

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

RIGORÓZNÍ PRÁCE

Biologicky aktivní metabolity rostlin IV.

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

Biologically Active Metabolites of Plants IV.

**Alkaloids from *Chelidonium majus* L. and their Neurotropic and
Antioxidant Activity**

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

2011

Mgr. Magdalena Novotná

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že tato 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. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

V Mistrovicích, září 2011

Magdalena Novotná

Tato práce vznikla za finanční podpory projektu Specifického vysokoškolského výzkumu SVV/2011/263002.

PODĚKOVÁNÍ

Děkuji Ing. Lucii Cahlíkové, Ph.D. za věnovaný čas a pomoc při vypracovávání rigorózní práce, odborné vedení, poskytnuté materiály i naměření MS spekter. Rovněž děkuji celé katedře Farmaceutické botaniky a ekologie za příjemné pracovní prostředí, zvláště Ing. Kateřině Macákové za změření biologických aktivit izolovaných látek a Ing. Milanu Kurfürstovi, Ph.D. z Ústavu chemických procesů AVČR za změření a interpretaci NMR spekter. Poděkování patří i Mgr. Martinu Krátkému a Pavlu Strnadovi i celé mé rodině, která mě vždy podporovala ve studiu.

OBSAH

1	ÚVOD.....	4
2	CÍL PRÁCE.....	7
3	TEORETICKÁ ČÁST.....	9
3.1	Původ a rozšíření alkaloidů.....	10
3.1.1	Alkaloidy isochinolinového typu.....	10
3.1.1.1	Benzyloisochinolinové alkaloidy.....	10
3.1.1.2	Aporfinové alkaloidy.....	11
3.1.1.3	Morfinanové alkaloidy.....	12
3.1.1.4	Benzo[c]fenanthridinové alkaloidy.....	13
3.1.1.5	Protoberberinové alkaloidy.....	15
3.1.1.6	Protopinové alkaloidy.....	16
3.2	<i>Chelidonium majus</i>	16
3.2.1	Botanický a farmakognostický popis.....	16
3.2.1.1	Taxonomické zařazení.....	16
3.2.1.2	Morfologický popis.....	17
3.2.1.3	Výskyt.....	18
3.2.1.4	Droga.....	18
3.2.1.5	Použití v lidovém léčitelství.....	19
3.2.1.6	Použití v homeopatii.....	19
3.2.1.7	Obsahové látky hlavní a vedlejší.....	19
3.2.2	Biologická aktivita.....	20
3.2.2.1	Antivirová aktivita.....	20
3.2.2.2	Antimikrobiální aktivita.....	21
3.2.2.3	Antifungální aktivita.....	22
3.2.2.4	Antitumorový účinek.....	22
3.2.2.5	Inhibiční účinek vůči AChE.....	23
3.2.2.6	Antioxidační účinek.....	23
3.2.2.7	Další účinky.....	24
3.3	Metody využití k izolaci alkaloidů z <i>Chelidonium majus</i>	24
3.3.1	Extrakce alkaloidů obsažených v <i>Chelidonium majus</i>	24
3.3.2	Analýza alkaloidů <i>Chelidonium majus</i>	25
3.4	Neurotropní aktivita.....	25
3.4.1	Látky působící na sympatický nervový systém.....	25
3.4.2	Látky působící na parasymptikus.....	28
3.4.3	Periferní myorelaxancia.....	30
3.4.4	Látky ovlivňující vegetativní ganglia.....	31
3.4.5	Psychostimulancia a další látky mající afinitu k centrální nervové soustavě....	32
3.4.6	Analgetika.....	33
3.4.7	Další látky působící na nervový systém.....	34
3.5	Alzheimerova choroba.....	34
3.5.1	Úvod.....	34
3.5.2	Makroskopické změny.....	35
3.5.3	Mikroskopické změny.....	35
3.5.4	Genetika.....	38
3.5.5	Příznaky AD.....	38
3.5.6	Diagnóza.....	39
3.5.7	Terapie.....	39
3.5.7.1	Farmakoterapie kognitivní.....	40
3.5.7.1.1	Prekurzory acetylcholinu.....	40
3.5.7.1.2	Inhibitory AChE.....	40

3.5.7.1.3	Agonisté muskarinových receptorů	41
3.5.7.1.4	Další terapeutické postupy.....	41
3.5.7.1.5	Nootropika	41
3.5.7.1.6	Ovlivnění dalších patogenetických činitelů.....	42
3.5.7.2	Nekognitivní terapie.....	42
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	44
4.1	Všeobecné postupy	45
4.1.1	Destilace a odpařování	45
4.1.2	Chromatografie.....	45
4.1.2.1	Chromatografie na tenké vrstvě	45
4.1.2.2	Sloupcová chromatografie	45
4.2	Materiál a vybavení	45
4.2.1	Rozpouštědla	45
4.2.2	Chemikálie	46
4.2.3	Chemikálie a materiál použité ke stanovení účinku erytrocytární AChE a sérové BuChE	46
4.2.4	Chemikálie a materiál ke stanovení antioxidační aktivity.....	47
4.2.5	Přístroje použité při stanovování biologických vlastností izolovaných látek	47
4.2.6	Detekční činidla.....	47
4.2.7	Chromatografické adsorbenty	47
4.2.8	Vyvíjecí soustava pro tenkovrstvou chromatografii	48
4.2.9	Vyvíjecí soustava pro preparativní tenkovrstvou chromatografii	48
4.3	Příprava a zpracování chloroformového výtřepku A z <i>Chelidonium majus</i>	48
4.4	Zpracování zbytku výtřepku <i>Chelidonium majus</i> chloridy nerozpustné v CHCl ₃ ...	48
4.5	Zpracování frakcí 26-9	50
4.6	Zpracování frakce 30-7	51
4.7	Určení struktury izolované látky	51
4.7.1	Měření hmotnostního spektra.....	51
4.7.2	Měření NMR spektra.....	52
4.7.3	Měření bodu tání	52
4.8	Stanovení inhibičního účinku alkaloidu na erytrocytární AChE a sérové BuChE ..	52
4.8.1	Podmínky měření	52
4.8.2	Příprava erytrocytárních pouzder	52
4.8.3	Stanovení hodnot IC ₅₀	53
4.9	Stanovení antioxidační aktivity získaných alkaloidů	53
5	VÝSLEDKY.....	54
5.1	Strukturní studie chelidoninu	55
5.1.1	MS studie chelidoninu.....	55
5.1.2	NMR studie chelidoninu	55
5.1.2.1	¹ H-NMR spektrum chelidoninu	55
5.1.2.2	¹³ C-NMR spektrum chelidoninu	56
5.2	Strukturní studie homochelidoninu	57
5.2.1	MS studie homochelidoninu.....	57
5.2.2	NMR studie homochelidoninu	57
5.2.2.1	¹ H-NMR spektrum homochelidoninu	58
5.2.2.2	¹³ C-NMR spektrum homochelidoninu	59
5.3	Inhibiční aktivita vůči erytrocytární AChE a sérové BuChE.....	64
5.4	Antioxidační aktivita alkaloidů	64
6	DISKUSE A ZÁVĚR	65
7	POUŽITÁ LITERATURA	68
8	SEZNAM ZKRATEK	73

