

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

RIGORÓZNÍ PRÁCE

Biologicky aktivní metabolity rostlin

**III. Alkaloidy *Chelidonium majus* L. a jejich neurotropní a
antioxidační aktivita**

Biologically active metabolites of plants.

**III. Alkaloids from *Chelidonium majus* L. and their neurotropic and
antioxidant activity**

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

2011

Mgr. Lenka Šebestová

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že tato diplomová práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.

Hradec Králové, 9.10.2011

Lenka Šebestová

Tato rigorózní práce vznikla v rámci projektu Specifického vysokoškolského výzkumu SVV/2011/263002.

Děkuji Ing. Lucii Cahlíkové PhD. za veškerou pomoc s vypracováním rigorózní práce, za poskytnuté materiály a cenné odborné rady. Děkuji také panu Ing. Milanovi Kurfürstovi PhD. z Ústavu chemických procesů za změření a interpretaci NMR spekter izolovaných látek a Ing. Kateřině Macákové za změření biologických aktivit izolovaných látek. Dále bych chtěla poděkovat celé katedře Farmaceutické botaniky a ekologie za velmi příjemné pracovní prostředí a také mé rodině za veškerou podporu a porozumění.

OBSAH

1. ÚVOD	5
2. CÍL PRÁCE	8
3. TEORETICKÁ ČÁST	10
3.1. Alzheimerova choroba	11
3.1.1 Příznaky	11
3.1.2. Genetika Alzheimerovy choroby	12
3.1.3. Charakteristické neurobiologické změny při Alzheimerově nemoci	12
3.1.3.1. Tvorba beta-amyloidu	13
3.1.3.2. Degradace tau-proteinu	14
3.1.3.3. Apolipoprotein E	14
3.1.3.4. Acetylcholinergní systém	14
3.1.3.5. Glutamátergní systém	15
3.1.4 Diagnostika	17
3.1.5. Terapie	17
3.1.5.1. Látky ovlivňující acetylcholinergní systém	18
3.1.5.2. Inhibitory NMDA receptorů	24
3.1.5.3. Nootropika	25
3.1.5.4 Nekognitivní terapie	25
3.1.5.5. Nebiologické terapeutické přístupy	26
3.2. Benzofenanthridinové alkaloidy	27
3.2.1. Struktura	28
3.2.2. Biologické účinky benzofenanthridinových alkaloidů	29
3.2.3. Rostliny s významným obsahem benzofenanthridinových alkaloidů	30
3.2.3.1. <i>Chelidonium majus</i>	30
3.2.3.2. Rod <i>Zanthoxylum</i>	33

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	43
4.1. Všeobecné postupy	44
4.1.1. Destilace a odpařování	44
4.1.2. Chromatografie	44
4.2. Materiál a vybavení	45
4.2.1. Chemikálie	45
4.2.2. Rozpouštědla	45
4.2.3. Chemikálie a materiál ke stanovení účinku erythrocytární AChE a BuChE	45
4.2.4. Přístroj použitý ke stanovení cholinesterázové inhibiční aktivity	46
4.2.5. Chemikálie a materiál ke stanovení antioxidační aktivity	46
4.2.6. Přístroje použité při stanovování antioxidační aktivity	46
4.2.7. Detekční činidla	46
4.2.8. Chromatografické adsorbenty	47
4.2.9. Vyvíjecí soustavy pro tenkovrstvou chromatografii	47
4.2.10. Vyvíjecí soustavy pro preparativní tenkovrstvou chromatografii	47
4.3. Extrakce alkaloidů z nati <i>Chelidonium majus</i> a zpracování výtřepku A	48
4.3.1. Původ drogy	48
4.3.2. Příprava sumárního extraktu	48
4.3.3. Příprava výtřepku A z primárního extraktu	49
4.3.4. Příprava pseudokyanidů benzofenanthridinových alkaloidů z výtřepku A Gadamerovou metodou	49
4.4. Sloupcová chromatografie výtřepku benzofenanthridinových alkaloidů z <i>Chelidonium majus</i>	51
4.5. Zpracování frakcí 22 – 28	53
4.6. Zpracování frakce 43	54
4.7. Určení struktury izolovaných látek	55
4.7.1. Měření hmotnostního spektra (MS)	55

4.7.2.	Měření NMR spektra	55
4.7.3.	Měření bodu tání	55
4.8.	Stanovení inhibiční aktivity alkaloidů vůči AChE a BuChE	55
4.8.1.	Podmínky měření	55
4.8.2.	Příprava erytrocytárních pouzder	56
4.8.3.	Stanovení cholinesterázové inhibiční aktivity (hodnoty IC ₅₀)	56
4.9.	Stanovení antioxidační aktivity získaných alkaloidů	56
5.	VÝSLEDKY	58
5.1.	Strukturní analýza 6-ethoxydihydrosanguinarinu	59
5.1.1.	MS studie 6-ethoxydihydrosanguinarinu	59
5.1.2.	NMR studie 6-ethoxydihydrosanguinarinu	59
5.1.2.1.	¹ H-NMR spektrum	59
5.1.2.2.	¹³ C-NMR spektrum	60
5.2.	Strukturní analýza 6-ethoxydihydrochelerythrinu	60
5.2.1.	MS studie 6-ethoxydihydrochelerythrinu	60
5.2.2.	NMR studie 6-ethoxydihydrochelerythrinu	60
5.2.2.1.	¹ H-NMR spektrum	60
5.2.2.2.	¹³ C-NMR spektrum	61
5.3.	Inhibiční aktivita vůči AChE a BuChE	61
5.4.	Antioxidační aktivita	62
6.	DISKUZE	63
7.	LITERATURA	66
8.	SEZNAM ZKRATEK	73

1. ÚVOD

V posledních letech je zřejmý zvýšený zájem o získávání biologicky aktivních látek z přírodních zdrojů. Z hlediska chemického představují biologicky aktivní látky izolované z přírodních zdrojů velice pestrou paletu struktur, např. alkaloidy, isoprenoidy, steroidy, glykosidy, peptidy, eikosanoidy, polysacharidy a mnohé další. Stejně pestrý je i výčet jejich biologických účinků¹.

K nejvýznamnějším skupinám látek obsažených v rostlinách patří alkaloidy, sekundární metabolity vznikající z aminokyselin. Alkaloidy bývají často silně účinné látky, které rostliny nejčastěji produkují jako ochranu před škůdci (tzv. fytoalexiny). Tyto toxické látky mívají v subletálních dávkách často významné farmakologické vlastnosti. V současné době bylo identifikováno na 10 000 alkaloidů, které se podle své struktury dělí do několika skupin.

Tato rigorózní práce se zabývá především benzofenanthridinovými alkaloidy, které jsou obsaženy v několika rostlinných čeledích (*Papaveraceae*, *Fumariaceae*, *Meliaceae*, *Caprifoliaceae*, *Meliaceae*, *Ranunculaceae* a *Rutaceae*)^{2,3}. Biologická aktivity těchto alkaloidů zahrnuje především antimikrobiální, antifugální, antivirový nebo prozánětlivý účinek⁴.

Velmi významná je také schopnost některých benzofenanthridinových alkaloidů inhibovat cholinesterázy (acetylcholinesteráza (AChE), a butyrylcholinesteráza (BuChE)). Inhibice těchto enzymů se využívá v terapii Alzheimerovy choroby. Toto neurodegenerativní onemocnění v současné době zaujímá až 50-60% všech demencí a lidí s touto nemocí neustále přibývá. Jedním z důvodů je celosvětové stárnutí obyvatelstva, jelikož incidence a prevalence tohoto onemocnění se zvyšuje s věkem^{5,6}. Studium účinků benzofenanthridinových alkaloidů, které v současnosti probíhá, je velkým příslibem do budoucnosti v terapii tohoto, v současné době, nevyléčitelného onemocnění⁷.

Nejúčinnější léčiva v terapii lehkých až středně těžkých alzheimerovských demencí jsou v současné době inhibitory acetylcholinesteráz, z kterých jsou dnes využívány: donepezil, rivastigmin a galanthamin. Tyto látky toto onemocnění nevyléčí, ale mohou výrazně zpomalit průběh nemoci. K dalším významných léčivům, která se využívají k terapii tohoto

onemocnění, patří inhibitory N-metyl-D-aspartátových receptorů. Zde se řadí v praxi využívaný memantin⁶.

Benzofenanthridinové alkaloidy se vyskytují v několika rostlinných čeledích, jejich významným zdrojem je především čeleď *Papaveraceae*. Do této čeledi se řadí i *Chelidonium majus*, rostlina, kterou se zabývá tato práce. Obsahuje široké spektrum biologicky aktivních látek a odedávna byla využívána v tradičním lidovém léčitelství. V současné době byla u této rostliny studována antivirová, antitumorózní, antibakteriální, antimykotická nebo protizánětlivá aktivita⁸.

Předmětem této práce, která navazuje na diplomovou práci z roku 2010⁹, byla izolace dalších benzofenanthridinových alkaloidů z této rostliny a příprava na studie jejich biologické aktivity (inhibice cholinesteráz a antioxidační účinek).

2. CÍL PRÁCE

Cílem rigorózní práce bylo:

1. dopracování alkaloidního výtřepku z *Chelidonium majus* (benzofenanthridinové alkaloidy),
2. izolace minimálně jednoho alkaloidu v čisté formě,
3. strukturní analýza izolované látky a její identifikace
4. a aktivní podílení se na stanovení jejích biologických aktivit (inhibice cholinesteráz a antioxidační aktivita).

3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1. Alzheimerova choroba

Alzheimerova choroba je závažné neurodegenerativní onemocnění, které se klinicky projevuje syndromem demence a končí letálně. Její etiologie není dosud plně známa.

Tato nemoc patří mezi jednu z nejčtenějších primárních příčin smrti vůbec. Diagnostikujeme ji u 50-60 % všech demencí. Po 70. roku života se vyskytuje dvakrát častěji u žen než u mužů, v mladším věku je rozložení rovnoměrné. Lidí s touto nemocí bohužel neustále přibývá. Jedním s hlavních důvodů je celosvětové stárnutí obyvatelstva, jelikož incidence a prevalence tohoto onemocnění se zvyšuje s věkem^{5,6}.

3.1.1. Příznaky

Příznaky Alzheimerovy choroby se vyvíjejí plíživě. Rozlišení od příznaků doprovázejících klinicky normální stárnutí nemusí být zpočátku jednoduché. Preklinické stádium nemoci trvá pravděpodobně několik let. V raných stádiích nemoci bývá ovlivněna především krátkodobá paměť, prostorová orientace a dochází k obtížnému hledání slov. V pokročilé fázi onemocnění klesá schopnost pacientů komunikovat s okolím. Nemocní bývají apatičtí, přestávají poznávat přátele i příbuzné. Nakonec přijdou i o schopnost udržet oční kontakt s lidmi, kteří o ně pečují. Neudrží se v poloze vsedě, jsou němí a inkontinentní¹⁰.

Jednotlivá stádia nemoci můžeme dělit podle doby počátku vzniku na onemocnění s časným začátkem - presenilní (tj. do 65. roku věku) a na onemocnění s pozdním začátkem – senilní (tj. po 65. roku věku). Pro první typ je charakteristický rychlý nástup a progresse onemocnění u druhého je typický pozvolnější, postupný nástup a průběh. Jako jedno z diagnostických kritérií bývá také udávána převaha zhoršení paměti nad zhoršením intelektových schopností. Zatímco presenilní forma je poměrně vzácná, senilní formou demence trpí 2-5% populace ve věku 65 let (z toho minimálně polovina trpí Alzheimerovou chorobou)⁶.

3.1.2. Genetika Alzheimerovy choroby

Familiární agregace případů Alzheimerovy choroby je spjatá s vysokým relativním rizikem. Podmíněna je kombinací vlivů genetických s vlivy vnějšího prostředí. Jedná se o heterogenní onemocnění. Fenotypicky můžeme rozlišit jeho dvě základní podoby: raná forma a forma pozdní.

Pro pozdní formu Alzheimerovy nemoci je rizikovým faktorem nosičství alely ϵ_4 genu pro apolipoprotein E, locus na 12. chromozomu. Dále má pozdní forma souvislost s genem pro apolipoprotein E na 19. chromozomu a zřejmě i s mutacemi na mitochondriální DNA. Rizikem pro rané formy této nemoci jsou genové mutace na chromozomech 21, 14 a 1. Dalšími možnými rizikovými faktory jsou: poranění hlavy, nižší vzdělání a kouření cigaret¹⁰.

3.1.3. Charakteristické neurobiologické změny při Alzheimerově nemoci

Při Alzheimerově nemoci probíhají podobné změny jako při stárnutí. Klesá hmotnost a objem mozku, snižuje se tloušťka mozkové kůry, rozšiřují se mozkové komory. Změny jsou podstatně nápadnější u presenilních onemocnění. Mechanismus zániku neuronů v průběhu Alzheimerovy nemoci je nejasný. Mohou se na něm podílet odchylky činnosti genů skupiny Bcl-2 i jejich bílkovinných produktů spouštějících apoptózu i tvorbu neuronálních klubek i oxidativní stres^{10,11}.

Předpokládaná patogeneze familiárních podob Alzheimerovy nemoci:

- 1) patologické mutace genu pro APP (amyloidový prekurzorový protein), PS1 (gen pro presenilin 1 umístěný na 14q24), PS2 (gen pro presenilin 2 na 1q41) způsobí
- 2) odchýlnou proteolýzu APP, výsledkem je
- 3) vzrůst tvorby A-beta42 (amyloidový beta protein se 42 aminokyselinovými články),
- 4) A-beta42 se v mozku začne extracelulárně hromadit,
- 5) poté se začne ukládat v podobě difúzních plak ve vazbě s proteoglykany a dalšími látkami, které zvyšují tvorbu amyloidu,

6) v difúzních plakách s A-beta42 začne přibývat A-beta40, současně v plakách roste množství některých dalších proteinů, například komplementu C1q,

7) následuje „zánětlivá odpověď“, aktivuje se mikroglie, uvolňují cytokiny, aktivují se astrocyty,

8) předešlé dvě patogenetické sekvence způsobí pokračující poškození neuritů uvnitř a v okolí plak, výsledkem je

9) poškození neuronální metabolické homeostázy a oxidativní poškození,

10) součástí změny metabolické homeostázy neuronů je změna aktivity kináz a fosfatáz, výsledkem je vznik hyperfosforylovaného proteinu tau (asociovaného s mikrotubuly v neuronech), vznikají neuronální klubka (tangles),

11) následuje rozsáhlá dysfunkce a postupný zánik neuritů a neuronů v hipokampu a neokortexu, včetně poruchy činnosti nervových přenašečů, což vyústí

12) do syndromu demence¹².

