-hydrochlorid (Sigma-Aldrich)

Protopin (Sigma-Aldrich)

Allokryptopin (Sigma-Aldrich)

#### **4.2.7. Chemikálie a materiál pro stanovení biologické aktivity**

Acetylthiocholinjodid, ≥99,0% (Fluka, Sigma-Aldrich, Praha, ČR)

5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoová kyselina), DTNB, ≥98% (Sigma-Aldrich, Praha, ČR)

Dihydrát dihydrogenfosforečnanu sodného, p.a. (Lachema, Brno, ČR)

Dodekahydrát hydrogenfosforečnanu disodného, p.a. (Lachema, Brno, ČR)

Ethanol (Fluka, Sigma-Aldrich, Praha, ČR)

Hemolyzát lidských erytrocytů, který sloužil jako zdroj acetylcholinesterázy

Plastové kyvety DISPOLABKARTELL 1937 PS MICROCUVETTES

#### **4.2.8. Přístroje pro stanovení biologické aktivity**

Centrifuga CENTRIFUGE type MPW-340 (Mechanika precyzyjna, Varšava, Polsko)

pH metr Φ 72 METER (Beckmann, USA)

UV-spektrofotometr UVIKON 942 (Kontron instruments, Švýcarsko)

## 4.3. Izolace alkaloidů

### 4.3.1. Materiál

Droga (sušená nať s kořeny) byla získána sběrem firmy JUGODRVO AD v Chorvatsku v období července - září 2004 a po očištění sušena za normálních podmínek.

Makroskopickou, mikroskopickou a chemickou identifikaci provedel L. Opletal. Metodou podle ČL 2005<sup>28</sup> bylo stanoveno:

Cizí příměsi (2.8.2.):	12,2 %
Ztráta sušením (2.2.32.):	8,68 %
Celkový popel (2.4.16.):	16,8 %
Stanovení obsahu (alkaloidy jako chelidonin):	1,02 %

### 4.3.2. Příprava extraktu a jeho čištění

41,8 kg suché nati s kořeny bylo perkolováno 95% ethanolem (celkem získáno 480 l extraktu), extrakt byl zahuštěn na vakuové odparce při 60 °C do maximálního odstranění alkoholu, následně byly přidány asi 2 l vody. Vznikl temně hnědý, dehtovitý, sirupovitý odparek.

Tento extrakt byl rotací rozehřát na vodní lázni asi na 40 °C, bylo přidáno 8 litrů 1,5% kyseliny sírové (zahřáté na 40 °C) a směs byla tyčinkou dokonale promíchávána po dobu několika minut, potom byl oranžový roztok po zchlazení dokonale slit (dehtovité podíly plavaly jen málo na hladině, klesly ke dnu), dehet byl seškrabán, umístěn do velké kádinky, bylo přidáno 500 ml bezvodé kyseliny octové a na vodní lázni byla směs rozpuštěna na viskózní roztok. K tomuto roztoku bylo přidáváno po částech 7,5 l vody a promícháno; kalný oranžový roztok byl slit, černý pryskyřičnatý podíl rozpuštěn znovu ve 200 ml octové kyseliny, opět zahřát a srážen 4 l vody. Oba dekantáty byly spojeny, ponechány přes noc stát, poté oranžový roztok byl zfiltrován přes polyamidový filtr, ten byl promyt asi 1 litrem vody a ponechán vykapat. Oba kyselé filtráty (z kyseliny sírové i octové) byly spojeny; vyloučila se bělavá sraženina; vzniklá suspenze byla zfiltrována znova přes polyamidový filtr, filtr promyt 1,5 litrem 1,5% kyseliny sírové. Celkem bylo získáno 37 litrů filtrátu.

#### 4.3.2.1. Příprava alkaloidního výtřepku A z primárního extraktu

37 litrů takto připraveného kyselého oranžového roztoku síranů bylo opatrně a za stálého míchání neutralizováno nejprve pevným práškovým bezvodým uhličitánem sodným na pH cca 8 a posléze 10% roztokem uhličitánu sodného na pH 9; tekutina se výrazně zakalila a vyloučil se nahnědlý sediment. Tato suspenze byla po částech postupně vytřepána 5x celkem 15 litry diethyletheru, etherové vrstvy byly spojeny, odděleny od zbytku vodné fáze a rozpouštědlo oddestilováno. Vzniklo 182,0 g vysoce viskózního odparku hnědé barvy, který nekrystaloval.

#### 4.3.2.2. Čištění surového výtřepku A

151,0 g tohoto odparku bylo rozpuštěno při cca 50 °C celkem ve 4,2 litrech 0,3M kyselině sírové, kalný oranžový roztok zfiltrován papírovým filtrem a čirý filtrát vytřepán 5x postupně 1,2 litry diethyletheru; po zahuštění bylo zjištěno, že tento odparek je hmotnostně zcela minoritní (0,300 g) a obsahuje jen stopy Dragendorff-pozitivních látek.

#### 4.3.2.3. Příprava pseudokyanidů

Ke kyselému roztoku alkaloidů byl přidáván nasycený roztok kyanidu draselného až do alkalické reakce, přičemž se vyloučilo velké množství šedavé sraženiny. Tato suspenze byla okyselena 1M kyselinou sírovou na pH ~4, všechny alkaloidy kromě pseudobazí se znova rozpustily; suspenze byla ponechána několik hodin sedimentovat, poté byla tekutina dekantována, zbylá suspenze zfiltrována přes papírový filtr a promyta několikrát malým množstvím vody. Po několikahodinovém vysušení na vzduchu byla vysušena ve vakuovém exsikatoru nad silikagelem a rozetřena na okrový prášek (15,7 g).

15,7 g pseudokyanidů bylo zpracováno metodou podle Gadamera, jak uvádí profesor Slavík<sup>29</sup>, (ethanol + chloroform + 36% kyselina chlorovodíková = 1:2:1) resp.

suspendováno ve směsi 125 ml 95% ethanolu a 250 ml chloroformu, bylo přidáno 125 ml 36% kyseliny chlorovodíkové a proveden var pod zpětným chladičem po dobu 1 hodiny. Potom byl roztok na vakuové odparce odpařen do malého zbytku, zředěn 100 ml vody a zalkalizován 10% roztokem uhličitanu sodného na pH 9; fialová suspenze (celkem ~400 ml) byla vytřepána 5x 200 ml diethyletheru. Spojené diethyletherové výtřepky byly vytřepány 5x 100 ml 1M kyseliny sírové, kyselý roztok zalkalizován roztokem 10% uhličitanu sodného, suspenze vytřepána 5x 150 ml diethyletheru; uvedený postup byl opakován ještě jednou, aby došlo k vyčištění alkaloidní směsi. Byl získán světle hnědý, nekystalický odparek (6,01 g).