1 ÚVOD

Již od pradávna se lidé zajímali o své okolí, jehož nedílnou součástí byla i příroda se svou rozmanitostí živočichů, rostlin i minerálů, které lákaly k poznání. To bylo i konec konců nutností, protože rozeznat jedovaté rostliny od chutných, bylo vskutku životně důležité. Toto primární poznání získávali prostí lidé (sběrači) často formou pokusu a omylu, někdy k otravě došlo pouze náhodou. Známým případem je hromadná otrava obyvatelstva po požití žita napadeného *Claviceps purpurea*¹. Postupem času se ze společnosti začali vydělovat odborníci na léčení, a tedy i léčivé přípravky, které byly často rostlinného původu². Důkazů o tom nalezneme nemálo. Známé je používání opia v Číně, *Ipecacuanhae radix* v Jižní Americe, nebo *Sennae folium* v Egyptě. Oblíbenými byly i tzv. všeléky jako je *Gelé royale* nebo *Ginseng radix*³. Jak asi všichni tušíme, léčilo se spíše tradičně bez znalosti obsahových látek. První izolace tehdy ještě ne zcela čistých látek přinesl až rozvoj chemie v klasickém období lékařství^{1,4}. Vědci neúnavně bádali, a tak dnes známe mnohé mechanismy účinku léčiv, mnohé však zůstává skryto.

Rozvoj výroby syntetických léčiv zatlačil tradiční přírodní prostředky mimo hlavní okruh zájmu. Dnes si však zachovávají ve vývoji nových léčiv své neocenitelné místo jako předlokové struktury, protože celé drogy obsahují balastní látky, které mohou způsobovat alergie. Vyskytuje se i vzájemně protichůdné působení jednotlivých biologicky aktivních látek z jedné rostliny. Jednou z nejdůležitějších skupin obsahových látek rostlin jsou alkaloidy, které jsou syntetizovány z aminokyselin, terpenoidů, steroidů a jiných dusíkatých látek. Jejich význam pro rostlinu zatím dosud neznáme, ale předpokládá se, že mají pravděpodobně chránit před škůdci⁵. Alkaloidy dělíme dle aminokyseliny, která se stala základním stavebním kamenem, do několika skupin⁶. Významné místo mezi nimi zaujímají isochinolinové alkaloidy. Vyskytují se v mnoha rostlinách (čeleď *Ranunculaceae*, *Papaveraceae*, *Berberidaceae*, *Fumariaceae*, ...) a mají široké spektrum účinků, ke kterým patří antioxidační, antivirová, antibakteriální, antifungální aktivita a aktivita vůči acetylcholinesteráze^{5,7-10}. Některé alkaloidy vykazují neurotropní účinky¹¹.

Bohužel nikdy nebudeme moci vyléčit všechny nemocné, protože nemocí stále přibývá, což můžeme přičítat jak objevu nových nemocí, tak i lepší diagnostice stávajících.

Se zvyšováním kvality života a jeho prodlužováním dochází ke stárnutí populace. Jedním z častých onemocnění seniorů jsou neurodegenerativní poruchy, kdy dochází k nedostatečné syntéze některého z neuromediátorů. Např. u Alzheimerovy choroby chybí acetylcholin. Inhibice enzymů způsobujících jeho odbourávání (acetylcholinesteráza a butyrylcholinesteráza) je jednou z možností, jak terapeuticky zasáhnout. V časných stádiích se používá galantamin, rivastigmin a donepezil. Tím se ale nemoc nevyléčí, jen se zpomalí její postup. Většina látek však vykazuje i periferní účinky, a to hlavně v oblasti gastrointestinálního traktu jako je nauzea, průjemy a zvracení. Kontraindikací pro podání léčiv tohoto typu jsou těžší převodní poruchy srdce a aktivní vředová gastroduodenální choroba. Při těžších formách nemoci je nutné působit již na NMDA-receptory např. prostřednictvím memantinu¹².

V několika studiích zabývajících se isochinolinovými alkaloidy bylo zjištěno, že sanguinarin a berberin vykazují obdobnou anticholinesterázovou aktivitu jako galantamin. Proto byly v tomto směru testovány i další isochinolinové alkaloidy v naději, že bude nalezena látka s ještě vyšší aktivitou¹³.

Chelidonium majus (čeleď *Papaveraceae*) obsahuje více než dvacet alkaloidů, z nichž většina je isochinolinového typu. Izolací některých alkaloidů a popsáním jejich biologických účinků se zabývá i tato práce.

2 CÍL PRÁCE

Cíle rigorózní práce byly stanoveny takto:

1. provést literární rešerši týkající se zastoupení alkaloidů v rostlinách z čeledi *Papaveraceae*, popsání metod jejich izolace, identifikace, biologické aktivity a využití v medicíně;
2. zpracovat druhou polovinu alkaloidního výtřepku z *Chelidonium majus*, chloridů nerozpustných v chloroformu, za účelem izolace zbývajících alkaloidů v čisté formě (první polovina byla použita v diplomové práci);
3. stanovit základní fyzikálně-chemické charakteristiky izolovaných alkaloidů;
4. připravit vzorky pro stanovení anticholinesterázové a antioxidační aktivity.

3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Původ a rozšíření alkaloidů

Alkaloidy jsou organické báze přírodního původu, v nichž je dusík vázán většinou v heterocyklickém kruhu¹⁴. Vyskytují se především v rostlinné říši, méně často je obsahují někteří živočichové (anabasein – mravenec *Aphaenogaster rudis*) nebo mikroorganismy (staurosporin – houba *Streptomyces staurosporeus*)¹⁵. Dodnes byly identifikovány asi ve čtyřech tisících rostlinných druzích, mohou se nalézat v různých orgánech rostliny (kořeny, plody, listy) a jejich obsah se během vegetačního období mění. Svůj název dostaly dle bazického charakteru. Mají proto schopnost tvořit ve vodě rozpustné soli s organickými kyselinami, které se přirozeně vyskytují v organismech, např. šťavelovou, octovou, mléčnou, jablečnou⁶.

Podle struktury se dělí do několika skupin dle aminokyseliny, která poskytuje dusík i základ kostry alkaloidu. Například z tyrosinu vznikají fenylethylaminy, jednoduché tetraisochinolinové alkaloidy a další. Mezi alkaloidy řadíme tradičně i některé sloučeniny, jejichž dusík není vázán heterocyklicky (kapsaicin) nebo nemají bazický charakter (theobromin). I v malém množství jsou alkaloidy biologicky silně účinné látky. Alkaloidy dostávají často názvy podle rostliny, z které byly izolovány. Na alkaloidy jsou bohaté např. čeledi *Fumariaceae*, *Papaveraceae*, *Berberidaceae*, které obsahují isochinolinové alkaloidy^{3,16}.