3.1.3.1. Tvorba beta-amyloidu

Mikroskopické změny můžeme rozdělit na extracelulární a intracelulární. Extracelulární jsou spojeny především s ukládáním beta-amyloidu. Tato patologická bílkovina vzniká z transmembránově uloženého APP, který se za fyziologických podmínek štěpí alfa-sekretázou na krátké solubilní fragmenty 1–39 aminokyselin. Pouze malá část je štěpena následně enzymy beta- a gamma-sekretázami, které odštěpují delší fragmenty – 40–42 aminokyselin. Odštěpené fragmenty z APP (beta-peptidy) jsou solubilní a mají své fyziologické role, dosud nedostatečně objasněné, mj. při tvorbě nových dendritických trnů, a tudíž nových synapsí. V případě Alzheimerovy choroby však štěpí většinu APP beta- a gamma-sekretázy, vzniká nadbytek delších fragmentů, které nejprve oligomerují. Tyto oligomery jsou výrazně neurotoxické, toxičtější než vlastní beta-amyloid. Koagulují v mezibuněčných prostorech mozkové kůry, polymerují, a tím vzniká vlastní beta-amyloid. Drúzy beta-amyloidu se stávají centry neurodegenerativních útvarů nazývaných alzheimerovské (senilní) plaky. V místech plaků dochází k projevům zánětu, uvolňují se

reaktanty akutní fáze zánětu (interleukiny aj.), volné kyslíkové radikály, dochází k aktivaci zánětlivých enzymů cyklooxygenáz^{10,13}.

3.1.3.2. Degradace tau-proteinu

Intracelulární změny jsou spojeny s degenerací tau-proteinu. Ten je za normálních okolností vázán v mikrotubulech neuronů, ale patologicky je tau-protein hyperfosforylován, postižená neuronová vlákna polymerují a tvoří párově heliakální filamenta. U postižených neuronů dochází k apoptóze. Tento hyperfosforylovaný protein je podstatnou součástí neuronálních klubek typických pro Alzheimerovu chorobu^{10,13}.

3.1.3.3. Apolipoprotein E

Apolipoprotein E (ApoE) je protein tvořený 299 aminokyselinami. Je součástí několika plazmatických lipoproteinů. Gen pro ApoE je polymorfní, vyskytuje se ve třech alelách, které kódují vznik tří různých izoform, ApoE2, ApoE3, ApoE4. ApoE4 se vyskytuje u 16-17% lidí. V populaci lidí postižených Alzheimerovou chorobou se vyskytuje alela s vyšší frekvencí než v populaci kontrolní. Lidé, kteří jsou homozygoti v alelách ApoE4, jsou ohroženi podstatně vyšším rizikem vývoje pozdní formy Alzheimerovy nemoci než lidé, kteří jsou heterozygoti, nebo nositeli alely ApoE4 nejsou. Nosičství alely ApoE4 je významným rizikovým faktorem vzniku onemocnění^{14,15,16}.

3.1.3.4. Acetylcholinergní systém

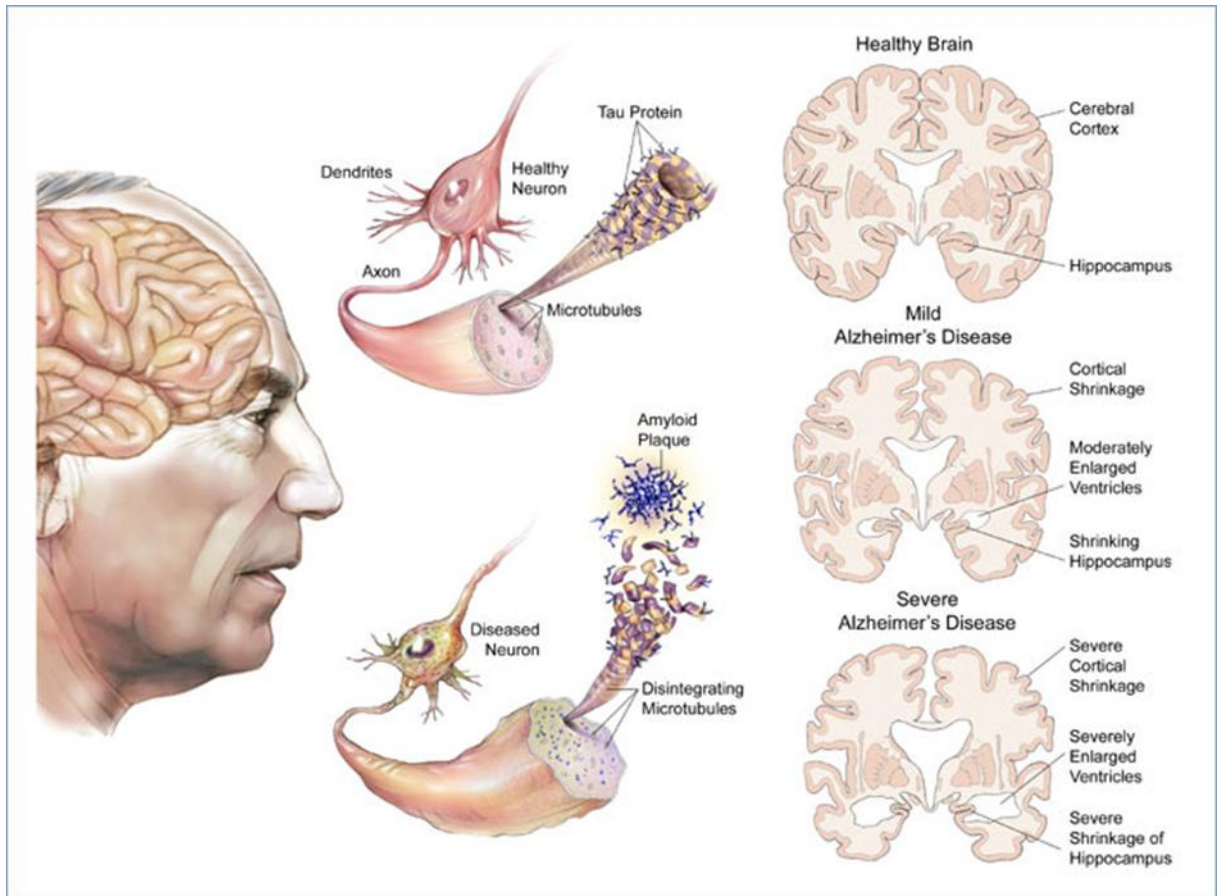
Nejvíce postiženým neurotransmitterovým systémem je systém acetylcholinergní, který je významný pro paměť a kvalitativní vědomí. AChE odbourává acetylcholin na cholin a kyselinu octovou. Dochází k nedostatku enzymu cholinacetyltransferázy. Ten syntetizuje acetylcholin z cholinu a z acetylkoenzymu A. Omezeno je také zpětné vychytávání cholinu ze synaptické štěrbiny.

Dalším mechanismem, který přispívá k acetylcholinergnímu deficitu, je zvýšená tvorba BuChE, která také odbourává acetylcholin. BuChE je tvořena v mobilizovaných gliových

elementech tvořících lem akumulací beta-amyloidu - plak. Tvorba BuChE a její podíl na odbourávání acetylcholinu roste s délkou a závažností demence. BuChE je kódována třetím chromozomem a vyznačuje se genetickým polymorfismem. Některé formy pak vykazují větší katalytickou aktivitu k odbourávání acetylcholinu než jiné^{13,17}.

3.1.3.4. Glutamátergní systém

U glutamátergního systému dochází k nadměrnému uvolnění glutamátu a dalších excitačních aminokyselin a v nejpostiženějších korových oblastech dochází ke sníženému zpětnému vychytávání glutamátu. Glutamát se tak nadměrně váže na ionotropní receptor NMDA (N-methyl-D-aspartátový receptor). Následně dochází k nadměrnému otevření kalciových kanálů, ke zvýšenému vstupu kalcia do neuronů, k aktivaci proteinkináz a fosfatáz a k následné kaskádě dějů, mezi něž patří zvýšení exprese některých nežádoucích genů, a v konečném důsledku k neuronální apoptóze^{10,13}.



Obr. 1: Charakteristické neurobiologické změny při Alzheimerově nemoci

(pharmaceutical-networking.com ©) ¹⁸

3.1.4. Diagnostika

K stanovení diagnózy Alzheimerovy choroby se používají různá klinická vyšetření i anamnestické údaje. Nejprve je nutné stanovit diagnózu samotné demence. Jako screeningový test se nejčastěji používá MMSE (Mini Mental State Exam), avšak tento test není vždy spolehlivý. Samotný MMSE je velmi orientační metodou neuropsychologické diagnostiky. Ovlivněn je řadou faktorů např. úrovní verbálního intelektu pacienta, vzděláním, pozorností a dalšími faktory, které se obvykle při rutinním vyšetření nezohledňují. MMSE se zaměřuje na kognitivní funkce, které jsou zprostředkovány ve velké míře řečovými funkcemi, zaměřuje se tedy zejména na funkce dominantní hemisféry a pomíjí jiné funkční oblasti mozkové kůry. Mezi další používané testy patří Test kreslení hodin (Clock drawing test), který je pro diagnózu Alzheimerovy choroby více vypovídající. Někteří pacienti mohou mít zcela normální či plný počet bodového ohodnocení MMSE a v Testu hodin výrazně selhávají. Vizuospaciální dysfunkce může být prvním kognitivním deficitem u počínající Alzheimerovy choroby. Dalším testem využívaným v této diagnostice je např. Rey-Osterriethova komplexní figura¹⁹.

Diagnosticky velmi důležitý je také průběh a klinický obraz demence (pomalá progresse, lineární progresse deteriorace, poruchy epizodické paměti a postupně i dalších složek paměti, časný úpadek osobnosti aj.)

Pro potvrzení diagnózy Alzheimerovy choroby jsou využívány tzv. markery.

Hlavními markery jsou:

a) zobrazovacími metodami (CT, MRI) zjištěná atrofie mediálních temporálních struktur (hippokampy, amygdaly) s rozšířením komorového systému, především temporálních rohů postranních komor,

b) v likvoru změněný poměr některých proteinů oproti kontrolním non-alzheimerovským osobám.

c) zvýšená hladina tau- a fosforylovaného tau proteinu, snížená hladina beta-peptidu1-42,

d) poruchy epizodické paměti jako iniciální poruchy poznávacích funkcí²⁰.

3.1.5. Terapie

Vzhledem k tomu, že není známa přesná příčina vzniku Alzheimerovy choroby, je v současné době možné léčit pouze její symptomy. Hlavní skupinou léčiv jsou inhibitory cholinesteráz a inhibitory NMDA receptorů. Dále se v terapii využívají také látky uvolňující prekuzory acetylcholinu jako je sójový lecithin a nootropika, což jsou látky zlepšující metabolismus mozku.

3.1.5.1. Látky ovlivňující acetylcholinergní systém

Centrální acetylcholinergní systém, významný pro mechanismy paměti i pro zachování správného kvalitativního vědomí, je postižen již v počínajících stadiích demence. U Alzheimerovy choroby je nejvíce postižen především mozkový acetylcholinergní systém v presynaptickém oddílu neuronu.

Látky, které ovlivňují acetylcholinergní systém, můžeme rozdělit na dvě základní skupiny: inhibitory acetylcholinesteráz a prekuzory acetylcholinu^{14,23}.

Inhibitory cholinesteráz

Tyto inhibitory zablokováním AChE, enzymu odbourávajícího acetylcholin v centrální nervové soustavě, zvýší množství acetylcholinu schopného vazby na receptory.

Některé inhibitory inhibují prakticky jen AChE, jiné odbourávají významně kromě AChE také BuChE.

Inhibitory AChE však mají ještě další mechanismus působení. AChE a BuChE jsou u Alzheimerovy choroby distribuovány v CNS i mimo oblast rozšíření acetylcholinergních neuronů. Podílejí se na formaci a toxicitě patologického proteinu beta-amyloidu. Podání inhibitorů tak ovlivní i tyto molekuly cholinesteráz, které nejsou přímo na acetylcholinergní vlákna, a tak má význam i v ovlivnění základních patogenetických mechanismů demence.

Tyto látky musí mít několik základních vlastností: musí především dobře procházet hematoencefalickou bariérou, specificky inhibovat mozkové formy AChE, a musí být dobře tolerovány.

Existují tři typy inhibice acetylcholinesteráz: reverzibilní, ireverzibilní a pseudoireverzibilní:

Reverzibilní inhibitory nebo jejich aktivní metabolity po dobu své přítomnosti v plazmě a v likvoru zablokují molekuly cholinesteráz. Restaurují se tehdy, když jsou inhibitory a jeho aktivní metabolity odbourány v játrech.

Během ireverzibilní inhibice vzniká komplex inhibitor - cholinesteráza. Tento komplex je nevratný a je následně eliminován.

Pseudoireverzibilní inhibicí dojde v molekule cholinesterázy ke kompetitivnímu vytěsnění acetylcholinu inhibitorem, který je pak sám odbouráván cholinesterázami. Jeho působení je pak delší, než je přítomnost farmaka či jeho aktivního metabolitu v likvoru a plazmě^{11,14,21}.

Inhibitory AChE představují chemicky nejednotnou skupinu, jednotlivé preparáty se také liší v typu inhibice a v tom, zda podstatně odbourávají či neodbourávají molekuly BuChE.

V České republice jsou v terapii Alzheimerovy choroby používány 3 inhibitory AChE: rivastigmin (Exelon®), donepezil (Aricept®) a galanthamin (Reminyl®). V minulosti se v terapii využíval také dnes již nepoužívaný hepatotoxický takrin (Cognex®). Velmi perspektivní molekulou je huperzin A, který v současnosti prochází klinickými testy²¹.

Rivastigmin

Rivastigmin je centrálním inhibitorem cholinesteráz (AChE i BuChE). Strukturně se řadí mezi karbamáty. Vznikl prodlužováním postranního řetězce fysostigminu, který má velmi krátký biologický poločas a časté vedlejší nežádoucí účinky.

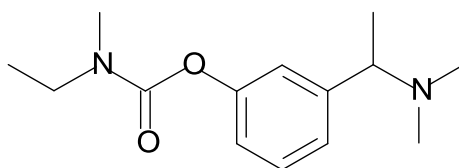
Je pseudoireverzibilním inhibitorem cholinesteráz v hippocampu a neocortexu, což jsou oblasti mozku nejvíce postižené při Alzheimerově chorobě. Inhibuje obě formy AChE přítomných v mozku – G4 (tetramer, který u zdravého člověka převažuje, ale u Alzheimerovy choroby je minoritní) a G1 (monomer, který je minoritní v mozku zdravého člověka, ale

v mozku člověka s Alzheimerovou chorobou jeho podíl významně roste). Inhibice formy G1 spojené s alzheimerovskou patologií je ještě výraznější než inhibice G4 formy.

Perorálně se podává dvakrát denně. Dávka se titruje tak, že první měsíc se podává dvakrát denně 1,5 mg, druhý měsíc dvakrát denně 3,0 mg, třetí měsíc dvakrát 4,5 mg a dále dvakrát 6,0 mg/den.

Rivastigmin je také možné podávat ve formě náplastí. Náplasti se aplikují jedenkrát za 24 hodin. Náplast'ová forma rivastigminu oproti perorální formě podstatně omezuje kolísání koncentrace látky v plazmě a snižuje výskyt nežádoucích gastrointestinálních účinků¹².

Primární cílovou skupinou jsou pacienti s lehkou až středně těžkou formou Alzheimerovy choroby a s demencí s Lewyho tělísky^{13,17,21}.