#### **4.3.2.4. Separace výtřepku A po odstranění benzofenanthridinových bazí**

Kyselý roztok po odstranění pseudokyanidů byl na vodní lázni zahřát na 40 °C a po dobu 15 minut míchán při dobrém odtahu digestoře. Potom byl ochlazen na teplotu místnosti, zalkalizován 10% roztokem uhličitanu sodného na pH 9 a vytřepán 5x 1,2 litry diethyletheru.

#### **4.3.2.5. Příprava fenolových alkaloidů z výtřepku A**

Spojené diethyletherové výtřepky byly vytřepány 3x 100 ml 5% hydroxidu sodného, louhová vrstva zneutralizována 1M kyselinou sírovou na pH 2 a zalkalizována 10% roztokem uhličitanu sodného na pH 9; tento roztok byl vytřepán 5x 100 ml diethyletheru a odpařen za vzniku minoritního hnědého, viskózního odparku (0,35 g).

#### **4.3.2.6. Příprava vyčištěného výtřepku A**

6 litrů diethyletherového výtřepku po odstranění fenolových bazí bylo vytřepáno 5x 300 ml 0,3M kyseliny sírové, roztok byl opět zneutralizován 10% roztokem uhličitanu sodného a vytřepán 5x 1,2 litry diethyletheru. Tento reverzní postup byl zopakován ještě jednou; po odpaření diethyletheru vznikl bělavý krystalizující odparek (80 g).

#### **4.3.2.7. Příprava chloridů nerozpustných ve vodě z výtřepku A a alkaloidů z nich**

80 g krystalizující alkaloidní směsi bylo rozpuštěno ve 350 ml 0,3M kyseliny sírové, přidáno 100 ml 36% kyseliny chlorovodíkové a po 1 hodině byly odfiltrovány nerozpustné chloridy, promyty vodou, roztok doplněn na 800 ml a znova odfiltrovány chloridy. Tyto chloridy byly suspendovány (rozpuštěny) v 6,4 litrech 0,3M kyseliny sírové, roztok byl zalkalizován 480 ml 25% amoniaku, bílá suspenze vytřepána 1x 2,5 litry diethyletheru a 2x 1,6 litry diethyletheru; světle nažloutlý roztok byl odpařen za vzniku prakticky bílého odparku (45,27 g).

#### **4.3.2.8. Příprava alkaloidů z chloridů rozpustných v chloroformu (AC)**

800 ml oranžového filtrátu po oddělení nerozpustných chloridů bylo vytřepáno 6x 250 ml chloroformu, chloroform odpařen, zbytek rozpuštěn ve 130 ml 0,3M kyseliny sírové, roztok zředěn vodou na 800 ml, zalkalizován 25% amoniakem na pH 9 a vytřepán 5x 600 ml diethyletheru za vzniku pevného, světle hnědého odparku (3,38 g).

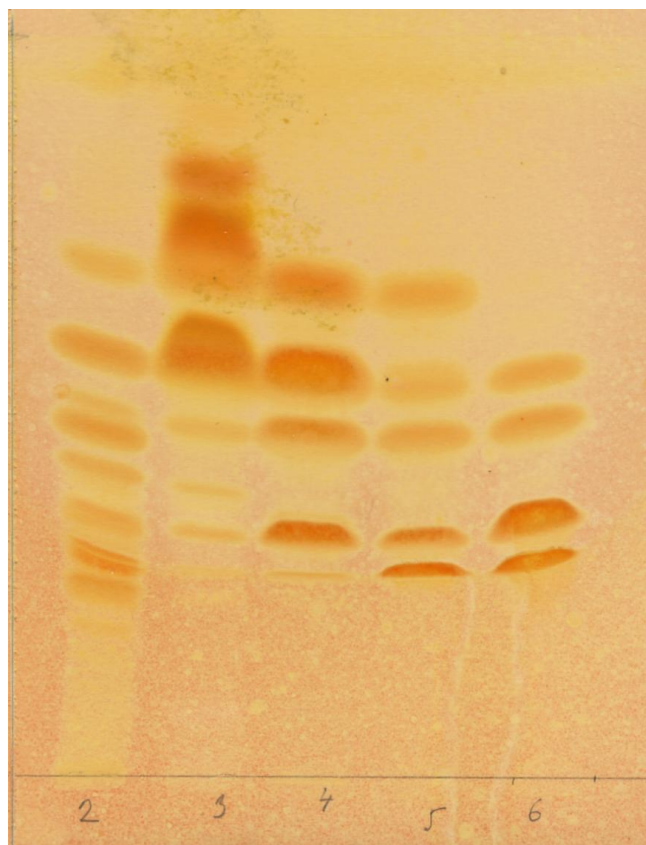
#### **4.3.2.9. Příprava alkaloidů z chloridů nerozpustných v chloroformu (AD)**

Zbýlý kyselý filtrát byl zneutralizován 25% amoniakem na pH ~9 a vytřepán 5x 300 ml diethyletheru. Organická vrstva byla odpařena za vzniku bílého práškovitého odparku (15,91 g).

Tab. 5. Výsledky přípravy výtřepků s terciárními a kvartérními bazemi z nati a kořene