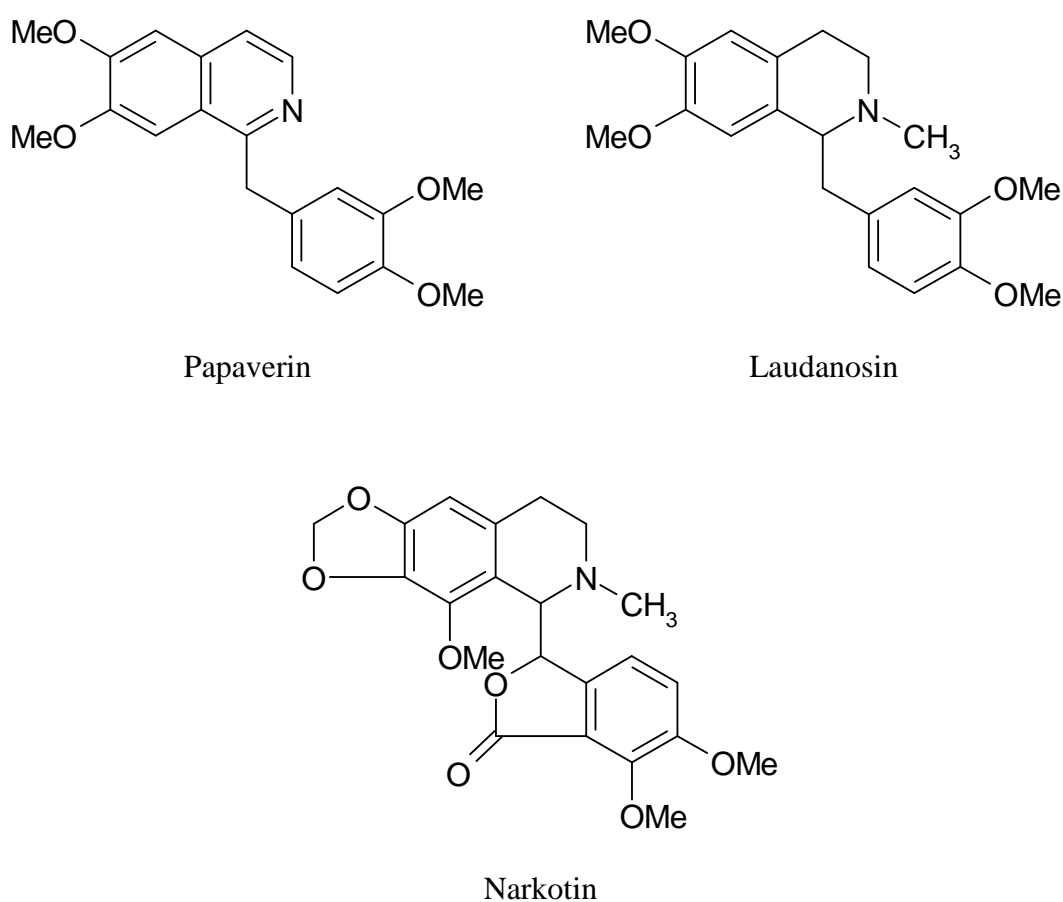
3.1.1 Alkaloidy isochinolinového typu

Do této skupiny řadíme sekundární metabolity, které vznikají z aminokyseliny tyrosinu. V přírodě jsou tyto alkaloidy rozšířeny v několika čeledích, a to např. *Rutaceae*, *Menispermaceae*, *Papaveraceae*, atd. Dle základního skeletu je řadíme do několika skupin, z nichž ty základní jsou zmíněny podrobněji^{3,6}.

3.1.1.1 Benzylisochinolinové alkaloidy

Benzylisochinolinové alkaloidy jsou syntetizovány z tyrosinu přes retikulin v čeledích *Magnoliaceae*, *Ranunculaceae*, *Berberidaceae*, *Papaveraceae* a dalších¹⁶. Mají

slabě bazický charakter. Jedním z významných zástupců této skupiny je **papaverin** (matečná rostlina *Papaver somniferum*), který byl poprvé izolován v roce 1848¹⁴. Tento alkaloid se vyznačuje přímým spasmolytickým účinkem na hladké svalstvo dýchacího, trávicího a urogenitálního traktu, a proto se terapeuticky používá při různých kolikách¹⁷. Mimo jiných do této skupiny řadíme i **laudanisin** a **laudanidin**, které naopak vyvolávají křečové stavy, a **narkotin**³. Vzorce některých alkaloidů této skupiny jsou uvedeny na následujícím obrázku (Obr. 1).

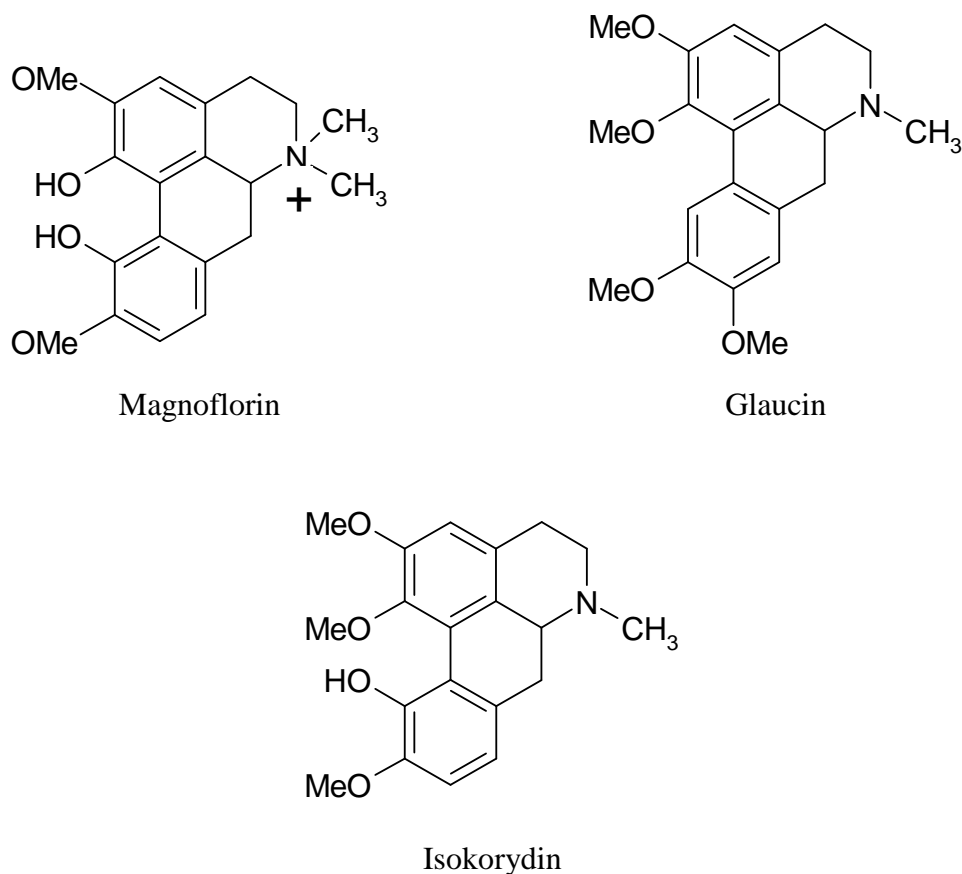


Obr. 1: Benzylisochinolinové alkaloidy

3.1.1.2 Aporfinové alkaloidy

Čeledi *Fumariaceae*, *Lauraceae*, *Menispermaceae* a v neposlední řadě *Papaveraceae* jsou zdrojem aporfinových alkaloidů. Nejvýznamnějším z nich je **magnoflorin**, který můžeme nalézt v rodu *Mahonia*, *Berberis*, *Chelidonium*, *Aquilegia*, *Glaucinum*¹⁸. V 70. letech byl Slavíkem izolován z kořene *Chelidonium majus*¹⁹.