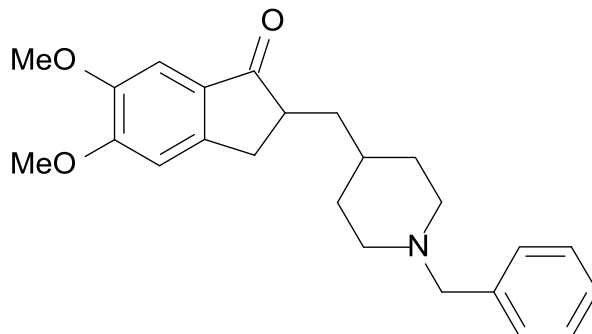
Obr. 2: Rivastigmin

Donepezil

Donepezil se strukturně řadí mezi piperidinové deriváty. AChE blokuje reverzibilně a nekompetitivně. Účinek na BuChE je v poměru k AChE velmi slabý (v poměrech inhibičních koncentrací IC₅₀ jsou tyto hodnoty 405:1). Preferenčně a značně selektivně ovlivňuje obě formy mozkové AChE – tetramer i monomer.

Kontrolované klinické studie prokázaly jeho účinnost u pacientů trpících Alzheimerovou chorobou, demencí s Lewyho tělísky a u vaskulárních demenci. Donepezil je určen pro léčbu Alzheimerovy choroby lehkého až středního stupně.

Má minimum nežádoucích účinků a dlouhý poločas, díky němuž se podává jedenkrát denně v dávce 5 – 10 mg^{13,21,22}.



Obr. 3: Donepezil

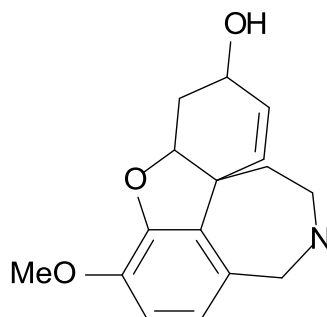
Galantamin

Galantamin je přírodní alkaloid, který byl poprvé izolován z cibulí sněženky *Galanthus woronowi*. Později byl získán také z některých dalších rostlin čeledi *Amarillidaceae*. V medicíně se využívá již od 60. let 20. století k antagonizaci neuromuskulární blokady a pro terapii neurologických poruch. V současné době se ale používá především k terapii Alzheimerovy choroby lehkého až středního stupně²³.

Galantamin je selektivní inhibitor AChE vzhledem k BuChE. Na acetylcholinergní systém působí dvěma způsoby: kromě toho, že reverzibilně inhibuje AChE, moduluje také alostericky pre- i postsynaptické nikotinové receptory. Touto modulací se zlepšuje jednak výdej acetylcholinu z presynaptických zakončení a jednak se do určité míry brání desenzitizaci postsynaptických muskarinových receptorů. Působí tedy jako reverzibilní selektivní kompetitivní inhibitor AChE a alosterický modulátor nikotinových acetylcholinových receptorů, čímž potencuje cholinergní nikotinovou neurotransmisi.

Při podávání je nutno dávku galantaminu pacientům titrovat. Začíná se denní dávkou 2×4 mg, po čtyřech týdnech se přechází na 2×8 mg, po dalších čtyřech týdnech na 2×12 mg a na této dávce se obvykle zůstává. Je však možno jít až na 2×16 mg, ale tato dávka obvykle nemá žádné výhody. Jeho hlavní nežádoucí účinky souvisí s jeho cholinergními

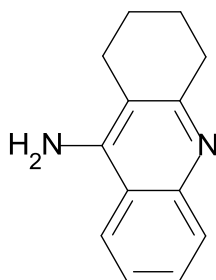
vlastnostmi. Patří k nim především nauzea, zvracení, závrať, bolest břicha, průjem, neklid a nespavost^{14,21}.



Obr. 4: Galantamin

Takrin

Takrin byl prvním inhibítor cholinesteráz klinicky využívaným k terapii Alzheimerovy choroby. Používal se v první polovině 90. let minulého století. Ale až u jedné třetiny pacientů způsoboval závažné hepatopatie, proto se od jeho podávání ustoupilo²⁴.



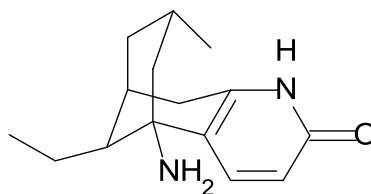
Obr. 5: Takrin

Huperzin A

V současné době je perspektivní molekulou huperzin A. Tento alkaloid byl poprvé izolován v roce 1986 z plavuně *Huperzia serrata* (*Lycopodiaceae*). V malých koncentracích je obsažen i ve vrančí jedlově (*Huperzia selago*), který se vzácně vyskytuje i na našem území. Tento alkaloid je silným reverzibilním inhibítor AChE, jež se v současné době

využívá při léčbě Alzheimerovy choroby v Číně. Jeho výhodou je delší biologické působení než donepezil či rivastigmin. V některých studiích se dokonce ukazuje být i účinnější než zmíněná léčiva. Oproti galantaminu a ostatním používaným léčivům rychleji prostupuje přes hematoencefalickou bariéru a má lepší biologickou dostupnost při orálním podání. Jeho periferní cholinergní účinky jsou naopak nižší. Zajímavá je i velmi nízká terapeutická dávka (v řádech setin miligramu na den).

V současné době je klinicky testován. V USA byla úspěšně dokončena 2. fáze klinického zkoušení a v Číně probíhá již 4. fáze, což znamená vstup do běžné klinické praxe a shromažďování dat o vedlejších účincích a účincích při dlouhodobém podávání²⁴.



Obr. 6: Huperzin

Substituce prekurzory acetylcholinu

Jelikož substituce acetylcholinem není možná (acetylcholin má velmi krátký poločas) a cholin se neosvědčil pro své depresogenní účinky, jsou stále v této skupině nejvyužívanější lecitiny (deriváty glycerolu se substituovaným fosfatidylcholinem a mastnými kyselinami). Lecitin v těle postupně uvolňuje cholin pro syntézu acetylcholinu. Analýzy klinických studií s lecitem u Alzheimerovy choroby ale ukazují pouze nevýznamné nebo málo významné zlepšení klinického stavu. Lepší výsledky jsou u terapie kombinované s inhibitory acetylcholinesteráz^{10,17}.

Použití agonistů muskarinových a nikotinových acetylcholinergních agonistů

Stimulace muskarinových receptorů M1 se ukázala jako účinný postup ke zlepšení kognitivních funkcí. Klinicky zkoušen je v současné době xanomelin a milamelin¹⁰.

Další způsoby ovlivnění acetylcholinergního systému

Indeloxazin – zvyšuje uvolnění acetylcholinu z presynaptického zakončení.

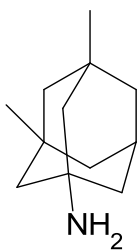
Acetyl-L-karnitin – zlepšuje příjem prekurzorů acetylcholinu do neuronu¹⁰.

3.1.5.2. Inhibitory NMDA receptorů

Pro správnou činnost mozku je také nezbytná činnost glutamatergního systému. Ten bývá v těžších stádiích Alzheimerovy choroby narušen. Dochází k nadměrnému uvolňování glutamátu a dalších excitačních kyselin. Na úrovni receptorů pak dochází k tvorbě přenosových šumů.

V této skupině se zatím používá pouze memantin. Ten účinkuje jako antagonist NMDA receptorů a brání neurotoxicitě glutamátu. V klinických zkouškách byl memantin účinným v léčbě Alzheimerovy a vaskulární demence a zpomaloval jejich progresi. Upravoval kognitivní funkce, vigilitu, denní aktivity nemocných a zvýšením jejich autonomie snižoval spotřebu pomoci pečovateli. Memantin je velmi dobře snášen. Z nežádoucích účinků se nejčastěji vyskytly insomnie, závratě, cefalgie a u méně než 5%lčených halucinace.

Je určen pro léčbu střední až těžké, ale nikoli nejtěžší demence. Podává se perorálně v denní dávce 20 mg (jednorázově nebo rozděleně do dvou denních dávek), titruje se tak, že se podává první týden 5 mg a každý další týden se 5 mg přidává^{13,20,21}.



Obr. 7: Memantin

3.1.5.3. Nootropika

U Alzheimerovy choroby dochází k snížení oxidativního metabolismu glukózy a buněčné proteosyntézy. Nootropika zvyšují odolnost nervové tkáně vůči hypoxii, zlepšují metabolismus glukózy a neuronální proteosyntézu. Jsou velmi dobře tolerována a mají minimum vedlejších účinků.

Mezi využívaná nootropika se řadí:

Piracetam – nejpoužívanější nootropikum. Používá se nejčastěji v kombinované terapii.

Pyritinol – má také slabý protizánětlivý efekt a efekt na vychytávání volných kyslíkových radikálů.

Naftidrofuryl – působí také relaxačně na hladkou svalovinu cév.

Etyl apovinkamin

Dihydroergotoxin – nepřímo zlepšuje centrální dopaminergní přenos.

Nicergolin – působí proti hypoxii a snižuje agregaci krevních destiček.

Extractum Ginkgo biloba – rostlinné nootropikum. Likviduje volné kyslíkové radikály, má neuroprotektivní účinek^{10,24}.

3.1.5.4 Nekognitivní terapie

Nekognitivní terapie se používá k léčbě přidružených symptomů Alzheimerovy choroby (neklidu, poruch spánku, depresivních nebo úzkostných stavů).

K léčbě poruch chování i přidružených delirií jsou užívány látky ze skupiny antipsychotik (neuroleptik). Pokud převládají psychotické příznaky (bludy, halucinace), jsou používána antipsychotika 2. generace, jako je risperidon, quetiapin a další. V případě, že převládají přidružená deliria, stavy neklidu nebo poruchy spánku, jsou používána antipsychotika s malým antipsychotickým efektem, která však dobře působí na uvedené příznaky a mají malý výskyt nežádoucích efektů (melperon, tiaprid).

Z antidepresiv nejsou používána antidepresiva 1. a 2. generace (mají anticholinergní efekty a ovlivňují i jiné neuromediatorové systémy, než je systém serotonergní a noradrenergí). Používají se především antidepresiva 3. generace - selektivní inhibitory

zpětného vychytávání serotoninu (citalopram, S-citalopram, sertralin, fluvoxamin, fluoxetin, paroxetin), a dále antidepresiva 4. generace, ovlivňující zpětné vychytávání serotoninu i noradrenalinu (venlafaxin, milnacipran) i další antidepresiva 4. generace (mirtazapin, reboxetin aj.). Vhodný je také tianeptin, zvyšující zpětné vychytávání serotoninu. Používá se také reverzibilní inhibitor monoaminoxidázy A moklobemid²⁰.

3.1.5.5. Nebiologické terapeutické přístupy

Nezbytnou součástí léčby Alzheimerovy choroby bývají psychoterapie a socioterapie. Aktivita má být zaměřena na uchování běžných denních aktivit a návyků. Důležité je snažit se procvičovat s postiženými ty funkce, které zůstaly ještě zachovány, nikoli se snažit učit je funkce, které již zapomněli (reedukační terapie) důležitá spolupráce s rodinnými příslušníky pacientů. Nutná je edukace pečovatелů a jejich konzultace s odborníky. V České republice toto provádí především Česká alzheimerovská společnost.^{10,20}

3.2. Benzofenanthridinové alkaloidy

Alkaloidy jsou nízkomolekulární sekundární rostlinné metabolity, které je možné je rozdělit do tří základních skupin:

- 1) pseudoalkaloidy (nejsou tvořeny aminokyselinami, pouze dusíkatý atom heterocyklu je tvořen aminokyselinou)
- 2) protoalkaloidy (jednoduché aminy, jejichž dusík není součástí heterocyklického kruhu)
- 3) alkaloidy

Jejich biosyntéza vychází z aminokyselin, popř. mohou také vznikat z meziproductů biosyntézy terpenoidů, steroidů, některých kyselin nebo purinů, účinkem aminů a amoniaku. V určité rostlině bývá většinou obsažena směs více alkaloidů. Množství a typ alkaloidů bývá v různých částech jednotlivých rostlin závislé na tom, z které části rostliny se získávají, zda ze semen, listů, kůry či z jiné části, a na vegetačním období²⁶.

Benzofenanthridinové alkaloidy jsou biogeneticky odvozené od aminokyseliny fenylyalaninu a řadí se do skupiny isochinolinových alkaloidů. Vyskytují se v celé řadě čeledí např. *Papaveraceae* (mákovité), *Fumariaceae* (zemědýmovitě), *Rutaceae* (routovité)²⁷, *Meliaceae* (zederchovitě), *Caprifoliaceae* (zimolezovitě) a *Ranunculaceae* (pryskyřníkovité)^{2,3}. Mezi nejbohatší zdroje těchto alkaloidů patří *Chelidonium majus* L. (vlaštovičnick větš), *Sanguinaria canadensis* L. (krevnice kanadská), *Escholtzia californica* (sluncovka kalifornská), *Dicranostigma lactuoides*, nebo *Macleaya cordata*²⁷.

Na základním skeletu kvartérních benzofenanthridinových alkaloidů se mohou vyskytovat různé kombinace methoxylové, methyldiooxidové nebo hydroxylové skupiny²⁵.

Jejich trojrozměrná kvartérní struktura byla zkoumána pomocí metod kvantové chemie. Výsledky těchto studií pomohly objasnit rozdíly v jejich biologických efektech (např. schopnost interkalace do DNA). Bylo dokázáno, že molekuly kvartérních benzofenanthridinových alkaloidů nejsou zcela planární, což je způsobeno vzájemnými interakcemi jednotlivých substituentů molekuly. Jde například o interakci mezi vodíkem na CH₃- skupině dusíku a vodíkem na uhlíku C₄. Substituenty v polohách 2, 3, 7, a 8 molekuly alkaloidu obvykle leží ve stejné rovině s aromatickým kruhem. Výjimka se týká situace, kdy je na uhlíku C₇ umístěna methoxyskupina. Ta je orientována prakticky kolmo k rovině aromatického kruhu a tento stav je vysvětlován interakcí této skupiny s vodíkem na C₆ a substituentem na uhlíku C₈. Z toho lze usuzovat, že alkaloidy obsahující methoxyskupinu na C₇ mají sníženou schopnost interkalace do DNA (např. chelerythrin)^{29,30,31}.

3.2.2. Biologické účinky benzofenanthridinových alkaloidů

Využití rostlin obsahujících benzofenanthridinové alkaloidy mělo v tradiční lidové medicíně své postavení již od pradávna. Například extrakt z *Chelidonium majus* se používal již ve starověku k léčbě bradavic, hemoroidů nebo artritidy a američtí indiáni používali extrakt obsahující sanguinarin a chelerythrin jako expektorans. Tato bylina je v kombinaci s dalšími předepisována ve formě tinktury nebo vodného extraktu jako gastrointestinální spasmolytikum. Zevní aplikace na kůži ve formě pasty nebo mazání pomáhá zmírnit obtíže po kousnutí hmyzem. Extrakt z *Chelidonium majus* je dále součástí volně prodejných cholagog a choleretik^{2,3}.

V současné době jsou mnohé benzofenanthridinové alkaloidy zkoumány pro svou nesčetnou biologickou aktivitu. Jedná se především o účinky antimikrobiální, antimykotické, protizánětlivé, antivirové nebo jejich schopnost inhibovat cholinesterázy.

Biologická aktivita benzofenanthridinových alkaloidů je shrnuta v mé předchozí diplomové práci⁹.