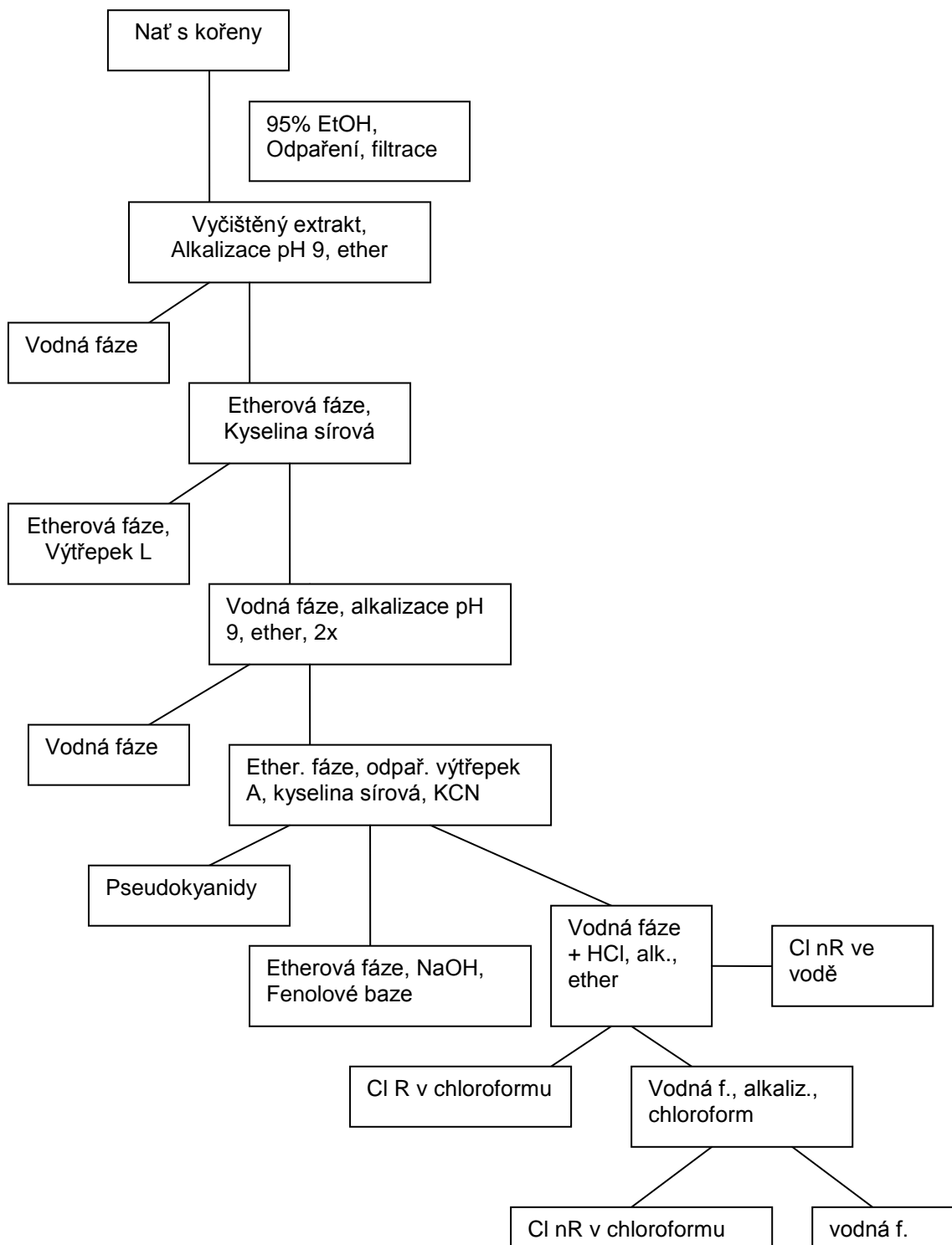
Označení	Č. na chromatog.	Odparek (g)	Popis
L	1	0,30	Tmavě hnědý s vylouč. kryst.
A-fenoly	2	0,35	Tmavě hnědý nafouklý
A-benzofenathr.	3	6,01	Hnědý, nafouklý
Cl <sup>-</sup> nR H <sub>2</sub> O	4	45,27	Nažloutlý, prakticky krystalický
AC (R Chf)	5	3,38	Světle hnědý, tvrdý
AD (nR Chf)	6	15,91	Práškovitý, bílý

Obr. 1. Kontrolní TLC jednotlivých typů výtřepků z nati a kořene vlaštovičníku



(Kieselgel F<sub>254</sub>, S1, komora nasycená, vyvíjení 1x detekce Dragendorffovo činidlo; popis viz předešlá tabulka)

Obr. 2. Schéma přípravy alkaloidních koncentrátů (extrakce nati a kořene vlašovičnicku)



### **4.3.3. Sloupcová chromatografie benzofenanthridinových alkaloidů připravených z pseudokyanidů**

Adsorbent: kyselý oxid hlinitý 0,1 - 0,2 mm, 1520 g

Chrom. lože: vrstva s adsorbentem: 5 x 75 cm

vrstva s frakcí: 5 x 1 cm

Nanáška: 550 mg vyčištěné směsi alkaloidů z pseudokyanidů

Frakce: 250 ml

Doba toku: ~20 min.

Alkaloidní směs byla rozpuštěna ve 20 ml chloroformu, smíchána s 20 g adsorbentu, rychle vysušena při 40 °C a dosušena 16 hodin ve vakuovém exsikátoru nad silikagelem. Potom byla nanesena na sloupec obvyklým způsobem.

Sloupec byl připraven nalitím suspenze adsorbentu ve směsi toluen nasycený vodou + octová kyselina + ethanol (97:1:2). Chromatografie byla prováděna za následujících podmínek (viz tab.6.)

Tab.6. Sloupcová chromatografie směsi benzofenanthridinových bazí

Souhrnná frakce	Frakce	Eluent*	Hmotnost (mg)	Popis
1-12	1-6	To-AcOH-EtOH 97:1:2	0	0
	7-12	To-AcOH-EtOH 97:1:5	30,2	Žlutohnědý, pevný
13-20	13-20	To-AcOH-EtOH 97:1:5	18,8	Žlutohnědý, pevný
21-36	21-30	To-AcOH-EtOH 97:1:6	112,4	Oranžový s krystalky
	31-36	To-AcOH-EtOH 97:1:6	62,5	Hnědooranžový, olejovitý
37-54	37-48	To-AcOH-EtOH 97:1:6	32,2	Hnědooranžový, olejovitý
	49-54	To-AcOH-EtOH 97:1:7	32,5	Oranžový, pevný
<b>55-78</b>	<b>55-70</b>	<b>To-AcOH-EtOH 97:1:9</b>	<b>128,7</b>	<b>Intenzivně žlutý, prášk.</b>
	<b>71-78</b>	<b>To-AcOH-EtOH 97:1:10</b>	<b>38,7</b>	<b>Žlutohnědý, pevný</b>
79-90	79-90	To-AcOH-EtOH 97:1:10	12,2	Hnědo-fialový, pevný