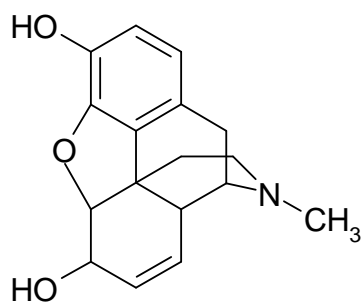
Do této skupiny patří rovněž **glaucin** a **isokorydin**, které se nachází v *Glaucinum*¹⁸. Vzorce alkaloidů této skupiny jsou uvedeny na následujícím obrázku (Obr. 2).



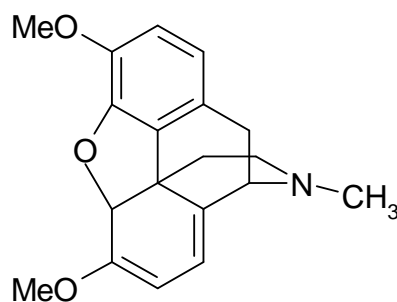
Obr. 2: Aporfinové alkaloidy

3.1.1.3 Morfinanové alkaloidy

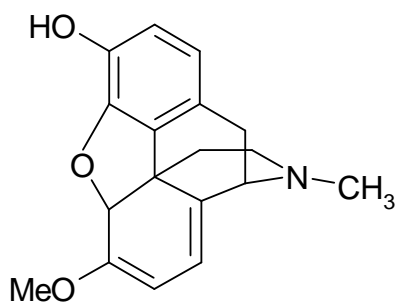
Tyto alkaloidy jsou základní účinnou složkou opia, které je už od starověku využíváno pro svůj analgetický účinek. Nachází se v rozličných druzích rodu *Papaver*³. Nejvýznamnějším alkaloidem této skupiny je **morfin** (nejvyšší obsah v *Papaver somniferum*) a **kodein**, který nachází hojně využití jako antitusikum. Částečně se metabolizuje na morfin, takže má i mírné analgetické účinky²⁰. Do této skupiny rovněž patří oripavin a thebain³ (Obr. 3).



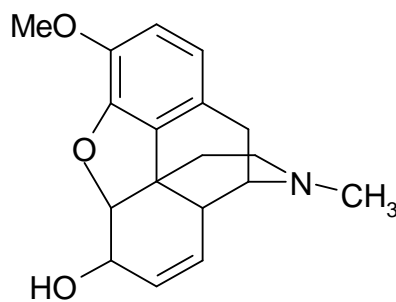
Morfin



Thebain



Oripavin



Kodein

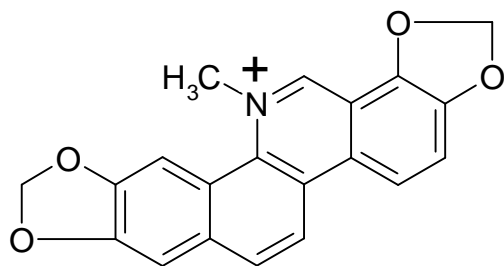
Obr. 3: Morfinanové alkaloidy

3.1.1.4 Benzo[*c*]fenanthridinové alkaloidy

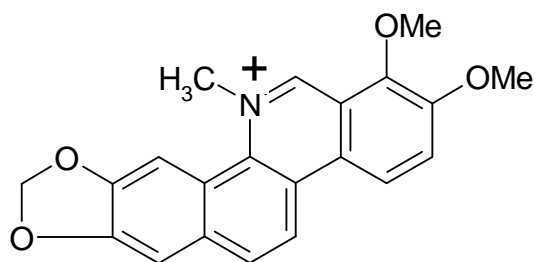
Tyto alkaloidy jsou důležitým taxonomickým rysem čeledi *Papaveraceae*. Jejich hlavními zdroji jsou *Chelidonium majus*, *Sanguinaria canadensis*, *Escholtzia californica*, *Macleya cordata*, *Macleya microcarpa*⁵.

Nejbohatším zdrojem **sanguinarinu**, který poprvé izoloval James Dana v roce 1827¹⁶, je severoamerická bylina *Sanguinaria canadensis*. Tuto bylinu ronící červený latex používali indiáni k léčbě zánětů dásní¹⁶. **Chelidonin** jako jeden z hlavních obsahových alkaloidů *Chelidonium majus* byl objeven v roce 1924 Godefroyem a v čisté formě byl izolován o 14 let později Poxem a Prostem²¹. Působí spasmolyticky na gastrointestinální soustavu, stěny cév, bronchů, uretry, dělohy. Kromě toho potencuje účinek hypnotik, snižuje spontánní motorickou aktivitu a vykazuje cholagogní a choleretický účinek. **Chelerytrin** izoloval v roce 1839 Probst, a to z kořene *Ch. majus*²¹. Až téměř o dvacet let později se podařilo Slavíkovi, přednímu českému vědci, izolovat **chelilutin** a **chelirubin**. Pojmenovány byly podle svých intenzivně zbarvených solí a matečné rostliny. Z kořene *Macleya*

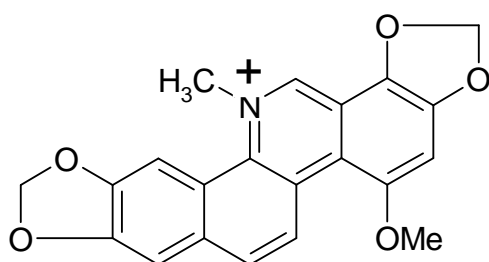
microcarpa rovněž získal další alkaloid – **makarpin**. Homochelidonin byl společně s chelaminem a chelamidinem nalezen v kořeni *Chelidonium majus*. O izolaci dalších alkaloidů (**dihydrochelirubin**, **dihydrosanguinarin**, **dihydrochelerytrin**) z *Ch. majus* se též zasloužil Slavík v polovině 70. let 20. století^{16,21}. Struktury zmíněných alkaloidů jsou zobrazeny na následujícím obrázku (Obr. 4).