3.2.3. Rostliny s významným obsahem benzofenanthridinových alkaloidů

Nejhojnější zastoupení mají benzofenanthridinové alkaloidy v čeledích *Papaveraceae* (mákovité) a *Rutaceae* (routovité). V dalších čeledích se tyto alkaloidy vyskytují spíše minoritně, jedná se o čeledi: *Meliaceae* (zederchovité), *Fumariaceae* (zemědýmovité), *Caprifoliaceae* (zimolezovité) a *Ranunculaceae* (pryskyřníkovité). Obecně platí, že obsah benzofenanthridinových alkaloidů v kořenech je až o několik řádů vyšší než v nadzemních částech rostlin^{2,3,32}.

3.2.3.1. *Chelidonium majus*

Velmi bohatým zdrojem benzofenanthridinových alkaloidů je rostlina z čeledi *Papaveraceae* *Chelidonium majus*. Ta byla již v dávných dobách využívána v lidovém léčitelství a svůj význam mezi léčivými rostlinami si zachovala dodnes.

Říše:	<i>Plantae</i> (rostliny)
Oddělení:	<i>Magnoliophyta</i> (krytosemenné rostliny)
Třída:	<i>Rosopsida</i> (vyšší dvouděložné rostliny)
Řád:	<i>Papaverales</i> (Mákovaré)
Čeleď:	<i>Papaveraceae</i> (Mákovité)
Rod:	<i>Chelidonium</i> (Vlaštovičník)

Vlaštovičník větší je vytrvalá bylina, která dorůstá výšky až 1 m. Lodyha je dutá, větvená a roztroušeně chlupatá. Dolní listy jsou dlouze, horní krátce řapíkaté stejného tvaru. Čepel je jednoduše až přetrhovaně lichozpeřená. Rub je sivě zelený, líc sytě zelený. Květenství tvoří 2-6kvěťový okolík, květy mají v průměru 1-2 cm. Kalich je žlutý, prchavý, kališní lístky 2 volné. Korunní lístky jsou 4 celokrajné se žlutými tyčinkami a kyjovitě ztlustlými nitkami. Blizna je

dvoulaločná a čnělka velmi krátká. Plodem jsou tobolky připomínající šešuli otevírající se odspodu dvěma chlopněmi. Semena jsou černá až 1,5 mm dlouhá.

Výskyt

Chelidonium majus je rozšířený v jižní a střední Evropě, jižní Skandinávii, mírném až subarktickém pásmu Asie včetně Japonska a střední Číny. Zavlečen byl i do Severní Ameriky. Nejčastěji ho nalezneme na zahradách, rumišťích, okrajích cest nebo v humózních hájích^{33,34}.

Využití

Extrakt z *Chelidonium majus* se využíval již ve starověku, kde našel uplatnění v léčbě artritidy, hemeroidů nebo bradavic². V minulosti byla droga doporučována při vodnatelnosti jako diuretický prostředek, na regulaci menstruace, při syfilidě, malárii, při kožní tuberkulóze, břišním tyfu, rakovině kůže, psoriáze nebo dně³⁵.

V lidovém léčitelství se šťáva v současné době se používá k odstraňování bradavic. Herba *Chelidonii* bývá součástí cholagog, přípravků používaných při cholecystopatiích, spasmolytik, využívá se na doléčení posthepatických stavů, při dyspepsii a žlučových kamenech. Její používání ale bývá stále více spojováno s poškozením jater.

Biologické účinky *Chelidonium majus* jsou široké. Zahrnují antivirovou, antitumorózní, antibakteriální, antimykotická nebo například protizánětlivá aktivita^{6,8}.

Obsahové látky

Chelidonium majus obsahuje především široké spektrum alkaloidů (benzofenanthridinové, protopinové, protoberberinové, aporfínové), dále také flavonoidy, silice a biogenní aminy jako cholin, methylamin, tyramin a histamin.

Nejvyšší obsah alkaloidů je v kořeni této rostliny. Ten jich může obsahovat až 2,5%. Množství alkaloidů se mění i v závislosti na vegetačním období. Zastoupeny jsou především alkaloidy isochinolinového typu^{4,36}.

Doposud izolované benzofenanthridinové alkaloidy:

Kořen: 8-hydroxydihydrosanguinarine, 8-hydroxydihydrochelerythrine, dihydrochelerythrine, dihydrosanguinarine³⁸, chelirubine³⁹, homochelidonin, chelamin, chelamidin, hydroxychelidonin, oxysanguinarin, dihydrochelirubin, dihydrochelilutin, makarpin⁴⁰.

Kořen i nať: sanguinarin, chelidonin, chelerythrin^{37,39,41}.

Část rostliny nebyla specifikována: chelilutine²⁷.

Vzorci těchto alkaloidů a jejich studovanou biologickou aktivitu je možné nalézt v mé předchozí diplomové práci⁹.



Obr. 11: *Chelidonium majus* (Sharkan ©)⁴²

3.2.3.1. *Zanthoxylum*

Dalším zajímavým zdrojem benzofenanthridinových alkaloidů je rod *Zanthoxylum*.

Říše:	<i>Plantae</i> (rostliny)
Oddělení:	<i>Magnoliophyta</i> (krytosemenné rostliny)
Třída:	<i>Rosopsida</i> (vyšší dvouděložné rostliny)
Řád:	<i>Sapindales</i> (mýdelníkotvaré)
Čeleď:	<i>Rutaceae</i> (routovité)
Rod:	<i>Zanthoxylum</i> (žlutodřev)



Obr. 10: *Zanthoxylum nitidum* (efloras.org ©)⁴³

Jedná se o poloopadavé či stálezelené stromky nebo keře, někdy liány. Často bývají trnité. Kmínky jsou obvykle s nápadnými dřevnatými nebo korkovými výrůstky, listy střídavé, lichozpeřené či pouze s 1–3 lístky, aromatické. Lístky bývají střídavé nebo vstřícné, obvykle pilovité nebo zubaté, někdy celokrajné. Květy jsou jednopohlavné, malé, v terminálních nebo úžlabních latách či chocholíkatých vrcholcích (4–8četné, tyčinek 4–8, samčí květy mají 3–10 tyčinek, čnělky zakrnělé, 2–4laločné), samičí květy mají šupinovité

nebo chybějící patyčinky (gyneceum se 2–5 karpely, každý se 2 vajíčky). Souplodí se skládá z jednosemenných plůdků, semena jsou téměř kulovitá, černá a lesklá⁴⁴.

Výskyt

Rod *Zanthoxylum* zahrnuje asi 250 druhů stromů a keřů převážně v subtropickém a tropickém pásmu obou polokoulí.

Využití v tradiční medicíně

V Číně a v Indii se využívají léčebné účinky *Zanthoxylum piperitum*. Mírní trávicí i střevní obtíže, čistí pokožku, ulehčuje vylučování toxických látek z těla ven. Má protizánětlivé, antibakteriální a antivirotické účinky. V Koreji se jím léčí tuberkulóza a vypuzují se jím střevní paraziti. Využívá se i na uklidnění a zmírnění nervozity.

Zanthoxylum rhetsa se využívá v ajurvédské medicíně při léčbě zánětu dásní. Snižuje bolest a projevy zánětu.

Extrakt ze *Zanthoxylum nitidum* se využívá jako součást zubních past. Zklidňuje bolavá a citlivá místa, snižují krvácivost a záněty dásní. V Indii se tradičně využívá k různým léčebným účelům. Kořen se používá při bolestech zubů, bolesti břicha, horečce, revmatismu, vředech i jako insekticid a pesticid. Ovoce se používá při léčbě bolesti břicha, kašli, kolice zvracení a průjmu. Semena a kůra jsou užívány při horečkách, průjem a choleře⁴⁵.

Obsahové látky

Alkaloidy (benzophenanthridinové, aporfinové, 1-benzyltetrahydroisochinolinové, furochinolinové, fenyletylaminy), amidy, lignany, kumariny, flavonoidy a triterpeny.

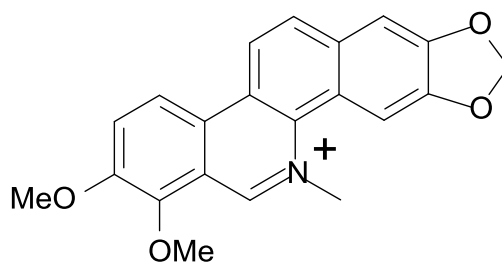
Zanthoxylum nitidum

Jedná se o šplhavý či vzpřímený keř, jehož výhony jsou lysé nebo plstnaté a roztroušeně ostnitě. Listy jsou zpeřené naspodu lysé nebo drobně srstnaté.

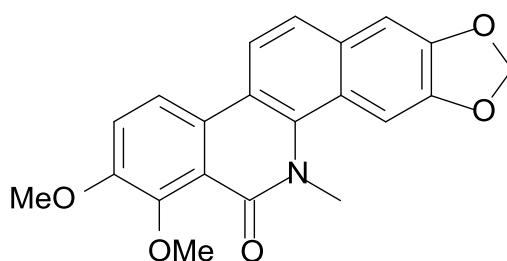
Zanthoxylum nitidum je druh rozšířený především v Asii (Čína, Taiwan, Indie, Indonésie, Japonsko, Malajsie, Myanmar, Nepál, Filipíny, Thajsko, Vietnam), dále také v Austrálii a na Nové Guinei⁴⁴.

Doposud izolované benzofenantridinové alkaloidy:

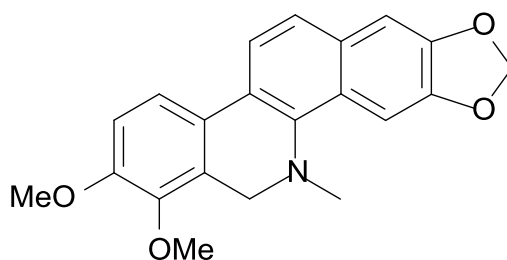
chelerythrin – izolován z kůry⁴⁶



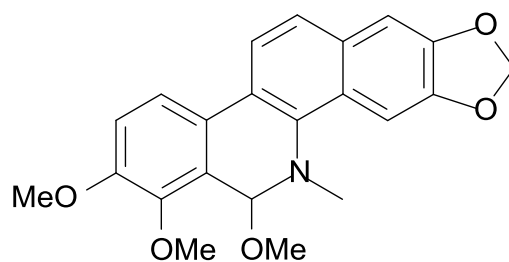
oxychelerythrin - izolován z kůry⁴⁷



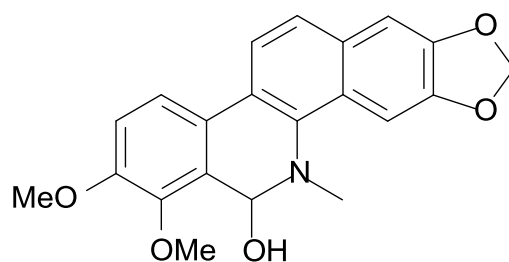
dihydrochelerythrin – izolován kůry a kořene^{47, 48}



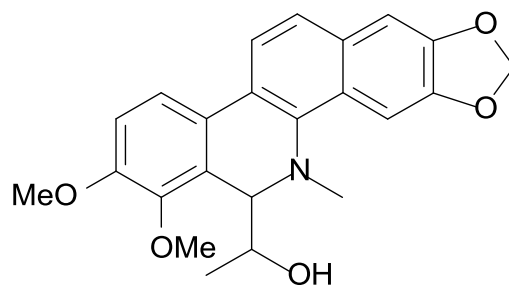
8-methoxychelerythrin – izolován z kořene⁴⁸



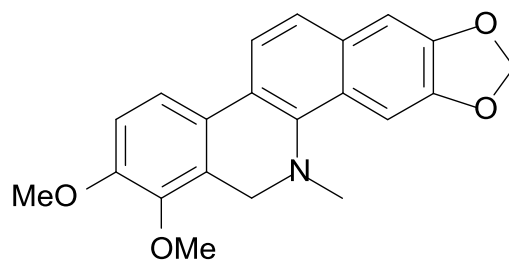
8-hydroxydihydrochelerythrin - izolován z kořene⁴⁸



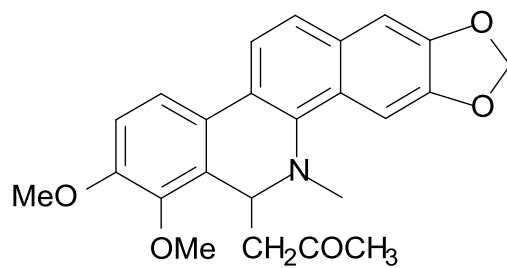
(R)-8-[(R)-1-hydroxyethyl]dihydrochelerythrin - izolován z kořene⁴⁸



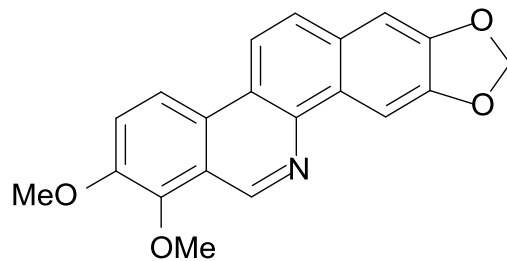
8-methoxynorchelerythrin – izolován z kořene⁴⁸



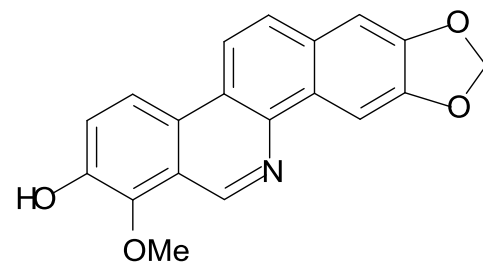
6-acetonyldihydrochelerythrin – izolován z kůry⁴⁷



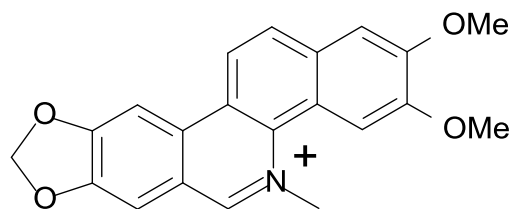
6-norchelerythrin - izolován z kůry⁴⁷



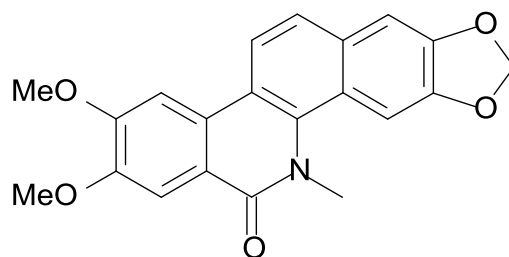
decarin - izolován z kůry⁴⁷



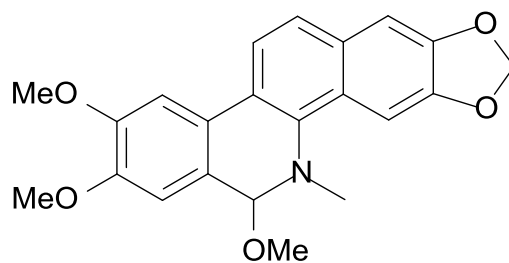
nitidin – izolován z kůry i z kořene^{46,47}