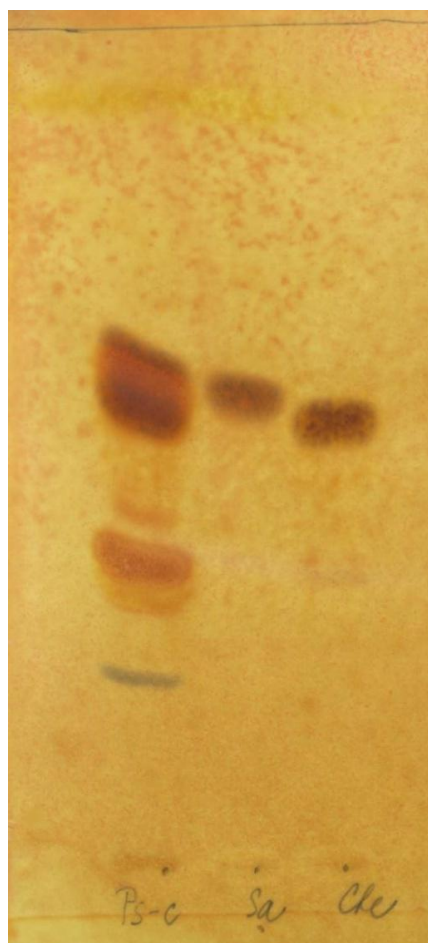
\* To – toluen nasycený vodou; AcOH – octová kyselina; EtOH – ethanol 95%

Jednotlivé frakce byly sledovány kontrolní TLC (Kieselgel F<sub>254</sub>, S1, komora nasycená, dráha 8,5 cm, Dragendorffovo činidlo) s použitím standardů sanguinarinu a chelerythrinu. Frakce stejné kvality byly spojeny a dále čištěny.

Obr. 3. Sloupcová chromatografie benzofenanthridinových alkaloidů připravených z pseudokyanidů



Viditelné světlo



Dragendorffovo činidlo

V dalším postupu jsem zpracovávala frakce 55 - 78. Jednalo se o alkaloid chelerythrin.

### Čištění frakcí 55 - 78 (chelerythrin)

Adsorbent: Silufol UV 254, 15 x 15 cm  
Vyvíjecí soustava: S1  
Počet desek: 24  
Nanášecí linie: 18 cm  
Vyvíjecí dráha: 13 cm, vyvíjeno 1x  
Hmotnost vzorku: 128,7 mg

Vzorek byl rozpuštěn ve směsi chloroform-ethanol 1:1 (10 ml) a za pomoci nanášecího zařízení Camag Linomat 5 bylo nanášeno ~500 µg vzorku/1 cm délky chromatografické desky předem vyčištěné (vyvinuté v S1). Po vyvinutí chromatogramu byl mechanicky separován adsorbent s hlavní zónou - zónou chelerythrinu (tato zóna byla zjištěna vyvinutím separátního chromatogramu na němž byl vedle děleného vzorku nanášen standard chelerythrinu) o  $R_F$  ~0,58-0,62. Adsorbent byl spojen, eluován v Pasteurově pipetě potřebné velikosti směsí chloroform-ethanol 1:1, rozpouštědlo odpařeno a odparek vysušen ve vakuu nad silikagelem. Bylo získáno 95,1 mg žluto-šedavého odparu, který byl krystalizován z 8% roztoku chlorovodíku (71,2 mg).

Na základě zjištěných experimentálních dat, porovnáním s literárními údaji a standardní látkou vyplynulo, že izolovaný alkaloid je chelerythrin.

**Chelerythrin-hydrochlorid**  $C_{21}H_{19}NO_4Cl$  (383,83), žluté jehlice, při teplotě nad 203 °C hnědnou, t. t. 211-213 °C (za rozkladu; změny 192-194; 202-204; 207 °C), směsná t. t. bez deprese, chromatografické srovnání se standardem (Kieselgel F<sub>254</sub>, S1, komora nasycená, Dragendorffovo činidlo,  $R_F$  0,65) bez rozdílu hodnot  $R_F$ .

Vypočteno C 65,71; H 4,99; N 3,65

Nalezeno C 65,81; H 4,72; N 3,71

Tab. 7. Chování benzofenanthridinových alkaloidů na vrstvě silikagelu

Látka	viditelné	366 bez ind.	254 s ind.
Chelerythrin HCl	žlutý	světle žlutý	žlutohnědý

## 4.4. Stanovení účinku alkaloidu na erytrocytární AChE (IC<sub>50</sub>)

### 4.4.1. Podmínky měření

Experimenty byly prováděny:

při teplotě 25°C

v prostředí PB,

při pH 7,4,

při vlnové délce spektrofotometru 436 nm,

v jednorázových plastových kyvetách o tloušťce 1 cm.

### 4.4.2. Stanovení hodnot IC<sub>50</sub>

Pro stanovení byl použit hemolyzát lidských erytrocytů, který sloužil jako zdroj acetylcholinesterázy: plná krev byla odstředěna po dobu 15 minut při 10000 ot./min., získaná erytrocytární masa byla 3x promyta 0,1M fosfátovým pufrům, pH 7,4, aby byly odstraněny zbytky plazmy; 10% (v/v) hemolyzát byl připraven ve vodě.

Do kyvety byly přidány 0,4 ml roztoku DTNB v 0,1M fosfátovém pufru (pH 7,4; výsledná koncentrace DTNB v kyvetě  $5 \times 10^{-3}$  M), 100 µl hemolyzátu z erytrocytů, 50 µl roztoku alkaloidu a 1,25 ml fosfátového pufru. Reakce byla zahájena přidáním 0,2 ml roztoku acetylthiocholinu (výsl. koncentrace v kyvetě  $10^{-3}$  M) a fotometrována při 436 nm za laboratorní teploty po dobu 3 min. Byla zaznamenávána délka absorbance, která je úměrná aktivitě erytrocytární acetylcholinesterázy.

Koncentrační řady alkaloidů byly připraveny v ethanolu tak, aby po přidání 50 µl roztoku alkaloidu byla výsledná koncentrace látky v kyvetě v rozpětí  $10^{-2} - 10^{-7}$ . Měření byla opakována pro každou koncentraci testované látky nejméně třikrát.<sup>30,31</sup>

### 4.4.3. Matematické zpracování experimentálních dat

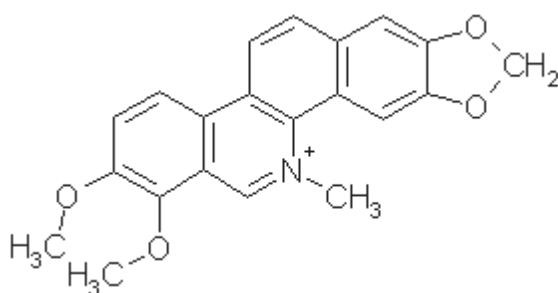
Hodnoty  $IC_{50}$  byly vypočítány z naměřených hodnot poklesu aktivity acetylcholinesterázy nelineární regresí v programu GraphPad Prism (verze 3.02 pro Windows; výrobce GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

### 4.4.4. Výsledky testů vlivu alkaloidu chelerythrinu na aktivitu acetylcholinesterázy

Látka	$IC_{50}[M]$	95% konfidenční interval [M]
Chelerythrin	$5,89 \times 10^{-6}$	$4,38 \times 10^{-6} - 7,94 \times 10^{-6}$

Naměřená hodnota,  $IC_{50} = 5,89 \times 10^{-6}$  M, ukazuje, že účinnost alkaloidu chelerythrinu je poměrně vysoká.