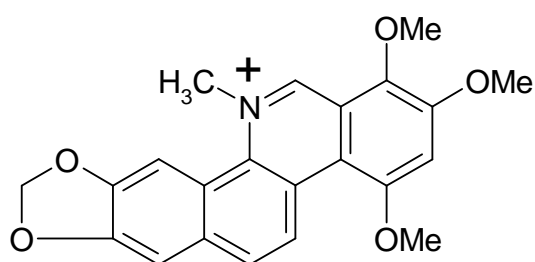
Sanguinarin



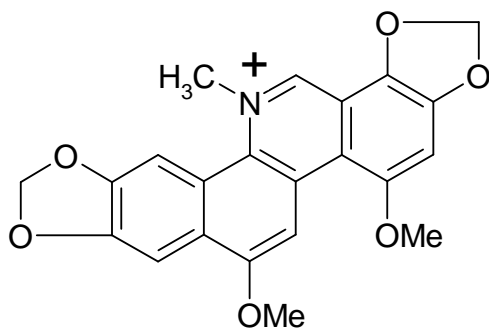
Chelerytrin



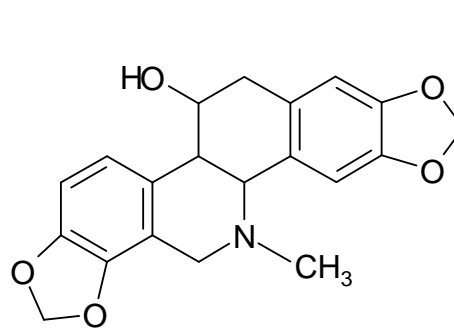
Chelirubin



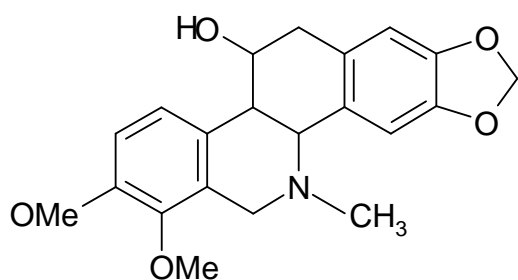
Chelilutin



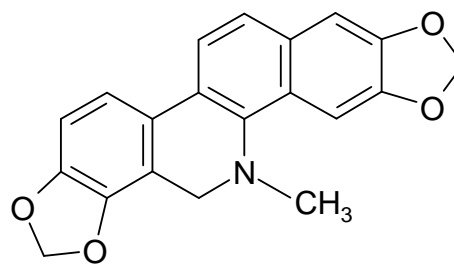
Makarpin



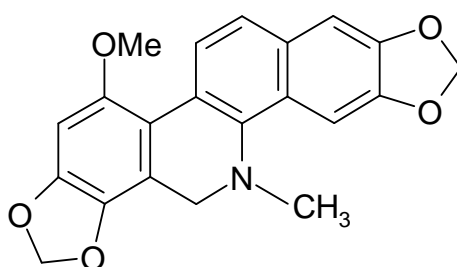
Chelidonin



Homochelidonin



Dihydrosanguinarin

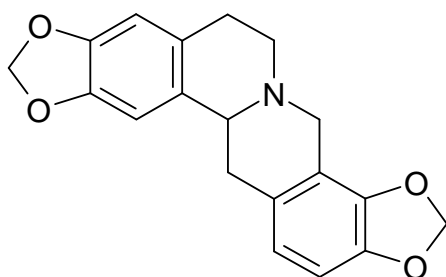


Dihydrochelirubin

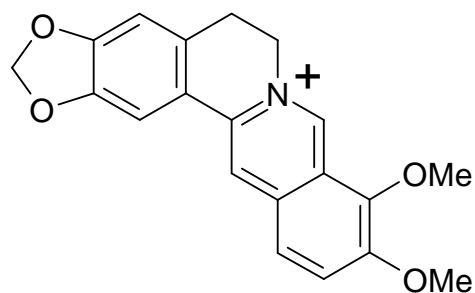
Obr. 4: Benzo[c]fenanthridinové alkaloidy

3.1.1.5 Protoberberinové alkaloidy

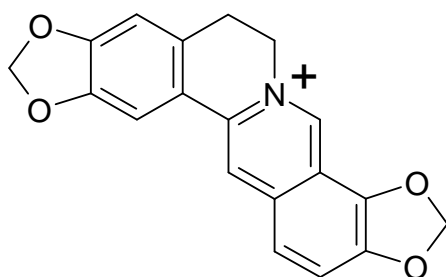
Mezi protoberberinové alkaloidy řadíme **stylopin**, který se nachází v kořeni i nati *Chelidonium majus*. Jeho obsah však během vegetačního období klesá. Zajímavých výsledků dosáhl v polovině 90. let vědecký tým Masarykovy univerzity Brno, kdy dokázali, že **koptisin** se po celé vegetační období nachází ve velké míře v nati *Chelidonium majus*. Do této skupiny rovněž patří **berberin**, jehož významným zdrojem je rod *Berberis*, **korysamin** a **metylstylopin**²² (Obr. 5).



Stylopin



Berberin

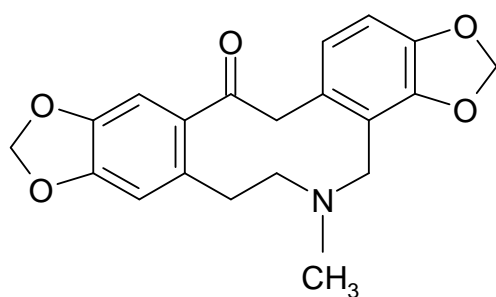


Koptisin

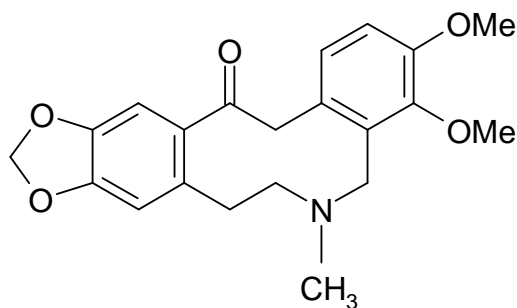
Obr. 5: Protoberberinové alkaloidy

3.1.1.6 Protopinové alkaloidy

Protopin a **allokryptopin** byly poprvé izolovány na přelomu 19. a 20. století. Nalézt je můžeme v celé rostlině *Ch. majus*, kořeny jsou však bohatším zdrojem. Izolovány byly dále v rodě *Escholtzia*, *Glaucinum* a *Papaver*²¹. Struktury těchto alkaloidů jsou znázorněny na následujícím obrázku (Obr. 6).



Protopin



Allokryptopin

Obr. 6: Protopinové alkaloidy

3.2 *Chelidonium majus*

3.2.1 Botanický a farmakognostický popis

3.2.1.1 Taxonomické zařazení

Říše: *Plantae* (rostliny)

Podříše: *Tracheobionta* (cévnaté rostliny)

Nadoddělení: *Spermatophyta* (semenné rostliny)

Oddělení: *Magnoliophyta (krytosemenné rostliny)*
Třída: *Rosopsida (dvouděložné rostliny)*
Řád: *Papaverales (mákotvaré)*
Čeleď: *Papaveraceae (mákovité)*
Rod a druh: *Chelidonium majus (vlaštovičník větší)*

3.2.1.2 Morfologický popis

Tato vytrvalá bylina dorůstající výšky 1 m má válcovitý asi 1 cm silný oddenek. Větvitá, plstnatá lodyha nese střídavé, lyrovitě peřenosečné listy na líci světle zelené a lysé, na rubu modrozelené mírně chlupaté, dolní jsou dlouze řapíkaté, horní krátce. Kalich je žlutý, prchavý, má čtyři korunní lupeny. Květ je oboupohlavný. Plodem je tobolka otvírající se chlopněmi. Rostlinou procházejí mléčnice obsahující oranžově zbarvenou mléčnou šťávu, nepříjemného zápachu a hořké chuti. Kvete od května do září^{23,24}.



Obr. 7: *Chelidonium majus*²⁵

3.2.1.3 Výskyt

Roste hojně v křovinách, hájích i na rumišťích od nížin až do podhůří po celé Evropě, Asii i Severní Americe^{24,26}.

3.2.1.4 Droga

Lékopisnou surovinou je *Chelidonii herba*, separandum. Používá se též sušený kořen *Chelidonii radix*. Pro obsah proteolytických enzymů je sbírána i čerstvá nať *Chelidonii herba recens*³.