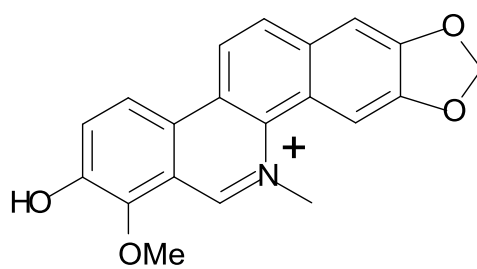
oxynitidin - izolován z kůry nadzemní části rostliny i z kořene^{46,47}



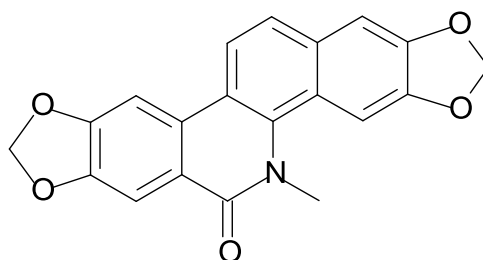
5,6-dihydro-6-methoxynitidin – izolován z kořene⁴⁹



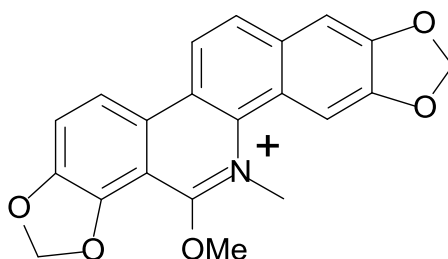
isofagaridin - izolován z kůry⁴⁶



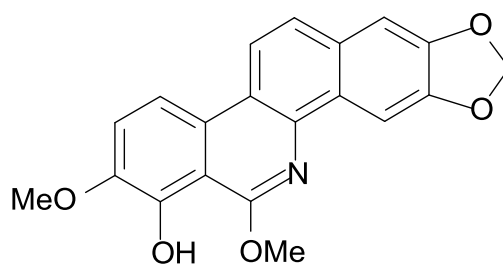
oxyvicine – izolován z kůry i kořene^{47,48}



8-methoxysanguinarine – izolován z oddenku⁵⁰



8-methoxyisodecarine - izolován z oddenku⁵⁰

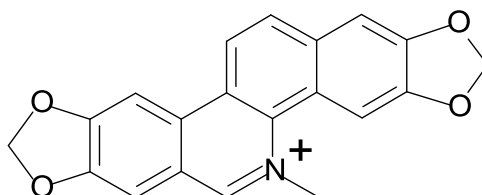


Zanthoxylum bungeanum

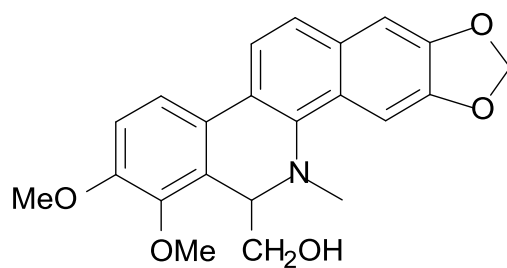
Tyto opadavé stromy jsou 3–7 m vysoké. Jejich kmínky a větve bývají ostnitě. Listy mají 5–13 lístků, lístky jsou vstřícné, přisedlé a jejich čepel je vejčitá, eliptická nebo výjimečně kopinatá. *Zanthoxylum bungeanum* se vyskytuje v Číně a Bhútánu⁴⁴.

Doposud izolované benzofenanthridinové alkaloidy:

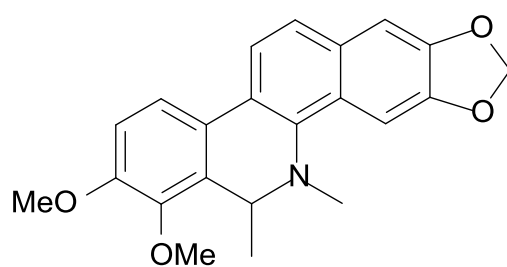
avicin – izolován z kůry kořene⁴⁶



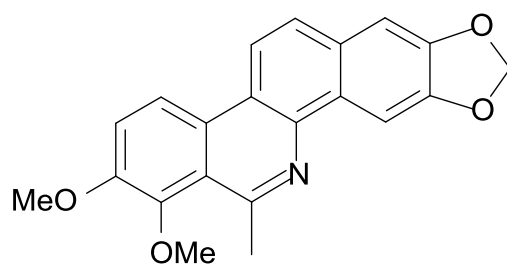
bocconolin – izolován z kůry kořene⁴⁶



6-methyldihydrochelerythrin - izolován z kůry kořene⁴⁶



6-methylnorchelerythrin - izolován z kůry kořene⁴⁶



Z kůry kořene:

6-acetyldihydrochelerythrin, chelerythrin, decarin, dihydrochelerythrin,
norchelerythrin, oxychelerythrin⁴⁶.

Z dřeva kořene:

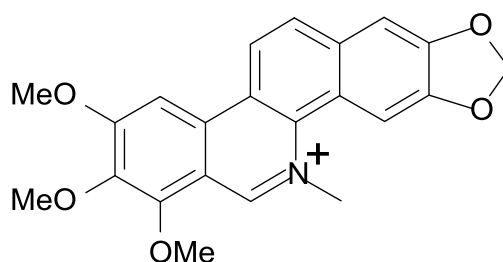
norchelerythrin, dihydrochelerythrin, bocconolin⁴⁶.

Zanthoxylum chalybeum

Jedná se o stálezelené keře nebo stromy 1.5–10 m vysoké, jejichž kmen rýhovaný, s korkovitými bulkami nebo brázdami s trny. Větve mají jednoduché, černé nebo červenavé, zahnuté až 2 cm dlouhé trny. Listy jsou podlouhlé až eliptické nebo kopinaté. *Zanthoxylum chalybeum* se vyskytuje především v Africe (Somálsko, Etiopie a jižně až Zimbabwe)⁴⁴.

Doposud izolované benzofenantridinové alkaloidy:

9-methoxychelerythrin – izolován i z kůry kořene^{46,51}



Z kůry kořene: chelerythrin, dihydrochelerythrin, nitidin^{46,51}.

Zanthoxylum fraxineum

Zanthoxylum fraxineum je keř nebo strom rozšířený na východě USA⁴⁴.

Z jeho kůry byly izolovány dva benzofenantridinové alkaloidy: chelerythrin, nitidin⁴⁷.

Biologická aktivita benzofenantridinových alkaloidů izolovaných z rodu *Zanthoxylum*

Benzofenantridinové alkaloidy *Zanthoxylum nitidum* byly studovány pro jejich možné protizánětlivé a analgetické účinky. Jako srovnávací látka byl zvolen hydrokortizon. Výsledkem této studie bylo zjištění, že nitidin, dihydrochelerythrin, oxyavicin, 8-methoxychelerythrin, a 8-hydroxydihydrochelerythrin vykazují srovnatelné analgetické a protizánětlivé účinky jako hydrokortizon⁴⁸.

5,6-dihydro-6-methoxynitidin izolovaný ze *Zanthoxylum nitidum* byl podroben studii antivirové aktivity. Testování *in vitro* ukázalo jeho významné antivirotické účinky proti viru hepatitidy B⁴⁹.

Antimikrobiální a antimykotická aktivita byla testována u nigerijské rostliny *Zanthoxylum xanthoxyloides*. Byly sledovány kmeny bakterií *Streptococcus mutans* a *Staphylococcus aureus* a kvasinek *Candida albicans*, *Candida tropicalis* a *Candida krusei*. Methanolový extrakt *Zanthoxylum xanthoxyloides* byl aktivní vůči všem těmto testovaným kmenům. Jeho schopnost inhibovat růst bakterií a plísní v této studii je známkou toho, že rostlina může být zdrojem mnohých antimikrobiálních látek⁵².

U ethanolického extraktu z kůry kmene *Zanthoxylum armatum* byla studována jeho antioxidační a protizánětlivá aktivita. Studie protizánětlivého účinku byla hodnocená *in vivo* na krysách. Antioxidační aktivita byla testována *in vitro*. Rostlinný extrakt prokázal významné protizánětlivé i antioxidační aktivity⁵³.

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1. Všeobecné postupy

4.1.1. Destilace a odpařování

Rozpouštědla byla před použitím destilována, nejprve byl zachycen předek (asi 5%; většinou s vodným azeotropem), poté bylo vydestilováno zbylých cca 90 % rozpouštědla. Rozpouštědla byla uchovávána v hnědých nádobách.

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

4.1.2. Chromatografie

Tenkovrstvá chromatografie

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

Sloupcová chromatografie

Sloupcová chromatografie byla prováděna systémem gradientové eluce na silikagelu L, 0,1 - 0,2 mm, deaktivovaném 10 % vody. Suspenze adsorbentu v rozpouštědle byla nalita do chromatografické kolony. Vzorek rozpuštěný v malém množství rozpouštědla byl nanesen na připravený sloupec.

4.2. Materiál a vybavení

4.2.1. Chemikálie

Dusičnan bismutitý zásaditý, p. a., (RNDr. Jan Kulich, s.r.o.)

Hydroxid sodný, p. a. (PENTA)

Kyselina chlorovodíková 35%, p. a. (Lachema)

Kyselina vinná, p. a., (RNDr. Jan Kulich, s.r.o.)

Uhličitan sodný bezvodý, p. a., (RNDr. Jan Kulich, s.r.o.)

4.2.2. Rozpouštědla

Chloroform, p.a., PENTA

Cyklohexan, p.a., PENTA

Diethylamin, p.a., Lachner

Ethanol 95%, denaturovaný methanolem, p.a.

n-hexan, p.a., PENTA

Toluen, p.a., PENTA

4.2.3. Chemikálie a materiál ke stanovení účinku erythrocytární AChE a BuChE

Chemikálie:

10 mM acetylthiocholin jodid, (Sigma-Adrich)

10 mM butyrylthiocholin jodid, (Sigma-Adrich)

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

5mM 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina, $\geq 98\%$ (Sigma-Aldrich)

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

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

Dimethylsulfoxid, (Sigma-Adrich)

Materiál:

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

Měření bylo prováděno v jednorázových semimikro-polystyrénových kyvetách 1,5 ml PLASTIBRAND®.

4.2.4. Přístroj použitý pro stanovení cholinesterázové inhibiční aktivity

Spektrofotometr UV-1601 CE SHIMADZU

4.2.5. Chemikálie a materiál ke stanovení antioxidační aktivity

2,2'-diphenyl-1-pikrylhydrazyl radikál, (Sigma-Adrich)

Kvercetin, (Sigma-Adrich)

Trolox, (Sigma-Adrich)

4.2.6. Přístroje použité při stanovování antioxidační aktivity

Pro stanovení antioxidační aktivity byl použit počítačově řízený (pomocí programu Fialab for Windows 5.0) FIALab 3000 analyzátor (FIALab Instruments Inc., Bellevue, WA, USA) opatřený pístovým čerpadlem o objemu 2,5 ml, šesticestným selekčním ventilem, USB 2000-UV/VIS spektrofotometrem s halogenovou lampou LS-1 (Ocean Optics, USA) a průtokovou detekční celou SMA-Z s optickou délkou 1 cm; objem mísící cívky je 0,6 ml a spojovací teflonové hadičky mají průměr 0,72 mm.

4.2.7. Detekční činidla

D 1: Dragendorffovo činidlo modifikované podle Muniera⁵⁴

- pro alkaloidy a další sloučeniny obsahující dusík.

- *roztok A*: připraven rozpuštěním 1,7 g zásaditého dusičnanu bismutitého a 20 g kyseliny vinné v 80 ml vody.
- *roztok B*: připraven rozpuštěním 16 g jodidu draselného ve 40 ml vody.
- *zásobní roztok*: získáme smísením roztoků A a B v poměru 1:1.
- *činidlo pro analýzu*: bylo připraveno rozpuštěním 5 ml kyseliny vinné v 50 ml vody a 5ml zásobního roztoku

4.2.8. Chromatografické adsorbenty

A 1: Kieselgel 60 F₂₅₄, Merck, 5 × 10 cm 32

Hliníková deska s vrstvou silikagelu pro tenkovrstvou chromatografii. Silikagel 60 F₂₅₄, tloušťka vrstvy 0,2 mm.

A 2: Silufol UV 254, Kavalier Votice, 20 × 10 cm, hliníková deska s tloušťkou vrstvy 0,1 mm pro tenkovrstvou chromatografii

A 3: Silikagel, 0,063–0,20 mm desaktivovaný 10 % vody, komerční adsorbent

4.2.9. Vytvájecí soustavy pro tenkovrstvou chromatografii (TLC)

S1: Toluen + CHCl₃ + Et₂NH 100:100:5

S2: Toluen + CHCl₃ + EtOH + Et₂NH 77:20:3:3

4.2.10. Vytvájecí soustavy pro preparativní TLC

S1: Toluen + CHCl₃ + Et₂NH 100:100:5

4.3. Extrakce alkaloidů z nati *Chelidonium majus* a zpracování výtřepku A

Příprava sumárního extraktu a jednotlivých výtřepků nebyla součástí této diplomové práce. Tato práce byla provedena Doc. RNDr. L. Opletalem na katedře farmaceutické botaniky v roce 2008. Postup přípravy pseudokyanidů benzofenanthridinových alkaloidů je uveden v následujícím textu.

4.3.1. Původ drogy

Sušenou nať s kořeny dodala firma JUGODRVO AD. Sběr byl proveden v Chorvatsku v období od července do září. Droga byla očištěna a usušena za normálních podmínek a její makroskopickou, mikroskopickou a chemickou identifikaci provedl Doc. RNDr. L. Opletal, CSc.

4.3.2. Příprava sumárního extraktu

Příprava extraktu byla provedena perkolací 41,8 kg drogy 95% etanolem a bylo získáno 480 l extraktu, který byl zahuštěn na vakuové odparce při 60°C. Přidáním asi 2 l vody vznikl temně hnědý, dehtovitý, sirupovitý roztok. Po zahřátí asi na 40°C bylo přidáno 8 l 1,5% kyseliny sírové. Poté byl oranžový roztok slit a nerozpustný seškrábán a rozpuštěn v bezvodé kyselině octové. Po přidání 7,5 l vody byl kalný roztok slit a pryskyřičný roztok opět rozpuštěn v kyselině octové a opět vysrážen vodou. Spojené dekantáty byly zfiltrány přes polyamidový filtr, na němž se po promytí vyloučil hnědo-oranžový sediment. Filtráty z kyseliny sírové i kyseliny octové byly spojeny. Vyloučila se bělavá sraženina, která na sebe adsorbovala soli alkaloidů. Tato suspenze byla zfiltrována přes polyamidovou plachetku a promyta vodou. Oba filtry byly suspendovány v 1,5% kyselině sírové a suspenze byla následně zfiltrována. Vzniklý filtrát byl spojen s kyselým extraktem roztoku. Z takto připraveného extraktu byly dále získány výtřepky A, B, J a E.