Obr. 4. Chelerythrin



## **5. DISKUSE**

Alzheimerova demence je velice náročné onemocnění nejen pro samotného pacienta, ale také pro jeho okolí. Nejen z hlediska zdravotního, ale i z hlediska sociálního a ekonomického. Léčba tohoto onemocnění je komplikovaná a problematická.

V současné době je pozornost zaměřena na látky ovlivňující acetylcholinergní systém, který je u Alzheimerovy choroby nejvíce postižen. Nedostatek acetylcholinu v CNS se podílí na rozvoji demence. Protože řada sloučenin z přírodních látek má kromě příznivých centrálních cholinomimetických účinků také účinky periferní, nelze je použít. Právě výrazné periferní účinky těchto látek mohou vést k řadě nežádoucích účinků jako jsou např. křeče, pocity slabosti, průjmy, pocení, tachyarytmie. Významným cholinomimetikem je např. fysostigmin, ale vzhledem k jeho závažným vedlejším účinkům je těžko použitelný. V současné době se začíná prakticky využívat galanthamin, velmi intenzivně se pracuje na různých galanthaminových derivátech.<sup>32</sup> Velmi perspektivní přírodní látka je alkaloid izolovaný z některých zástupců čeledi Lycopodiaceae – huperzin A. Tento alkaloid stačí podávat v podstatně nižších dávkách než galanthamin. Poněkud obtížnější je v současnosti jeho získávání než u ostatních přírodních látek, nicméně rozsáhlé syntetické studie dokazují, že se tato látka bude připravovat zcela synteticky.<sup>33</sup>

Probíhající výzkum v této oblasti je velmi intenzivní, protože reálně použitelných léčiv v této farmakoterapeutické skupině je jen několik (z hlediska zásahu do aktivity cholinergního mozkového systému). Je zaměřen nejen na látky syntetické, ale více než v kterékoli jiné skupině léčiv se zejména v poslední době orientuje na látky přírodního původu; jak už bylo dříve uvedeno<sup>18,19</sup>, ve skupině přírodních látek se objevují relativně účinné sloučeniny (nutno však říci, že pouze *in vitro* a v prvé, experimentální fázi studia). Velmi atraktivní se jeví studium alkaloidů (galanthamin a huperzin A jsou vůdčími látkami, z nichž první se už v praxi objevila jako léčivo, druhá se patrně v nejbližší době bude také etablovat); výhodou práce s těmito látkami je to, že se jedná o sloučeniny s nábojem a je proto relativně snadné je čistit a připravit s menšími preparativními náklady a časově rychleji, než sloučeniny zcela neutrální.

Vztah struktury a účinku isoform lidské AChE není zásadně vyjasněn, ačkoliv jsou v tomto směru prováděny poměrně rozsáhlé studie, z nichž velkou část zahrnuje matematicko-strukturní modeling. Prohlédneme-li struktury známých, biologicky vysoce účinných alkaloidů s přihlédnutím k jejich konformační fenomenologii, na

cholinergní mozkový systém (resp. na mozkové AChE), nezjistíme v řadě případů významnou podobnost, a přesto mají látky podobné hodnoty  $IC_{50}$ . Je nutno konstatovat, že při řešení situace je nutno vzít v úvahu vliv těchto látek na BuChE, ale především, vedlejší (nežádoucí) periferní účinky.

Látky s významnou biologickou aktivitou vůči AChE jsou některé isochinolinové alkaloidy některých zástupců taxonů z čeledí Papaveraceae a Fumariaceae, v tomto případě z vlaštovičnicku většího. Týká se to jak alkaloidů obsažených v nati, tak alkaloidů z kořenů (jde především o isochinolinové struktury benzofenanthridinového, protoberberinového, protopinového typu a kvartérní aporfíny). Výzkum těchto látek se v poslední době rozšiřuje: bylo zjištěno, že především benzofenanthridiny (chlerythrin a sanguinarin) jeví poměrně zajímavou aktivitu *in vitro*. Sleduje se vliv a účinek těchto alkaloidů na různé struktury, např. efekt na některé savčí buňky (leukocyty a lymfocyty)<sup>34</sup>, inhibiční vliv na  $\alpha$ -amylázu<sup>35</sup>, inhibiční vliv na 5- a 12-lipoxygenasu neredoxním mechanismem<sup>36</sup>. Pozornost je rovněž věnována vlivu alkaloidů z některých blízkých rostlin, např. *Bocconia (Mecleaya) cordata* na hydrolýzu acetylthiocholinu a AChE.<sup>37</sup> Již dlouhou dobu jsou známy a v praxi využívány protizánětlivé a antimikrobiální účinky těchto alkaloidů.

Také na katedře farmaceutické botaniky a ekologie, farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové byl zahájen projekt, zabývající se screeningem alkaloidů nejen z rostlin čeledi Papaveraceae a Fumariaceae na AChE a BuChE; jedním z cílů tohoto projektu je izolace alkaloidů z rostlinného materiálu a stanovení jejich biologické aktivity ( $IC_{50}$  na AChE a BuChE). Tyto hodnoty se mají stát spolu s dalšími experimentálními výsledky zdrojem pro tvorbu matematických modelů pravděpodobnostně predikujících optimální farmakoforovou skupinu. Zahájení této práce bylo provedeno právě na izolaci alkaloidů z vlaštovičnicku většího. K této izolaci bylo použito 41,8 kg celé sušené rostliny (nať a kořen), pocházející z Chorvatska. Vycházelo se z poznatků prof. Slavíka<sup>24,38</sup>, jehož pracovní skupina se alkaloidy rostlin z čeledi Papaveraceae a Fumariaceae (ovšem pouze z preparativního hlediska) zabývala od 50. do 70. let minulého století. Velký objem jím publikovaných prací umožnil shromáždit významné poznatky, které mohou být využity pro urychlení izolace alkaloidů. V našich podmínkách však některé údaje nemohly být využity – droga pocházela z poněkud jiné geografické oblasti, některé alkaloidy v ní byly obsaženy prakticky jen stopově. Ukazuje se také, že jednoduché krystalizační metody, popisované v pracích, nemohou být ve většině případů použity, ačkoliv jsou

účinné: získané alkaloidy musí být čisté, nesmí obsahovat směs látek podobných, protože zjištěné hodnoty  $IC_{50}$  by nebyly zcela odpovídající deklarovaným strukturám a tím by matematické modelování pracovalo s nepřesnými údaji.