3.2.1.5 Použití v lidovém léčitelství

Vlaštovičnick větší byl tradičně používán už ve starověku. Čerstvá šťáva se díky proteolytickým enzymům, které umožní průnik cytostaticky působících alkaloidů, používá na bradavice. K léčbě rakoviny, především karcinomu kůže, lupénky, mozolů, spálenin, omrzlin je často doporučována přírodními léčiteli. Ve formě tinktury se podává při zánětu žaludku, jaterních chorobách, kde je nositelem účinku chelidonin^{24,27}. Protože se však jedná o drogu silně působící až toxickou, není pro vnitřní užití v samoléčení moc vhodná. Koupele jsou účinné při plísňích nohou²⁸. Bylinu lze použít samostatně i ve směsi. V urologii se používá pro schopnost mírnit bolesti ovlivněním kontrakcí hladké svaloviny²⁹.

3.2.1.6 Použití v homeopatii

Své místo má vlaštovičnick i v homeopatické léčbě, která dle svého základního principu léčí podobné podobným³⁰. Tedy jestliže po intoxikaci vlaštovičnickem dojde po fázi nevýznamné gastroenteritidy k toxické hepatitidě s degenerací hepatocytů, cholestázou, nadprodukcí indolu (na který nás upozorní dech intoxikovaného) a depresi centrální nervové soustavy, která se projevuje ospalostí, můžeme vlaštovičnick ve vysokém ředění a po tzv. potenciaci, použít na léčbu obdobných příznaků³¹.

Chelidonium majus v příslušném ředění je proto indikováno při chorobách jater a žlučovýchodů. Při ikteru způsobeném cholestázou se podává 5 granulí 5 CH 2krát denně, stejně se podává i při virové hepatitidě s cholestázou doplňkově k léku Phosphorus. 20 kapek 3 DH 2krát denně se používá při zácpě a světlé stolici. V případě žlučové koliky úlevu přináší 5 granulí 9 CH každé 2-3 hodiny nebo 15 CH jako doplněk k již předepsaným spasmolytikům³¹.

3.2.1.7 Obsahové látky hlavní a vedlejší

V celé rostlině se nachází asi 30 alkaloidů převážně isochinolinového typu. O izolaci a následnou identifikaci poloviny z nich se zasloužil český vědec Jiří Slavík. Vyšší zastoupení je v kořeni, během vegetačního období obsah kolísá. Nejméně jich je v době květu, nejvíce na podzim²². Jejich přehled je uveden v předešlé kapitole 3.1.1.

V menší míře nalezneme ve vlašovičníku i flavonoidy (rutin, kvercetrin), fenolické kyseliny (deriváty kyseliny skořicové), alkaloid spartein, karotenoidy, histamin, tyramin, proteolytické enzymy^{21,22}.

3.2.2 Biologická aktivita

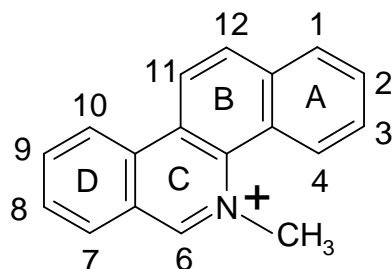
O léčebném využití *Chelidonium majus* se ví už dlouho. Objev nových účinků (radioprotektivita, ochrana hepatocytů), chemie a biogeneze alkaloidů je předmětem mnoha publikací. Nositel široké škály biologických účinků, mezi které patří antivirová, antimikrobiální, anifungální, antitumorová, antioxidační aktivita, inhibiční účinek vůči acetylcholinesteráze (AChE), jsou především alkaloidy⁷⁻¹⁰. Aktivita je ovlivněna planaritou aromatického kruhu³².

3.2.2.1 Antivirová aktivita

Colombo a Bosisio (1996) se zabývali ve své práci o farmakologické aktivitě *Chelidonium majus* také účinkem jeho extraktu proti chřipkovému viru *in vitro* i *in vivo*. Antivirové vlastnosti extraktu z celé rostliny byly pozorovány na DNA herpetického viru a RNA polioviru. V prvním testu alkaloidní extrakt vykazoval antivirovou aktivitu proti lidskému adenoviru typu 5 a 12 i proti *Herpes simplex virus*. V testu na druhý typ virových částic byly testovány protoberberinové a benzofenanthridinové alkaloidy na inhibici vůči reverzní transkriptáze RNA nádorových virů.

Benzofenanthridinové sloučeniny, které jsou nejlepšími inhibitory reverzní transkriptázy, mají fenolickou nebo methoxy- skupinu na C8 a C9 uprostřed kruhu. Nasycení tohoto kruhu má za následek značnou ztrátu inhibice. Odchylka od tohoto vzoru snižuje aktivitu. Za účelem stability alkaloidu před enzymy je prokazatelně důležitá přítomnost kvartérního dusíku v molekule a je dobrá korelace mezi inhibicí reverzní transkriptázy (RT) a antileukemickou aktivitou. U sloučenin, kterým chybí kvartérní dusík jako u chelidoninu, byla nalezena slabá aktivita ($IC_{50} = 200 \mu\text{g/ml}$) vůči RNA tumorovému viru⁸.

Protoberberinové alkaloidy jsou slabšími inhibitory. Zavedení methoxy- skupiny do polohy 2 a 3 kruhu A (bez ohledu na tyto skupiny v poloze 9 a 10 nebo 10 a 11 kruhu D) je základní podmínkou pro inhibiční účinek alkaloidů³³.



Obr. 8: Obecný vzorec (náznak kruhů A, B, C, D)⁵

3.2.2.2 Antimikrobiální aktivita

Chelerytrin a kvartérní benzofenanthridinové frakce byly testovány na jejich antibakteriální aktivitu. Chelerytrin byl neúčinný na Gram-negativní kmeny *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*. Antimikrobiální účinek byl významný na Gram-pozitivní bakterie. Nízká akutní toxicita (chelerythrin 95 µg/kg a sanguinarin 102 µg/kg) naznačuje, že tyto alkaloidy mohou být využity jako farmakoterapeutický alternativy ve stomatologii pro léčbu paradentózy, a to ve formě vodného roztoku sanguinarin chloridu 0,3% vykazujícího protiplakový účinek. Sanguinarin a chelerythrin byly účinné při kontrole produkce těkavých sirných sloučenin odpovědných za maldor. Pseudoalkoholáty obou alkaloidů mají vyšší intercelulární penetraci než polární benzofenanthridiny samotné a jsou aktivní proti *Staphylococcus aureus*, *E. coli*, *Salmonella gallinarum*, *Klebsiella pneumoniae*, *Mycobacterium smegmatis*.

Berberin byl úspěšně použit ke kontrole zvýšené střevní sekrece zapříčiněné toxinem *E. coli*, efekt byl závislý na dávce. Kvartérní amoniová skupina je nezbytná pro antibakteriální účinek berberinu⁸.

3.2.2.3 Antifungální aktivita

Frakce obsahující chelerythrin a kvartérní benzofenanthridiny vykazují antifungální účinek na některé kmeny *Trichophyton*, *Microsporum canis*, *Epidermophyton floccosum* a *Aspergillus fumigatus*. Testované alkaloidy měly silnou antifungální aktivitu na dermatofyty, zvláště na antropofilní a zoofilní kmeny³⁴. Vulkusin a kol. (1991) testovali aktivitu ethanolického extraktu *Chelidonium majus* shromážděného z různých období a ontogenetických cyklů rostliny. Byly použity různé kmeny druhu *Candida* a dermatofyt. Výsledky antimykotické aktivity, naznačovaly, že ethanolický extrakt *Ch. majus* sbíraný v září měl nejvyšší aktivitu⁸.