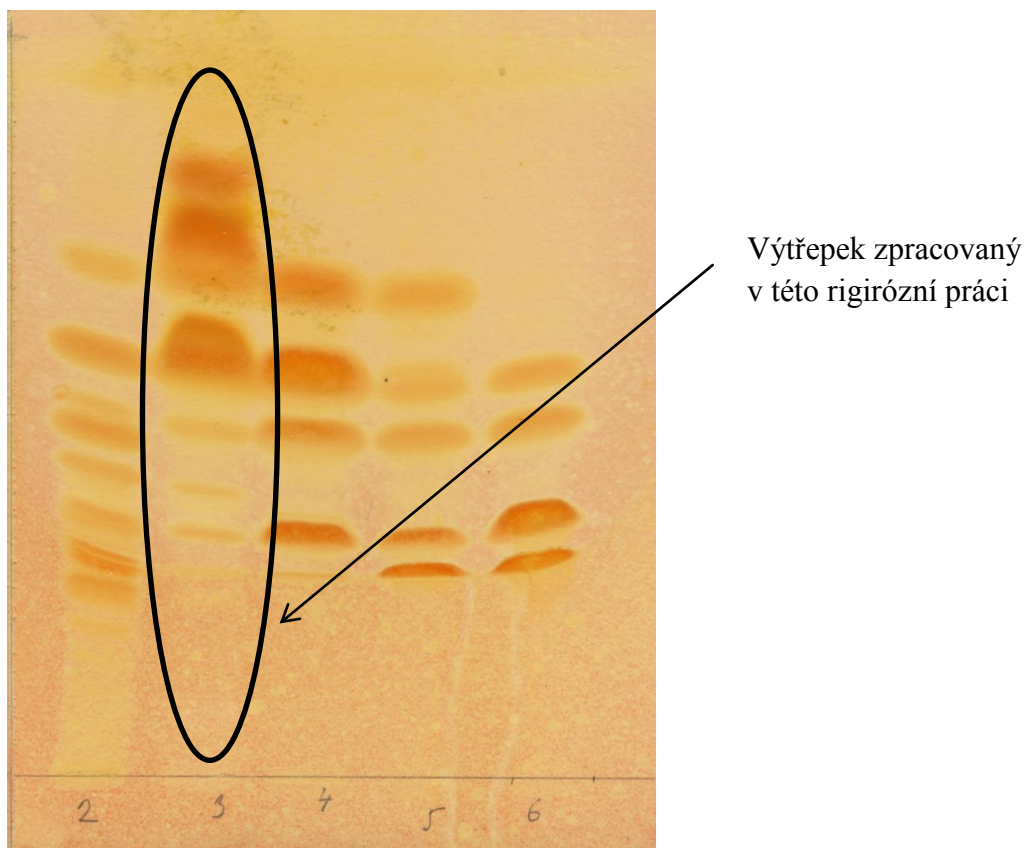
4.3.3. Příprava výtřepku A z primárního extraktu

Po přidání práškového, bezvodého uhličitanu sodného se kyselý roztok síranů zakalil (došlo k neutralizaci na pH přibližně 9). Poté byl roztok vytřepán 5x15 litry étheru. Étherové vrstvy byly spojeny a odděleny od zbytku vodné fáze. Rozpouštědlo bylo následně oddestilováno. Po prvním vytřepání se oddělil práškovitý, šedočerný podíl, který byl oddělen a vytřepán 2x400 ml étheru a přidán k étherovým výtřepkům. Po odpaření rozpouštědla vznikl odparek A.

4.3.4. Příprava pseudokyanidů benzofenanthridinových alkaloidů z výtřepku A Gadamerovou metodou⁵⁵

Odparek A byl rozpuštěn v 0,05 M H₂SO₄, byl přidán KCN do alkalické reakce a roztok byl opět okyselen 0,05 M H₂SO₄. Z roztoku se vyloučily nerozpustné pseudokyanidy, které odsáty, promyty vodou a vysušeny za sníženého tlaku.

Získané pseudokyanidy byly pro další práci rozloženy hodinovým varem ve směsi chloroform:ethanol:konc. HCl (1:2:1), chloroform a ethanol byly následně oddestilovány, vodný roztok zalkalizován amoniakem a uvolněné báze byly vytřepány etherem (5 x 2000 ml). Tímto byly odděleny od fialových rozkladných produktů. Spojené etherové fáze byly spojeny, oddestilovány a vysušeny. Bylo získáno 6 g tmavě hnědého, pěnového odparku, který byl následně zpracováván v rámci této diplomové práce.



Obr. 12: Detekce výtřepků z *Chelidonium majus*, výtřeppek A vyčištěný (Kieselgel UV 254 Merck, 10 cm (dráha 8,5 cm), To+Chf+EtOH+Et₂NH = 70:20:10:3, komora nasycená, vyvíjení 1x, detekce Dragendorffovým činidlem podle Muniera).

- 2 – A2 fenolické
- 3 – benzofenanthridiny (chelerythrin ad.)
- 4 – baze z chloridů nerozpustných ve vodě
- 5 – AC: chloridy rozpustné v chloroformu
- 6 – AD: chloridy nerozpustné v chloroformu

4.4. Sloupcová chromatografie výtřepku benzofenanthridinových alkaloidů z *Chelidonium majus*

6,0 g výtřepku benzofenanthridinových alkaloidů bylo rozpuštěno v 50 ml chloroformu, naneseno na kolonu a chromatografováno za účelem získání čistých alkaloidů. Frakce obsahující shodné alkaloidy byly na základě tenkovrstvé chromatografie spojeny. Výsledky chromatografie jsou shrnuty v následujících tabulkách (Tab. III, IV).

Tab. I: Sloupcová chromatografie

	Benzofenanthridinové alkaloidy, <i>Chelidonium majus</i>
Označení vzorku	<i>majus</i>
Hmotnost vzorku	6g, hnědá pěna
Druh a množství adsorbentu	Silikagel 0,063-0,2mm, desaktivovaný 10% vody
Vrstva s extraktem	40×40 mm
Dělicí vrstva	40×510 mm
Frakce (ml)/doba toku (min.)	100 ml/ 20 minut
Mrtvý objem	0,5 l

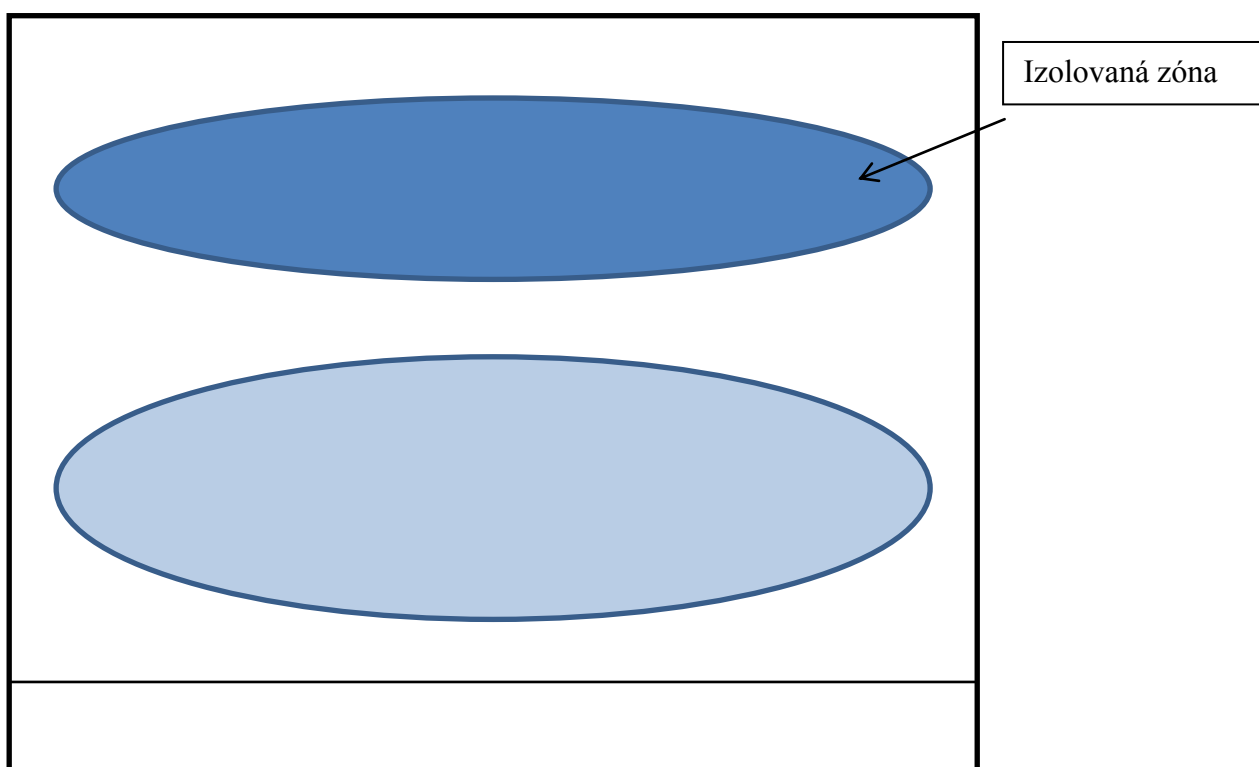
Tab. II: Výsledky sloupcové chromatografie

Č. frakce	Eluční systém	Popis (Poznámka)
1-5	CHCl ₃	neobsahuje alkaloidy
6-7	CHCl ₃	1,1 g oranžové krystaly
8	CHCl ₃	0,448 g oranžové krystalky
9	CHCl ₃	0,081 g žlutohnědá olejovitá hmota
10	CHCl ₃	neobsahuje alkaloidy
11	CHCl ₃	0,057 g červenohnědé krystalky
12-13	CHCl ₃	0,185 g oranžové krystaly
14	CHCl ₃	0,211 g oranžovohnědé krystalky
15-17	CHCl ₃	0,856 g oranžovohnědá pěna
18-19	CHCl ₃	0,727 g hnědá olejovitá hmota
20-21	CHCl ₃	0,492 g nažloutlá pěna
22-23	CHCl ₃	0,409 g žlutohnědá pěna
24-27	CHCl ₃	0,320 g hnědá pěna
28	CHCl ₃	0,116 g hnědá olejovitá hmota
29-30	CHCl ₃	0,207 g hnědá olejovitá hmota
31	CHCl ₃	0,510 g oranžovohnědá olejovitá hmota
32-34	CHCl ₃	32-42 společně odpařeno
35-37	CHCl ₃ + 3%EtOH	32-42 společně odpařeno
38-42	CHCl ₃ + 5%EtOH	32-42 0,530g žlutooranžová pěna
43	CHCl ₃ + 10%EtOH	0,758 g světle hnědá pěna
44	CHCl ₃ + 10%EtOH	neobsahuje alkaloidy
45	EtOH	neobsahuje alkaloidy

4.5. Zpracování frakcí 22-28

0,403g žlutohnědé pěny frakce 22-23 bylo rozpuštěno v chloroformu a přečištěno přes kolonu o průměru 1cm s 2,5 cm Al_2O_3 neutralizovaného 6% vody. Kolona byla promývána chloroformem. Získaný roztok alkaloidů byl odpařen.

K získání čistého alkaloidu byla využita preparativní tenkovrstvá chromatografie, kde byla jako vyvíjecí soustava použita směs chloroformu, toluenu a diethylaminu v poměru 100:100:5. Chromatografie byla provedena na 16 deskách a na každou z nich bylo nanášeno cca 20 mg odparku rozpuštěného v chloroformu. Vyvíjení každé z desek trvalo 20-25 minut. Z desek byla na základě UV detekce izolována horní zóna. Stacionární fáze byla promyta chloroformem a získaný filtrát byl promyt na koloně o průměru 1 cm s 2,5 cm Al_2O_3 neutralizovaného 6% vody. Následně bylo k filtrátu přidáno malé množství hexanu a došlo k vyloučení oranžových krystalků.



Obr.13: Preparativní tenkovrstvá chromatografie frakcí 22-23

0,320 g hnědé pěny frakce 24-27 bylo rozpuštěno v chloroformu a přečištěno přes kolonu o průměru 1cm s 2,5 cm Al_2O_3 neutralizovaného 6% vody. Filtrát byl odpařen a rozpuštěn zahřátím v malém množství chloroformu. Po následném uložení v lednici došlo ke vzniku drobných krystalů, které byly zdekantovány a přečištěny ethanolem.

0,116 g hnědé olejovité hmoty frakce 28, bylo rozpuštěno v chloroformu a přečištěno přes kolonu o průměru 1cm s 2,5 cm Al_2O_3 neutralizovaného 6% vody. Kolona byla promývána chloroformem. Filtrát byl odpařen a vzniklé krystalky zdekantovány a přečištěny ethanolem.

Krystalky získané z frakcí 22-23, 24-27 a 28 byly podrobeny TLC, která potvrdila, že všechny obsahují shodný alkaloid. Proto byly tyto krystalky spojeny a následně rozpuštěny chloroformu, ze kterého po přidání hexanu vykristalizovaly. Tyto krystalky byly omyty ethanolem a vysušeny v exikátoru. Bylo získáno 0,116 g čistého alkaloidu. Čistota tohoto alkaloidu byla potvrzena pomocí hmotnostní spektrofotometrie. Získané krystalky byly označeny jako LŠ3

4.6. Zpracování frakce 43

0,758 g světle hnědé pěny frakce 43 bylo rozpuštěno v chloroformu. Následným přidáním ehanolu se vyloučily oranžovohnědé krystalky, které byly zfiltrvány přes fritu. Filtrát byl uložen jako matečný louh LŠ4 ML. Získané krystalky byly rozpuštěny v chloroformu a vzniklý roztok byl odpařením zahuštěn. Ochlazením tohoto roztoku se vyloučily krystalky, které byly přečištěny hexanem a ethanolem a vysušeny v exsikátoru.

Výsledná hmotnost získaných krystalů byla 0,255 g. Krystalky byly podrobeny hmotnostní spektrofotometrii, studii NMR a byly uloženy pod označením LŠ4. Dále byl u izolovaných alkaloidů stanoven bod tání 170°C.

4.7. Určení struktury izolovaný látek

4.7.1. Měření hmotnostního spektra (MS)

Spektra byla měřena na LC/MS Thermo Finningan LCQDuo, iontová past, ionizace elektrosprejem v kladném módu (ESI+). MS/MS spektra byla měřena při kolizní energii 40 eV. Látka byla rozpuštěna v metanolu.

4.7.2. Měření NMR spektra

Spektra byla měřena na spektrometru Varian Inova 500 s pracovní frekvencí 499.9 MHz pro ^1H a 125.7 MHz pro ^{13}C jádra. ^{13}C NMR spektra byla měřena v 5 mm SW širokopásmové sondě, ^1H a všechna ^2D spektra v inverzní 5mm ID PFG sondě s využitím standardních pulzních sekvencí. Experimenty byly měřeny v deuteriochloroformu při 25 °C.

Hodnoty chemických posunů jsou v ppm a jsou vztaženy k internímu standardu (hexamethyldisilan, 0,04 ppm, v ^1H spektrech) nebo signálu solventu (76,99 ppm, v ^{13}C spektrech). (Dr. M. Kurfürst, Ph.D., Ústav chemických procesů, AV ČR, Praha).

4.7.3. Měření bodu tání

Teploty tání byly měřeny na Koflerově bloku a nejsou korigovány.