Po odstranění málo bazických alkaloidů a ostatních znečištěnin z kyselého roztoku alkaloidů (151 g odparku A) byly připraveny pseudokyanidy (6,01g), separovány fenolové alkaloidy (0,35 g), připraveny alkaloidy z chloridů nerozpustných ve vodě (45,27 g), z chloridů rozpustných v chloroformu (3,38 g) a z chloridů nerozpustných v chloroformu (15,91 g). Ve své práci jsem se věnovala dělení benzofenanthridinových alkaloidů připravených z pseudokyanidů a dále změření biologické aktivity alkaloidu chelerythrinu na erythrocytární acetylcholinesterázu.

Ke stanovení účinku alkaloidu na erythrocytární AChE byl použit hemolyzát lidských erythrocytů, který sloužil jako zdroj acetylcholinesterázy: plná krev byla odstředěna po dobu 15 minut při 10000 ot./min, získaná erythrocytární masa byla 3x promyta 0,1M fosfátovým pufrům, pH 7,4, aby byly odstraněny zbytky plazmy; 10% (v/v) hemolyzát byl připraven ve vodě.

Do kyvety byly přidány 0,4 ml roztoku DTNB v 0,1M fosfátovém pufru (pH 7,4; výsledná koncentrace DTNB v kyvetě  $5 \times 10^{-3}$  M), 100  $\mu$ l hemolyzátu z erythrocytů, 50  $\mu$ l roztoku alkaloidu a 1,25 ml fosfátového pufru. Reakce byla zahájena přidáním 0,2 ml roztoku acetylthiocholinu (výsl. koncentrace v kyvetě  $10^{-3}$  M) a fotometrována při 436 nm za laboratorní teploty po dobu 3 min. Byla zaznamenávána délka absorbance, která je úměrná aktivitě erythrocytární acetylcholinesterázy.

Koncentrační řady alkaloidů byly připraveny v ethanolu tak, aby po přidání 50  $\mu$ l roztoku alkaloidu byla výsledná koncentrace látky v kyvetě v rozpětí  $10^{-2} - 10^{-7}$ . Měření byla opakována pro každou koncentraci testované látky nejméně třikrát.

Při sledování kompetitivní inhibice těchto alkaloidů *in vitro* je nutné vzít v úvahu zejména dva faktory: možnou protonizaci látky a výchozí zdroj AChE. Chelerythrin je látkou kvartérní a je známo, že řada kvartérních sloučenin je v těchto pokusech účinná, je však otázkou, jak by tato látka procházela hematoencefalickou bariérou právě z důvodu obsahu kvartérního dusíku. Jednoznačný závěr nelze provést, nejsou k dispozici prozatím validní experimentální data. Dřívější jednoznačný závěr, že látky s kvartérním dusíkem jsou neprostopné přes hematoencefalickou bariéru, už není brán doslova: bylo prokázáno, že prostup v tomto případě existuje, jeho intenzita je však závislá na celkové struktuře molekuly.

Velikost hodnoty  $IC_{50}$  je bezesporu hodnotou závislou na výchozím zdroji AChE: pro tento pokus byla zvolena AChE humánní erytrocytární, a proto je její porovnání s ostatními typy AChE (zvířecími) poměrně problematické. Ideální by bylo použití AChE mozkové, humánní: pilotní pokus s touto rekombinantní AChE byl proveden, výsledky jsou však velmi špatné. Tato acetylcholinesteráza je velmi drahá a má velmi krátkou trvanlivost (po 1 hodině od doby naředění je prakticky nepoužitelná) a doposud se tento problém nepodařilo vyřešit. Ideální variantu by představovalo použití temporální části lidské mozkové tkáně, dosud je to však neproveditelné z etických i hygienických důvodů.

Podle naměřených hodnot  $IC_{50}$  u chelerythrinu,  $IC_{50} = 5,89 \times 10^{-6}$  M, lze usuzovat, že chelerythrin je látkou se zajímavou biologickou účinností. Pro porovnání uvádím hodnoty  $IC_{50}$  i u jiných látek, přestože jejich porovnání s naměřenou hodnotou u chelerythrinu je poměrně problematické. Biologická aktivita těchto látek byla totiž měřena na homogenátu krysího mozku. Např. u huperzinu A byla naměřena hodnota  $IC_{50} = 74,43 \times 10^{-6}$  M, u galanthaminu  $IC_{50} = 12,59 \times 10^{-6}$  M, u fysostigminu  $IC_{50} = 1,26 \times 10^{-6}$  M.<sup>33</sup>

Je ovšem zřejmé, že alkaloid chelerythrin je látkou, která je zajímavá z hlediska dalšího studia přírodních látek.

## **6. SOUHRN**

K izolaci alkaloidů z *Chelidonium majus* L. bylo použito 41,8 kg celé sušené rostliny (nať a kořen). Na extrakci drogy jsem se podílela spolu s dalšími doktorandkami Mgr. Šárkou Bryndovou, Mgr. Evou Vítkovou a Mgr. Dagmar Kubincovou. Přípravou extraktu a jeho čištěním jsme získaly pseudokyanidy, alkaloidy fenolové, alkaloidy z chloridů nerozpustných ve vodě, alkaloidy z chloridů rozpustných v chloroformu a z chloridů nerozpustných v chloroformu. Zabývala jsem se dělením benzofenanthridinových alkaloidů připravených z pseudokyanidů a izolovala jsem alkaloid chelerythrin (za použití standardu chelerythrinu a porovnáním fyzikálně-chemických údajů s literaturou). U tohoto alkaloidu byla změřena biologická aktivita (schopnost inhibovat acetylcholinesterázu) na erytrocytární AChE. Naměřená hodnota,  $IC_{50} = 5,89 \times 10^{-6}$  M, ukazuje, že účinnost alkaloidu chelerythrinu je poměrně vysoká.