Berberin v koncentraci 10-25 µg/ml inhiboval více různých druhů hub: *Alternaria*, *Aspergillus flavus*, *A. fumigatus*, *Candida albicans*, *Curvularia*, *Drechslera*, *Fusarium*, *Mucor*, *Penicillium*, *Rhizopus oryzae* a *Scopulariopsis*⁸.

3.2.2.4 Antitumorový účinek

Protirakovinného účinku vlaštovičníku se využívalo již po staletí v tradičních galenických přípravcích. V testech Caolo a Stermitz (1975) prokázali, že antitumorový účinek benzofenanthridinových alkaloidů závisí na pH, Ishii a kol. (1985), že iminiová skupina zvyšuje aktivitu⁸.

Za účelem posílení antineoplastických účinků chelidoninu byly syntetizovány jeho deriváty, které byly následně otestovány *in vitro* i *in vivo*⁸. Zajímavých výsledků bylo dosaženo u triaziridinu ukrainu (generický název pro semisyntetickou sloučeninu obsahující chelidonin konjugovaný s třemi molekulami thiofosforečné kyseliny), tento produkt byl shledán netoxickým imunostimulantem, který indukuje produkci na thymu závislých T-lymfocytů, čehož bylo využito při klinickém hodnocení účinku u pacientů postižených karcinomem. Ukrain byl aplikován jako intravenózní injekce každé 3 dny, léčbu tvořilo 10 podání po 10 mg. Došlo ke zvýšení celkového počtu T-buněk a T-pomocných lymfocytů, poklesu T-supresorových buněk a normalizaci poměru „helperů“ a „supresorů“. Ukrain také efektivně modifikuje biologickou odpověď přímou aktivací lytického mechanismu imunitních efektorových buněk (dovede zvýšit lytickou aktivitu lymfocytů ze sleziny až na 48krát).

Předpokládá se, že antileukemická aktivita cytotoxických protoberberinových alkaloidů může souviset se strukturální konformací molekuly a jejími vazbnými vlastnostmi na DNA. Biologický účinek sanguinarinu je pravděpodobně dán vytvořením komplexu s DNA. Sanguinarin má dvě formy: kationická je kompletně a neutrální jen částečně vmezeřena do dvojité šroubovice DNA. Výsledky chelerytrinu se lišily od sanguinarinu, což naznačuje sterickou hydrataci substituentů na kruhu D. Optickými metodami byly u berberinu prokázány interakce s nukleovými kyselinami⁸.

Dále byly provedeny testy na buňkách Ehrlichova karcinomu, sarkomu 180 a HeLa buňkách na antitumorový účinek chelidoninu a protopinu, jejichž výsledkem bylo, že oba alkaloidy mají v terapeutických dávkách slabý antitumorový účinek^{8,35}.

3.2.2.5 Inhibiční účinek vůči AChE

Byla provedena srovnávací studie na inhibiční aktivity berberinu, sanguinarinu a chelidoninu vůči lidské erytrocytární acetylcholinesteráze a sérové butyrylcholinesteráze. Studované alkaloidy vykazaly silnou reverzibilní inhibiční aktivitu vůči cholinesteráze. Byl určen typ inhibice a vypočteny inhibiční konstanty. Je dokázáno, že charakter inhibice je identický pro obě cholinesterázy. Berberin a sanguinarin jsou kompetitivně-nekompetitivní inhibitory, zatímco chelidonin je kompetitivní inhibitor¹⁰.

Korábečný a kol. (2010) zjišťoval, zda je hydrochlorid *N*-alkyl-7-methoxytacrinu (7-MEOTA) možno použít jako potenciálního inhibitoru cholinesterázy při Alzheimerově chorobě, testy probíhaly *in vitro*. Testy probíhaly na rekombinantní lidské AChE a plazmatické BuChE. Byly syntetizovány různé deriváty, z nichž tři nové sloučeniny vykazaly nadějně výsledky inhibice AChE, které byly lepší než u takrinu nebo 7-MEOTA. Tři sloučeniny se ukázaly jako silné inhibitory HuBuChE. Studie závislosti struktury na aktivitě zdůraznila význam *N*-alkyl řetězců o délce 6 až 7 uhlíků pro inhibici cholinesterázy³⁶.

3.2.2.6 Antioxidační účinek

Hu a Wang (2009) ve své studii testovali antioxidační aktivitu extraktu vlašovičnicku. Vlastnosti methanolického extraktu byly testovány pomocí různých *in vitro*

systémů, zahrnujících testy ochrany DNA před poškozením, DPPH-test, chelatace kovů, test redukční síly. Testovaný extrakt vykazoval silnější antioxidační aktivitu ($IC_{50} = 7,92 \mu\text{g/mL}$) proti hydroxylovému radikálu ve fentonovém systému než butyl-hydroxyanisol ($IC_{50} = 51,46 \mu\text{g/mL}$) a α -tokoferol ($IC_{50} = 67,48 \mu\text{g/mL}$). Podobně bylo dosaženo ochrany před poškození plazmidu pBR vyvolané hydroxylovým radikálem, a to extraktem o koncentraci $400 \mu\text{g/mL}$. Také bylo zkoumáno buněčné dělení a indukce apoptózy, a to v buněčném proliferačním testu, průtokovou cytometrií a expresní analýzou mRNA. Výsledkem je, že extrakt významně inhibuje růst buněk HT-29 v závislosti na koncentraci a čase, se zvyšujícími se oběma hodnotami se zvyšuje apoptóza buněk a exprese kaspázy-3. Celkově tato studie ukazuje, že vlašovičník má antioxidační a antiproliferativní vlastnosti⁷.

3.2.2.7 Další účinky

Zajímavou studii zveřejnil korejský kolektiv vědců v roce 2003, kdy zjistili, že extrakt z *Ch. majus* má ochranný účinek před radiačním zářením, a to stimulací imunitních buněk, čehož by se dalo využít při léčbě rakoviny³⁷.

Chelidonium majus 30 CH a 200 CH snížilo hepatotoxicitu u myší po podání *p*-dimethylazobenzenu³⁸.

3.3 Metody využití k izolaci alkaloidů z *Chelidonium majus*

3.3.1 Extrakce alkaloidů obsažených v *Chelidonium majus*

Při extrakci alkaloidů z této rostliny se používají nadzemní i podzemní části rostliny, nejčastěji kořen nebo nať. Řezaná, drcená nebo prášková droga je podrobena extrakci s organickými nebo anorganickými rozpouštědly (např. voda, kyselina sírová, kyselina chlorovodíková, ethanol)²¹.

Pro extrakci se běžně využíval Soxhletův přístroj. Od této metody se ale v dnešní době již upouští, protože vzniká nebezpečí artefaktů nebo rozkladu drogy z důvodu, že extrakt se po celou dobu zahřívá. Proto je vhodnější perkolace, kterou lze provádět za běžné teploty. Při jejím použití však musíme počítat nejen s časovou náročností, ale i vyšší spotřebou rozpouštědla.

Extrakci je možné provést i macerací za studena, kdy se droga po přelití rozpouštědlem nechává macerovat za pokojové teploty. Další možností je macerace za horka. Probíhá stejně, jen s tím rozdílem, že je macerovaná droga i s rozpouštědlem zahřívána na vodní lázni⁵.