4.8. Stanovení inhibiční aktivity alkaloidu vůči AChE a BuChE

4.8.1. Podmínky měření

Experimenty byly prováděny za těchto podmínek:

- v prostředí fosfátového pufru (pH 7,4)
- při laboratorní teplotě
- v jednorázových polystyrénových kyvetách (optická délka 10 mm)
- při vlnové délce spektrofotometru 436 nm

4.8.2. Příprava erythrocytárních pouzder

Erythrocytární pouzdra byla připravena z čerstvě odebrané krve, ke které byl přidán 1 ml citrátu sodného na 10 ml krve podle lehce modifikované metody Stecka a Kanta⁵⁶. Plazma (HuBuChE) byla odstraněna z plné krve centrifugací při rychlosti 4000 ot./min za použití centrifugy Boeco U-32R s rotorem Hettich 1611. Erythrocyty byly přemístěny do 50ml zkumavek a třikrát promyté 5mM fosfátovým pufrem (pH 7,4) obsahujícím 150 mM chloridu sodného (12 000 ot./min., Avanti J-301, rotor JA-30.50). Promyté erythrocyty byly míchány s 5mM fosfátovým pufrem (pH 7,4) po dobu 10 minut, čímž došlo k jejich lýze. Následně byly centrifugovány rychlostí 20 000 ot./min a vzniklá pouzdra (HuAChE) byla třikrát promyta fosfátovým pufrem.

4.8.3. Stanovení cholinesterázové inhibiční aktivity (hodnoty IC₅₀)

Pro stanovení hodnoty IC₅₀ byla použita Ellmanova spektrofotometrická metoda s použitím 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoové kyseliny (DTNB)⁵⁷. Jako substráty se používají estery thiocholinu, které jsou cholinesterázami štěpeny na thiocholin a příslušnou kyselinu. Stanovuje se SH- skupina thiocholinu, která se naváže na DTNB za vzniku žlutě zbarveného produktu, který se stanovuje spektrofotometricky při vlnové délce 436 nm. Sleduje se nárůst absorbance za 1 minutu. Hodnoty IC₅₀ byly vypočítány z naměřených hodnot poklesu aktivity acetylcholinesterázy nebo butyrylcholinesterázy nelineární regresí v programu GraphPad Prism (verze 3.02 pro Windows; výrobce Graph Pad Software, San Diego, CA, USA). Výsledky byly porovnány s hodnotami IC₅₀ známých inhibitorů cholinesteráz: galanthaminem (IC₅₀ HuAChE = 6,9 ± 0,3 μM, HuBuChE = 156,0 ± 6,9 μM), huperzinem A (IC₅₀ HuAChE = 0,3 ± 0,1 μM, HuBuChE >1000 μM).

4.9. Stanovení antioxidační aktivity získaných alkaloidů

Antioxidační aktivita byla testována *in vitro* DPPH testem. Metoda je založena na reakci stabilního 2,2'-difenyl-1-pikrylhydrazylu (DPPH) se vzorkem. Snížení absorbance DPPH

měřené při 525 nm je závislé na koncentraci antioxidantu ve sledovaném vzorku. Antiradikálová aktivita vzorků byla vyjádřena jako 50% účinná koncentrace (EC_{50}), která byla vypočítána pomocí programu GraphPad Prism (verze 3.02 pro Windows; výrobce Graph Pad Software, San Diego, CA, USA) a byla porovnána se známými antioxidanty kvercetinem ($EC_{50} = 25,3 \pm 1,2 \mu M$) a troloxem ($EC_{50} = 27,8 \pm 0,8 \mu M$).

5. VÝSLEDKY

Na základě MS a NMR studií a porovnání dat s literaturou byly izolované látky identifikovány jako 6-ethoxydihydrosanguinarin a 6-ethoxy-5,6-dihydrochelerytrin.

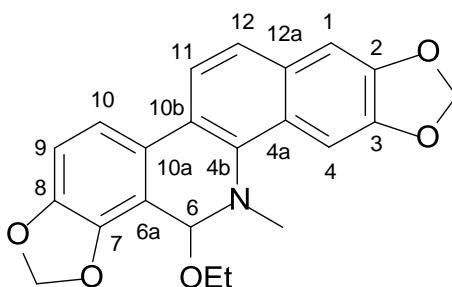
5.1. Strukturní analýza 6-ethoxydihydrosanguinarinu

5.1.1. MS studie 6-ethoxydihydrosanguinarinu

EI-MS m/z $[M]^+$ 377 (4), 332 (21), 166 (4); MS/MS (377, pozitivní mód) 332 (100); MS/MS (332, pozitivní mód) 332 (100), 304 (46), 274 (65), 246 (33), 218 (13).

5.1.2. NMR studie 6-ethoxydihydrosanguinarinu

Struktura izolované látky byla určena na základě interpretace ^1H - a ^{13}C -NMR spekter a jejich porovnání s daty v literatuře^{58,59}.



Obr. 14: 6-ethoxy-5,6-dihydrosanguinarin

5.1.2.1. ^1H -NMR spektrum

^1H NMR (CDCl_3 , 25°C, 500.13 MHz):

1.1 (3H, t, $J = 7.1$ Hz, C-Me), 2.76 (3H, s, NMe), 3.56-4.04 (2H, m, CH_2), 5.48 (1H, s, H-6), 6.04-6.12 (4H, m, 2 x OCH_2O), 6.91 (1H, d, $J = 8.3$ Hz, H-9), 7.12 (1H, s, H-1), 7.40 (1H, d, $J = 8.3$ Hz, H-10), 7.66 (1H, s, H-4), 7.77 (1H, d, $J = 8.6$ Hz, H-11).

5.1.2.2. ^{13}C -NMR spektrum

^{13}C NMR (CDCl_3 , 25°C , 125.76 MHz):

15.06, $-\text{CH}_3$; 40.87, NMe; 61.68 OCH_2 ; 84.26, C-6; 100.68, C-4; 101.04, 2,3- OCH_2O ; 101.69, 7,8- OCH_2O ; 104.63, C-1; 108.72, C-9; 113.40, C-6a; 116.39, C-10; 120.31, C-11; 122.97, C-10b; 123.60, C-10; 125.90, C-10a; 126.92, C-4a; 131.04, C-12a; 138.53, C-4b; 145.24, C-7; 147.31, C-8; 147.40, C-2; 148.02, C-3.

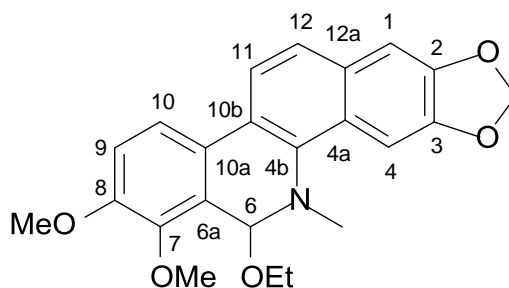
5.2. Strukturní analýza 6-ethoxydihydrochelerytrinu

5.2.1. MS studie 6-ethoxydihydrochelerytrinu

ESI-MS m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ 394 (4), 348 (100); MS/MS (394) 348 (100); MS/MS (348) 317 (25), 286 (40).

5.2.2. NMR studie 6-ethoxydihydrochelerytrinu

Struktura izolované látky byla určena na základě interpretace ^1H - a ^{13}C -NMR.



Obr. 15: 6-ethoxydihydrochelerytrin

5.2.2.1. ¹H-NMR spektrum

¹H NMR (CDCl₃, 25°C, 500.13 MHz):

1.1 (3H, t, *J* = 7.1 Hz, C-Me), 2.76 (3H, s, NMe), 3.50-4.10 (2H, m, CH₂), 3.78 (3H, s, -OCH₃), 3.78 (3H, s, -OCH₃) 5.56 (1H, s, H-6), 6.91 (1H, d, *J* = 8.3 Hz, H-9), 7.08 (1H, s, H-1), 7.38 (1H, d, *J* = 8.3 Hz, H-10), 7.55 (1H, s, H-4), 7.79 (1H, d, *J* = 8.6 Hz, H-11),

5.2.2.2. ¹³C-NMR spektrum

¹³C NMR (CDCl₃, 25°C, 125.76 MHz):

15.12, -CH₃; 40.95, NMe; 55.88 -OCH₃a, 61.00 -OCH₃a, 61.68 OCH₂; 84.26, C-6; 100.68, C-4; 101.69, 7,8-OCH₂O; 104.53, C-1; 108.72, C-9; 112.40, C-6a; 116.19, C-10; 120.31, C-11; 122.97, C-10b; 123.60, C-10; 125.88, C-10a; 126.72, C-4a; 131.04, C-12a; 138.53, C-4b; 145.24, C-7; 147.31, C-8; 147.40, C-2; 148.02, C-3.

5.3. Inhibiční aktivita vůči AChE a BuChE

Získané alkaloidy byly testovány na jejich inhibiční aktivitu vůči erytrocytární acetylcholinesteráze a sérové butyrylcholinesteráze. Výsledky jsou uvedeny v následující tabulce (Tab.III).

Tab. III: In vitro inhibiční aktivita izolovaných alkaloidů vůči AChE a BuChE

Látky	IC ₅₀ (μM) ^a	
	AChE	BuChE
6-ethoxydihydrosanguinarin	3,25 ± 0,24	4,51 ± 0,31
6-ethoxydihydrochelerythrin	0,83 ± 0,04	4,20 ± 0,19
Galanthamin ^b	6,9 ± 0,3	156 ± 6,9
Huperzin ^b	0,25 ± 0,01	>1000

^a Každé měření bylo opakováno dvakrát

^b Referenční látka

5.3. Antioxidační aktivita

Izolované alkaloidy byly podrobeny testování jejich antioxidační aktivity. Výsledky této studie a hodnoty EC₅₀ jsou uvedeny v následující tabulce (Tab.IV).

Tab. IV: Antioxidační aktivita alkaloidů

Látky	EC ₅₀ (μM)
6-ethoxydihydrosanguinarin	> 1000
6-ethoxydihydrochelerythrin	> 1000
Kvercetrin ^b	25,3 ± 1,2
Trolox ^b	27,8 ± 0,8

^a Každé měření bylo opakováno dvakrát

^b Referenční látka

6. DISKUZE

Cílem rigorózní práce bylo finální zpracování výtřepku benzofenanthridinových alkaloidů z *Chelidonium majus* za účelem izolace alkaloidů, které nebyly izolovány během diplomové práce. Pomocí chromatografických metod (sloupcová chromatografie a preparativní TLC) byly získány dva alkaloidy v čisté formě. Byly označeny jako LŠ3 a LŠ4 a podrobeny NMR, MS analýzám za účelem jejich identifikace a biologickým testům.

Látka LŠ3 byla na základě spektroskopických dat a jejich porovnáním s literaturou identifikována jako 6-ethoxydihydrosanguinarin^{58,59}. NMR spektra (¹H a ¹³C) druhého alkaloidu (LŠ4) nebyly v literatuře nalezeny, ale na základě konzultací s Ing. Milanem Kurfürstem, Ph.D., který NMR spektra měřil a interpretoval, byla látka identifikována jako 6-ethoxydihydrochelerythrin.

Tyto struktury byly z *Chelidonium majus* izolovány vůbec poprvé, jedná se o strukturní analoga benzofenanthridinových alkaloidů, běžně se vyskytujících v čeledi *Papaveraceae*, sanguinarinu a chelerytrinu. Na základě literární rešerše bylo zjištěno, že volné báze těchto látek v přítomnosti rozpouštědel jako CHCl₃, MeOH, EtOH apod. snadno vytváří adukty^{60,61}. To také vysvětluje přítomnost těchto látek ve zpracovávané frakci. Tyto adukty vznikly s velkou pravděpodobností během přípravy pseudokyanidů Gadamerovou metodou v rámci mé diplomové práce^{9,55}.

Inhibiční aktivita izolovaných látek byla stanovena *in vitro* Ellmanovou metodou⁵⁷. Jako zdroj HuAChE sloužila erytrocytární pouzdra, zdrojem HuBuChE byla lidská plasma. Získané hodnoty IC₅₀ (6-ethoxydihydrosanguinarin: IC₅₀ (HuAChE) = 3,25 ± 0,24 μM, IC₅₀ (HuBuChE) = 4,51 ± 0,31 μM, 6-ethoxydihydrochelerythrin: IC₅₀ (HuAChE) = 0,83 ± 0,04 μM, IC₅₀ (HuBuChE) = 4,20 ± 0,19 μM) byly porovnány s hodnotami IC₅₀ standartů (galantamin: IC₅₀ (HuAChE) = 6,9 ± 0,3 μM, IC₅₀ (HuBuChE) = 156 ± 6,9 μM, huperzin A: IC₅₀ (HuAChE) = 0,25 ± 0,01 μM, IC₅₀ (HuBuChE) >1000 μM).

Izolované látky vykazaly vyšší inhibiční aktivitu vůči oběma cholinesterázám, nežli terapeuticky využívaný standart galanthamin. Obecně je známo, že látky s kvartérním dusíkem jsou dobré inhibitory acetylcholinesterázy⁶². Problémem těchto látek, ale bývá jejich prostupnost přes hematoencefalickou membránu⁶³. V naší studii byly testovány ethoxy-

analoga sanguinarinu a chelerytrinu, jejich inhibiční aktivita vůči cholinesteráze byla popsána již dříve^{64,65}. Ačkoliv izolované látky nesly ve své struktuře terciární dusík, ze své inhibiční aktivity mnoho neztratily. Obě látky také vykázaly velice dobrou inhibici HuBuChE.

Vzhledem ke skutečnosti, že v průběhu Alzheimerovy choroby hraje významnou roli i oxidační stres, byly izolované látky testovány také na jejich antioxidační aktivitu DPPH testem. Tato aktivita byla ale nezajímavá (> 1 mM).

Na základě naší studie můžeme konstatovat, že obě látky lze považovat za perspektivní struktury při hledání nových potenciálních látek přírodního původu. Dané struktury sice nejsou přímé sekundární metabolity, ale jejich případná příprava není složitá a je popsána v literatuře^{58,59}.

7. LITERATURA

1. <http://archiv.otevrena-veda.cz/users/Image/default/C1Kurzy/Chemie/30koepecky.pdf>
vystaveno 3.1. 2011.
2. Vavrečková C., Ulrichová J.: Biologická aktivita kvartérních benzo[c]fenanthridinových alkaloidů sanguinarinu a chelerytrinu. *Chem. Listy*, 88, 1994, 238 – 248.
3. Walterová D., Ulrichová J., Válka I., Vičar J., Vavrečková C., Táborská E., Harkrader R. J., Meyer D. L., Černá H., Šimánek V.: Benzo[c]phenanthridine alkaloids sanguinarine and chelerythrine. Biological activities and dental care applications. *Acta univ. Palacki. Olomouc.*, 139, 1995, 7-16.
4. Dostál J., Potáček M.: Quaternary benzo[c]phenanthridine alkaloids. *Collect. Czech. Chem. Commun.*, 55 (12), 1990, 2840-2873.
5. Vlček J., Fialová D.: *Klinická farmacie I.* Grada, Praha 2010.
6. Preiss M., Kučerová H.: *Neuropsychologie v neurologii.* Grada, Praha 2006.
7. Zdařilová A., Malíková J., Dvořák Z., Ulrichová J., Šimánek V.: Kvartérní isochinolinové alkaloidy sanguinarin a chelerythrin, účinky *in vitro* a *in vivo*. *Chem. Listy*, 100, 2006, 30-41.
8. Colombo M. L., Bosisio E.: Pharmacological activities of *Chelidonium majus*. *Pharmacol. Res.*, 33 (2), 1996, 127-134.
9. Šebestová L.: Biologicky aktivní metabolity rostlin 3. Alkaloidy *Chelidonium majus* L. a jejich inhibiční aktivita vůči acetylcholinesteráze. UK v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Hr. Králové 2010.
10. Koukolík F., Jiráček R.: *Alzheimerova nemoc a jiné demence.* Grada 1998.
11. Amaduci L. A., Roca W. A., Schoenberg B.S.: Origin of the distinction between Alzheimer's disease and senile dementia: how histology can clarify nosology. *Neurology*, 36, 1986, 1497-1499.
12. Koukolík F.: *Alzheimerova nemoc a vaskulární demence.* *Postgraduální medicína*, 1, 2000.
13. Jiráček R.: Farmakoterapie Alzheimerovy choroby. *Remedia*, 19, 2009, 342-345.