## **7. LITERATURA**

- <sup>1</sup> Jiráček, R. Koukolník, F.: Demence, neurobiologie, klinický obraz, terapie. Galén, Praha, 107–165 (2004).
- <sup>2</sup> Pydychová, E.: Alzheimerova nemoc. Solutio 2002/2003, 21-28 (2002).
- <sup>3</sup> Koukolík, F., Jiráček, R.: Alzheimerova nemoc a další demence. Grada Publishing, Praha, 214-219 (1998).
- <sup>4</sup> Giacobini, E.: Cholinesterases: new roles in brain function and in Alzheimer's disease. Neurochem. Res. **28** (3-4), 515-22 (2003).
- <sup>5</sup> Greig, N. H., Lahiri, D. K., Sambamurti, K.: Butyrylcholinesterase: an important new target in Alzheimer's disease therapy. Int. Psychogeriatr. **14** (1), 77-91 (2002).
- <sup>6</sup> Mills, C., Cleary, B. J., Gilmer, J. F., Walsh, J. J.: Inhibition of acetylcholinesterase by Tea Tree oil. J. Pharm. Pharmacol. **56** (3), 375-9 (2004).
- <sup>7</sup> Zaheer-UI-Haq, Z. U., Wellenzohn, B., Liedl, K. R., Rode, B. M.: Molecular docking studies of natural cholinesterase-inhibiting steroidal alkaloids from *Sarcococca saligna*. J. Med. Chem. **46** (23), 5087-90 (2003).
- <sup>8</sup> Orhan, I., Terzioglu, S., Sener, B.: Alpha-onocerin: an acetylcholinesterase inhibitor from *Lycopodium clavatum*. Planta Med. **69**(3), 265-7 (2003).
- <sup>9</sup> Lamirault, L., Guillou, C., Thal, C., Simon, H.: (-)-9-Dehydrogalanthaminium bromide, a new cholinesterase inhibitor, enhances place and object recognition memory in young and old rats. Neurobiol. Learn. Mem. **80** (2), 113-22 (2003).
- <sup>10</sup> Piotrovsky, V., Van Peer, A., Van Osselaer, N., Armstrong, M., Aerssens, J.: Galantamine population pharmacokinetics in patients with Alzheimer's disease: modeling and simulations. J. Clin. Pharmacol. **43** (5), 514-23 (2003).

- <sup>11</sup> Corey-Bloom, J.: Galantamine: a review of its use in Alzheimer's disease and vascular dementia. *Int. J. Clin. Pract.* **57**(3), 219-23 (2003).
- <sup>12</sup> Simon, B. B., Knuckley, B., Powell, D. A.: Galantamine facilitates acquisition of a trace-conditioned eyeblink response in healthy, young rabbits. *Learn. Mem.* **11** (1), 116-22 (2004).
- <sup>13</sup> Zangara, A.: The psychopharmacology of huperzine A: an alkaloid with cognitive enhancing and neuroprotective properties of interest in the treatment of Alzheimer's disease. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **75** (3), 675-86 (2003).
- <sup>14</sup> Kelly, S. A., Foricher, Y., Mann, J., Bentley, J. M.: A convergent approach to huperzine A and analogues. *Org. Biomol. Chem.* **1** (16), 2865-76 (2003).
- <sup>15</sup> Jin, G., Luo X., He, X., Jiang, H., Zhang, H., Bai, D.: Synthesis and docking studies of alkylene-linked dimers of (-)-huperzine A. *Arzneimittelforsch.* **53** (11), 753-7 (2003).
- <sup>16</sup> Darvesh, S., Walsh, R., Martin, E.: Enantiomer effects of huperzine A on the aryl acylamidase activity of human cholinesterases. *Cell Mol. Neurobiol.* **23** (1), 93-100 (2003).
- <sup>17</sup> Cordato, D. J., Mather, L. E., Herkes, G. K.: Stereochemistry in clinical medicine: a neurological perspective. *J. Clin. Neurosci.* **10** (6), 649-54 (2003).
- <sup>18</sup> Opletalová, V., Opletal, L., Jun, D.: Pokroky ve vývoji cholinergik pro léčbu Alzheimerovy choroby. Sborník abstraktů z 34. konference: Syntéza a analýza léčiv. Brno 12.-14. 9. 2005, s. 27.

- <sup>19</sup> Opletal, L., Opletalová, V.: Současné uplatnění některých přírodních látek v terapii demencí Alzheimerova typu. Sborník abstraktů z 34. konference: Syntéza a analýza léčiv. Brno 12.-14. 9. 2005, s. 26.
- <sup>20</sup> Blaschek, W., Ebel, S., Hackenthal, E., Holtzgrabe, U., Kellner, K., Reichling, J., Schnetz, V. et al.: Hager ROM 2004: Hager's Handbuch der Drogen und Arzneistoffe. Springer & Info II Uni. Würzburg, Würzburg (2005).
- <sup>21</sup> Hron, F., Zejbrlík, O.: Rostliny strání, skal, křovin a lesů, kapesní atlas. Státní pedagogické nakladatelství, Praha, 130-131 (1987).
- <sup>22</sup> Táborská, E., Bochořáková, H., Dostál, J., Paulová, H.: Vlaštovičník větší (*Chelidonium majus*) – přehled současného stavu poznatků. Čes. Slov. Farm. **44** (2), 71-75 (1995).
- <sup>23</sup> Slavík, J.: Alkaloidy rostlin makovitých (Papaveraceae) V. Isolace stylopinu z vlaštovičníku (*Chelidonium majus* L.). Chem. Listy **48**, 1557-1559 (1954).
- <sup>24</sup> Slavík, J.: Alkaloidy rostlin makovitých (Papaveraceae) I. Látky z vlaštovičníku (*Chelidonium maius* L.). Českoslov. Farm. **1**, 15-17, (1954).
- <sup>25</sup> <http://botanika.wendys.cz/kytky/K261.php>; staženo 24.7.2007.
- <sup>26</sup> Stahl, E.: Thin-Layer Chromatography. A laboratory handbook. Springer – Verlag Berlin, Heidelberg, New York, s. 873 (1969).
- <sup>27</sup> Slavík, J., Slavíková, L.: Alkaloide der Mohnengewächse (Papaveraceae) XVII. Über neue Alkaloide aus *Sanguinaria canadensis* L. Coll. Czech Chem. Commun. **25**, 1667-1675 (1960).
- <sup>28</sup> Český lékopis 2005 Doplněk 2006, elektronická verze, Grada Publ. A. s., Praha 2006.

- <sup>29</sup> Slavík, J., Slavíková, L.: Alkaloidy rostlin makovitých (Papaveraceae) II. Dělení chelerythrinu a sanguinarinu a nález dvou nových alkaloidů ve vlaštovičníku (*Chelidonium majus* L.). Chem. listy **48**, 1382-1386 (1954).
- <sup>30</sup> Bajgar, J.: Stanovení aktivity cholinesteráz v lidské krvi – možná modifikace pro polní použití. Vojenské zdravotnické listy **XLI** (2), 78-80 (1972).
- <sup>31</sup> Ellman G. L., Courtney D. K., Andres V., Featherstone R.M.: A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochem. Pharmacol. **7**, 88-95 (1961).
- <sup>32</sup> Bores, G. M., Kosley, R. W. Jr.: Galanthamine derivatives for treatment of Alzheimer's diseases. Drugs Fut. **21** (6), 621-635 (1996).
- <sup>33</sup> Tang, X. C., He X. C., Bai, D. L.: Huperzin A: a novel acetylcholinesterase inhibitor. Drugs Fut., **24** (6), 647-663 (1999).
- <sup>34</sup> Vavřečková, C., Ulrichová, J., Hajduch, M., Grambal, F., Weigl, E., Simanek, V.: Effect of quaternary benzo[c]phenanthridine alkaloids sanguinarine, chelerythrine and fagaronine on some mammalian cells. Facultatis Medicae **138**, 7-10 (1994).
- <sup>35</sup> Zajoncová, L., Kosina, P., Vicar, J., Ulrichová, J., Pec, P.: Study of the inhibition of  $\alpha$ -amylase by the benzo[c]phenanthridine alkaloids sanguinarine and chelerythrine. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry **20** (3), 261-267 (2005).
- <sup>36</sup> Vavřečková, C., Gawlik, I., Mueller, K.: Benzophenanthridine alkaloids of *Chelidonium majus*. Part 1. Inhibition of 5- and 12-lipoxygenase by a non-redox mechanism. Planta Med. **62** (5), 397-401 (1996).

<sup>37</sup> Kuznetsová, L. P., Nikol'skaya, E. B., Sochilina, E. E., Faddeeva, M. D.: Inhibition of enzymatic hydrolysis of acetylthiocholine with acetylcholinesterase by principal alkaloids isolated from *Chelidonium majus* and *Macleya* and by derivate drugs. *Citologija*. **43** (11), 1046-1050 (2001).

<sup>38</sup> Slavík, J., Slavíková, L.: Minor alkaloids from *Chelidonium majus* L. *Coll. Czech. Chem. Commun.* **42**, 2686 – 2693 (1977).

# ABSTRAKT

Nagyová, J.: Biologická aktivita obsahových látek rostlin XV. Vliv alkaloidů z *Chelidonium majus* L. na acetylcholinesterázu, Rigorózní práce, Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hr. Králové, 67 stran.

*Klíčová slova:* Alzheimerova choroba, alkaloidy, *Chelidonium majus*, acetylcholinesteráza, biologická aktivita.

V rámci screeningu rostlin s obsahem alkaloidů, které inhibují aktivitu lidské erytrocytární acetylcholinesterázy byl podroben studiu vlaštovičník větší (*Chelidonium majus* L., Papaveraceae). K izolaci alkaloidů bylo použito 41,8 kg celé sušené rostliny (nať a kořen); z vyčištěného ethanolového extraktu byly získány směsi pseudokyanidů benzofenantridinových alkaloidů, dále fenolové baze a alkaloidy z chloridů rozpustných i nerozpustných v chloroformu.

Zabývala jsem se dělením benzofenantridinových alkaloidů připravených z pseudokyanidů; z této směsi jsem kombinací sloupcové a tenkovrstvé chromatografie izolovala chelerythrin ve formě chloridu (porovnáním s autentickým standardem a porovnáním fyzikálně-chemických charakteristik izolované látky s údaji v literatuře).

Biologická aktivita (inhibice lidské erytrocytární acetylcholinesterázy) byla  $IC_{50}$   $5,89 \cdot 10^{-6}$  M. V porovnání s biologickou aktivitou standardních alkaloidních inhibitorů acetylcholinesterázy (galanthaminu a fysostigminu) se jedná o látku, která je zajímavá z hlediska dalšího studia přírodních látek, které by se mohly uplatnit jako výchozí struktury pro studium potenciálních léčiv vůči Alzheimerově chorobě.

# ABSTRACT

Nagyová, J.: Biological activity of plant metabolites XV. Influence of alkaloids from *Chelidonium majus* L. on acetylcholinesterase, Rigorous work, Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy Hradec Králové, 67 pp.

*Key words:* Alzheimer's disease, alkaloids, *Chelidonium majus*, acetylcholinesterase, biological activity.

Within the screening of plants that contain alkaloids inhibiting the activity of the human erythrocytic acetylcholinesterase Greater celadine (*Chelidonium majus* L., Papaveraceae) was studied. 41.8 kg of the whole dry plant (the aerial part with the roots) served for the isolation of alkaloids. Mixtures of pseudocyanides of benzophenanthridine alkaloids, phenolic bases, and the alkaloids precipitated from either chloroform-soluble or chloroform-insoluble chlorides were obtained from the purified ethanolic extract. My task was to separate benzophenanthridine alkaloids from pseudocyanides. Using both column and thin layer chromatography chelerythrine as a chloride was isolated. The identity of the isolated alkaloid was determined by means of an authentic standard and by comparing its physico-chemical characteristics with the published data.

The isolated compound inhibited the human erythrocytic acetylcholinesterase with  $IC_{50} 5.89 \cdot 10^{-6}$  M. Comparing its biological activity with that of standard alkaloid inhibitors (galanthamine and physostigmine) the isolated substance is an interesting regarding further studies of natural products that could serve as lead compounds for the development of potential drugs against the Alzheimer's disease.

# PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem rigorózní práci na téma „BIOLOGICKÁ AKTIVITA OBSAHOVÝCH LÁTEK ROSTLIN XV. VLIV ALKALOIDŮ Z *CHELIDONIUM MAJUS* L. NA ACETYLCHOLINESTERÁZU“ vypracovala samostatně s konzultací a pomocí mého školitele. Použité prameny jsou uvedeny v literárních odkazech.

V Hradci Králové  
3.9.2007

.....  
podpis