14. Mahley R.W.: Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cellbiology. *Science*, 240, 1998, 622-630.
15. Strittmatter W.J., Saunders A.M., Schmechel D.: Apolipoprotein E: high avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late onset familial Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 1993, 1997-1983.
16. Higgins G.A., Large C.H., Rupniak H.T., Barnes J.C.: Apolipoprotein E and Alzheimer's disease: a review of recent studies. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 56, 1997, 675-685.
17. Jiráček R., Vnoučková K.: Rivastigminum. *Remedia*, 13, 2003, 372–378.
18. <http://www.pharmaceutical-networking.com/eli-lilly-ly450139-treatment-of-alzheimer%E2%80%99s-disease/>, vystaveno 25.7.2011.
19. Rössner P.: Alzheimerova choroba – diagnostika a léčba. *Neurol.Prax.*, 1, 2004, 11-16.
20. Jiráček R.: Diagnostika a terapie Alzheimerovy choroby. *Neurol. Prax.*, 2008, 224-227.
21. Jiráček R.: Současné trendy v biologické terapii Alzheimerovy choroby. *Psychiatr. Prax.*, 1, 2006, 8–10.
22. Jiráček R., Slíva J.: Donepezilum. *Remedia*, 14, 2004, 464-469.
23. Krejčová G., Ševelová L.: Současné poznatky o galantaminu, reverzibilním inhibitoru acetylcholinesterázy. *Voj. Zdrav. Listy*, 1, 2003, 37-44.
24. Martin J., Kršková Z., Dušek J.: Huperzin A a jiné přírodní látky v léčbě Alzheimerovy choroby. *Prakt. lékařn.*, 2011, 39–41.
25. Lincová D., Farghali H.: Základní a aplikovaná farmakologie. Galén 2007.
26. Minařík J.: Farmakognosie, 1. vydání., Praha, Avicenum 1979, 384 .
27. Dostál J., Slavík J.: Novější poznatky o sanguinarinu a příbuzných alkaloidech. *Chem. Listy*, 94, 2000, 15-20.
28. Dostál J., Slavík J.: Atta-ur-Rahman (Ed.), Studies in natural products chemistry. *Els. Sci. B.V.*, 2002, 155-184.

29. Marek R., Toušek J., Dostál J., Slavík J., Dommissse R., Sklenář V.: ¹H and ¹³C NMR study of quaternary benzo[c]phenanthridine alkaloids. *Magn. Reson. Chem.*, 37, 1999, 781-787.
30. Slaninová I., Slanina J., Táborská E. : Quaternary benzo[c]phenanthridine alkaloids - Novel cell permeant and red fluorescing DNA probes. *Cytometry*, 71, 2007, 700-708.
31. Slaninová I., Slanina J., Táborská E. : Fluorescenční vlastnosti kvartérních benzo[c]fenanthridinových alkaloidů a jejich využití jako supravitálních DNA sond. *Chem. Listy*, 102, 2008, 427-433.
32. Suchomelová J., Bochořáková H., Paulová H., Musil P., Táborská E.: HPLC quantification of seven quaternary benzo[c]phenanthridine alkaloids in six species of the family *Papaveraceae*. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 44, 2007, 283-287.
33. Jahodář L.: Farmakobotanika. Karolinum, Praha 2006, 52-53.
34. Kubát K., Hejný S., Slavík B.: Květena České republiky 1. Academia, Praha 1988, 493 -494.
35. <http://lecive-bylinky.celyden.cz/vlastovicnik-vetsi/>, vystaveno 21.1.2010.
36. Tomko J.: Farmakognózia. 2. vyd., Martin, Osveta 1999.
37. Philchenkov A., Kaminsky V., Zavelevich M., Stoika R.: Apoptogenic activity of two benzophenanthridine alkaloids from *Chelidonium majus* L. does not correlate with their DNA demagog effects. *Toxicol. in vitro*, 22, 2008, 287-295.
38. Zuo G.Y., Meng F. Y., Hao X. Y., Zhang Y. L., Wang G. C., Xu G. L.: Antibacterial alkaloids from *Chelidonium majus* Linn. (*Papaveraceae*) against clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Pharm. Sci.*, 11, 2008, 90-94.
39. Suchomelová J., Bochořáková H., Paulová H., Musil P., Táborská E.: HPLC quantification of seven quaternary benzo[c]phenanthridine alkaloids in six species of the family *Papaveraceae*. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 44, 2007, 283-287.
40. Dostál J., Potáček M.: Quaternary benzo[c]phenanthridine alkaloids. *Collect. Czech. Chem. Commun.*, 55 (12), 1990, 2840-2873.

41. Harnischfeger G., Stolze H.: *Bewährte Pflanzendrogen in Wissenschaft und Medizin*, Bad Homburg/Melsungen, 1983.
42. <http://www.sharkan.net/print.php?t=87>, vystaveno 3.1.2011.
43. http://www.efloras.org/gallery_image_list.aspx?flora_id=600&gallery_id=1109, vystaveno 6.2.2011.
44. <http://databaze.dendrologie.cz/index.php?menu=4&id=700> , vystaveno 25.7.2011.
45. Bhattacharya S., Zaman M.K.: Pharmacognostical evaluation of *Zanthoxylum nitidum* bark. *Pharm.Tech. Research*, 1, 2009, 292-298.
46. Blaschek W., Hänsel R., Keller K., Reichling J., Rimpler H., Schneider G.: *Hagers Handbuch der Pharmazeutischen Praxis. Drogen L – Z*. Springer, 1998.
47. Yang C.H., Cheng M.J., Lee S.J., Yang C.W., Chang H.S., Chen I.S.: Secondary metabolites and cytotoxic activities from the stem bark of *Zanthoxylum nitidum*. *Chem. Biodivers.*, 6, 2009, 846-857.
48. Hu J., Zhang W.D., Liu R.H., Zhang C., Shen Y.H., Li H.L., Liang M.J., Xu X.K.: Benzophenanthridine alkaloids from *Zanthoxylum nitidum* (Roxb.) DC, and their analgesic and anti-inflammatory activities. *Chem. Biodivers.*, 3(9), 2006, 990-995.
49. Yang G., Chen D.: Alkaloids from the roots of *Zanthoxylum nitidum* and their antiviral and antifungal effects. *Chem. Biodivers.*, 2008, 1718-1722.
50. Cui X.G., Zhao Q.J., Chen Q.L., Xu L., Song Y., Jin Y.S., Xu D.F.: Two new benzophenanthridine alkaloids from *Zanthoxylum nitidum*. *Helv. Chim. Act.*, 2008, 155-158.
51. Neuwinger H.D.: *Afrikanische Arzneipflanzen und Jagdgiste*. Verlagsgesellschaft, Stuttgart, 734-737.
52. Adeniyi C.B.A., Odumosu B.T., Aiyelaagbe O.O., Kolude B.: *In-vitro* antimicrobial activities of methanol extracts of *Zanthoxylum xanthoxyloides* and *Pseudocedrela kotschyi*. *Afr. J. Biomed. Research*, 13, 2010, 61-68.

53. Sati S. C., Sati M. D., Raturi R., Badoni P., Singh H.: Anti-inflammatory and antioxidant activities of *Zanthoxylum Armatum* stem bark. *Global Journals Inc.*, 11, 2011, 18-21.
54. Stahl, E.: Thin-layer Chromatography, A Laboratory Handbook. Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York, 1969.
55. Gadamer J., Stichel A.: *Chelidonium* alkaloids. III. Bromochelidonine and the oxidation of chelidonine with mercuric acetate. *Arch. Pharm.*, 262, 1924, 488.
56. Steck T. L., Kant J. A.: Preparation of impermeable ghosts and inside-out vesicles from human erythrocyte membranes. *Method. Enzymol.*, 31, 1974, 172-180.
57. Ellman G. L., Courtney K. D., Andres V. Jr, Feather-Stone R. M.: A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.*, 7, 1961, 88-95.
58. Dostál J., Marek R., Slavík J., Táborská E., Potáček M., Sklenář V.: Sanguinarine pseudobase: re-examination of NMR assignments using gradient-enhanced spectroscopy. *Magn. Reson. Chem.*, 36, 1998, 869-872.
59. Dostál J., Bochořáková H., Táborská E., Slavík J.: Structure of sanguinarine base. *J. Nat. Prod.*, 59, 1996, 599-602.
60. Toušek J., Domisse R., Dostál J., Žák Z., Pieters L., Marek R.: Configuration and conformation of sanguinarine and chelerythrine free bases stereoisomers. *J. Mol. Struct.*, 613, 2002, 102-113.
61. Marek R., Sečkářová P., Hulová D., Marek J., Dostál J., Sklenář: Palmatine and berberine isolation artifacts. *J. Nat. Prod.*, 2003, 66, 481-486.
62. Whiteley C.G., Daya S.: Protein ligand interactions. Part 5: Isoquinoline alkaloids as inhibitors of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase from *Electrophorus electricus*. *J. Enzym. Inhib.*, 9, 1995, 285-294.
63. Khorana N., Markmee S., Ingkaninan K., Ruchirawat S., Kitbunnadaj R., Pullagurla M.R.: Evaluation of new lead for acetylcholinesterase inhibition. *Med. Chem. Res.*, 18, 2009, 231-241.

64. Kuznetsova L.P., Nikolskaya E.B., Sohilina E.E., Faddeeva M.D.: Inhibition of human blood acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase by some alkaloids. *J. Evol. Biochem. Phys.*, 38, 2002, 35-39.
65. Ulrichová J., Walterová D., Preininger V., Slavík J., Lenfeld J., Cushman M., Šimánek V.: Inhibition of acetylcholinesterase activity by some isoquinoline alkaloids. *Planta Medica*, 48, 1983, 111-115.

8.SEZNAM ZKRATEK

A-beta42	amyloidový beta protein se 42 aminokyselinovými články
AChE	acetylcholinesteráza
APP	amyloidový prekurzorový protein
ApoE	apolipoprotein E
BuChE	butyrylcholinesteráza
DPPH	2,2'-difenyl-1-pikrylhydrazyl
DTNB	5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoové kyseliny
HuAChE	lidská erytrocytární acetylcholinesteráza
HuBuChE	lidská sérová butyrylcholinesteráza
MIC	minimální inhibiční koncentrace
MMSE	Mini Mental State Exam
MRSA	meticilin-rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i>
MS	hmotnostní spektrometrie
NMDA	N-metyl-D-aspartátový
NMR	nukleární magnetická rezonance
PS1	gen pro presenilin 1 umístěný na 14q24
PS2	gen pro presenilin 2 na 1q41
TLC	tenkovrstvá chromatografie

ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra: Katedra farmaceutické botaniky a ekologie

Kandidát: Mgr. Lenka Šebestová

Konzultant: Ing. Lucie Cahlíková, PhD.

Název rigorózní práce: Biologicky aktivní metabolity rostlin. III. Alkaloidy *Chelidonium majus* L. a jejich neurotropní a antioxidační aktivita.

Cílem této práce bylo dopracování výtřepku benzofenanthridinových alkaloidů z *Chelidonium majus*, izolace minimálně jednoho alkaloidu v čisté formě a stanovení jeho anticholinesterázové a antioxidační aktivity.

Z výtřepku byly v rámci této práce pomocí sloupcové chromatografie izolovány dva alkaloidy. První látka LŠ3 byla na základě MS a NMR studií identifikována jako 6-ethoxydihydrosanguinarin a druhá látka LŠ4 byla stejným způsobem identifikována jako 6-ethoxydihydrochelerythrin.

Obě izolované látky byly podrobeny studiím na jejich inhibiční aktivitu vůči lidské erytrocytární acetylcholinesteráze a lidské sérové butyrylcholinesteráze. Byly stanoveny hodnoty IC_{50} (6-ethoxydihydrosanguinarin: IC_{50} (HuAChE) = $3,25 \pm 0,24 \mu\text{M}$, IC_{50} (HuBuChE) = $4,51 \pm 0,31 \mu\text{M}$, 6-ethoxydihydrochelerythrin: IC_{50} (HuAChE) = $0,83 \pm 0,04 \mu\text{M}$, IC_{50} (HuBuChE) = $4,20 \pm 0,19 \mu\text{M}$). Izolované alkaloidy vykazaly vyšší inhibiční aktivitu vůči oběma cholinesterázám, nežli terapeuticky využívaný standart galantamin.

Tyto dva alkaloidy byly také testovány na jejich antioxidační aktivitu. Získané hodnoty EC_{50} byly u obou látek vyšší než $1000 \mu\text{M}$, proto lze říci, že nevykazují žádnou terapeuticky využitelnou antioxidační aktivitu.

Klíčová slova: acetylcholinesteráza, Alzheimerova choroba, benzofenanthridinové alkaloidy, butyrylcholinesteráza, *Chelidonium majus*.

ABSTRACT

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department: Department of Pharmaceutical Botany and Ecology

Candidate: Mgr. Lenka Šebestová

Adviser: Ing. Lucie Cahlíková, PhD.

Thesis title: Biologically active metabolites of plants. III. Alkaloids from *Chelidonium majus* L. and their neurotropic and antioxidant activity.

The aim of this thesis, which followed the diploma thesis, was final treatment of alkaloid fraction of benzophenanthridine alkaloids from *Chelidonium majus*, the isolation of minimum one alkaloid in pure form and to determine of its cholinesterase and antioxidative activity.

Using column chromatography, prep. TLC and crystallization were isolated two benzophenanthridine alkaloids marked as LŠ3 and LŠ4. First compound LŠ3 has been identified by comparison of their spectral data with those reported in the literature. LŠ4 has been identified on the basis of their MS, NMR spectra and consultations.

The activity of both alkaloids against erythrocyte acetylcholinesterase (HuAChE) and plasma butyrylcholinesterase (HuBuChE) were determined. Values of IC_{50} were calculated for both alkaloids (IC_{50} (HuAChE) = $3,25 \pm 0,24 \mu\text{M}$, IC_{50} (HuBuChE) = $4,51 \pm 0,31 \mu\text{M}$, 6-ethoxydihydrochelerythrin: IC_{50} (HuAChE) = $0,83 \pm 0,04 \mu\text{M}$, IC_{50} Hu(BuChE) = $4,20 \pm 0,19 \mu\text{M}$). Both alkaloids showed higher inhibition activity than therapeutically used galanthamine.

Both alkaloids were also tested for their antioxidative activity, but they were considered inactive ($> 1 \text{ mM}$).

Keywords: acetylcholinesterase, Alzheimer's disease, benzophenanthridine alkaloids, butyrylcholinesterase, *Chelidonium majus*.