3.3.2 Analýza alkaloidů *Chelidonium majus*

Pro analýzu alkaloidů nacházejících se v *Chelidonium majus* lze využít několik různých metod, mezi které řadíme materiálně a časově méně náročnou tenkovrstvou chromatografií (TLC), velice přesnou metodu – vysokoúčinnou chromatografií na tenké vrstvě (HPTLC) a vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC), nebo již přístrojově náročnou plynovou chromatografií s hmotnostní spektrometrií (GC/MS) a kapilární elektroforézu (CE)⁴.

3.4 Neurotropní aktivita

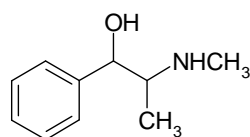
Za neurotropně aktivní považujeme látky mající afinitu k nervové tkáni¹¹. Do této skupiny patří mnoho sloučenin, od jednoduchých anorganických (oxid dusný) až po složité organické, přírodního i syntetického původu^{11,39}. My se budeme zabývat látkami přírodního původu, a to skupinou alkaloidů. Vhodná doba sběru rostlin pro obsah alkaloidů je obecně při zvětšování a vakuolizaci buněk. Tvorba alkaloidů se snižuje až zastavuje na počátku kvetení²².

3.4.1 Látky působící na sympatický nervový systém

Sympatikus je součástí vegetativního nervového systému. Účastní se prostřednictvím neurotransmiterů regulace vnitřních orgánů (srdce, bronchy, zornice oka, periferní cévní řečiště), a tím pomáhá udržet homeostázu organismu. Jeho aktivace způsobí kaskádu stresové reakce (útěk, boj), dlouhodobá stimulace však vede k patofyziologickým stavům (např. hypertenze)²⁰.

Efedrin

Poprvé ho izoloval v roce 1887 K. K. Chen z dvoudomého keře *Ephedra sinica*³. Efedrin působí přímo na α i β receptory, a to prakticky stejně intenzivně⁴⁰. Zároveň stimuluje mozkovou kůru, podkorové oblasti a působí nepřímo psychostimulačně uvolněním noradrenalinu z nervových zakončení. Pro jeho širokou škálu účinků ho můžeme zařadit do více farmakoterapeutických skupin. Dříve se používal ke snížení frekvence záchvatů při astma bronchiale. Dnes nachází uplatnění jako centrální stimulans při narkolepsii, krátkodobě je podáván při reverzibilní obstrukci dýchacích cest v kombinaci s antitusiky nebo jako analeptikum²⁰.



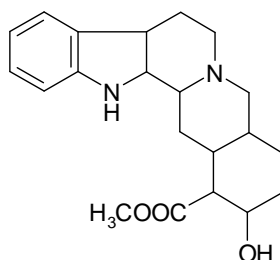
Obr. 9: Efedrin

Námelové alkaloidy

Tyto deriváty kyseliny lysergové pocházející ze sklerocia *Claviceps purpurea* a jsou odvozeny od tryptofanu a kyseliny mevalonové. Dle charakteru amidové části molekuly (a s tím související rozpustností ve vodě) je dělíme do dvou skupin. První skupinu zastupuje **ergometrin**, jehož báze jsou rozpustné ve vodě. Druhou skupinu tvoří alkaloidy, u nichž je kyselina lysergová vázána amidickou vazbou na peptidový zbytek. Dle charakteru aminokyselin, které peptidický zbytek tvoří, se dále dělí na skupinu ergotaminovou (**ergotamin**, **ergosin**) a ergotoxinovou (**ergokristin**, **ergokryptin**, **ergokornin**). Mimo neselektivní α -sympatolytické aktivity vykazují námelové alkaloidy i uterotonické účinky (ergometrin), ovlivňují receptory pro serotonin a dopamin, nachází uplatnění i jako antimigrenika (ergotamin)^{3,20}.

Yohimbin

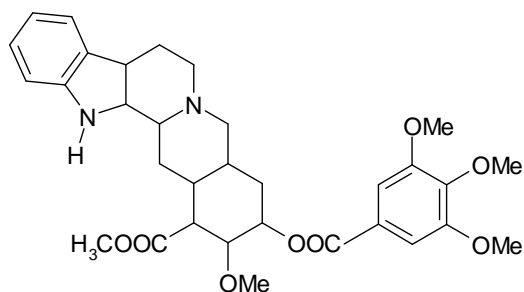
Kůra stromu *Pausinistalia yohimbe*, jejíž hlavní účinnou složkou je yohimbin, byla odedávna používána při mužské impotenci³. Nové výzkumy však stimulaci sexuálních funkcí u člověka spolehlivě neprokázaly. Yohimbin vyvolává vasodilataci v pánevní oblasti, blokádu α_2 -receptorů dochází k tachykardii a zvýšení krevního tlaku²⁰.



Obr. 10: Yohimbin

Reserpin

Rauwolfia serpentina, keř nebo strom rostoucí v tropických oblastech, byla tradičně používána při obřadech starých Inků i v indické medicíně³. Reserpin se váže na transportní proteiny vezikulární membrány a blokuje vstup katecholaminových a jiných aminů do vezikul. Aminy, které nejsou přijaty do vezikul, rozloží monoaminoxidáza, čímž se sníží celkový obsah monoaminů schopných nervového přenosu. K obnovení funkce je nutná syntéza nových membrán. Nežádoucím účinkem při použití reserpinu jako antihypertenziva jsou mimo jiné deprese^{20,41}.



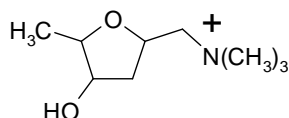
Obr. 11: Reserpin

3.4.2 Látky působící na parasimpatikus

Parasimpatikus je druhou částí vegetativního periferního nervového systému. Jeho činností je navozen klidový stav (snížená činnost srdce, dýchacího systému), ale v gastrointestinální soustavě (GIT) převládají anabolické reakce (syntéza a ukládání energie). Hlavním neurotransmiterem je acetylcholin²⁰.

Muskarin

Amanita muscaria je nejčastějším zdrojem muskarinu, který obsahuje kvartérní dusík, díky němuž působí na receptory na periferních efektorových buňkách parasimpatiku. Význam muskarinu v medicíně je jen toxikologický, protože se zneužívá jako halucinogen^{3,20}.

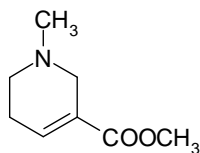


Obr. 12: Muskarin

Arekolin

Tento alkaloid je obsažen v semenech palmy *Areca catechu*³. Díky terciárnímu dusíku prochází hematoencefalickou bariérou a na CNS působí stimulačně. Arekolin stimuluje potní a slinné žlázy, a to prostřednictvím M- i cholinergních N-receptorů⁴¹.

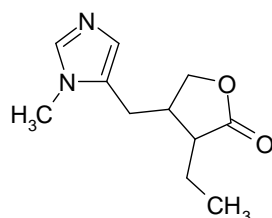
Čerstvé arekové semeno spolu s listy pepřovníku betelového a dalšími přísadami slouží k přípravě betelu. Tato droga, která se žvýká, má povzbudivé účinky, rizikem je však vznik karcinomu v dutině ústní³.



Obr. 13: Arekolin

Pilokarpin

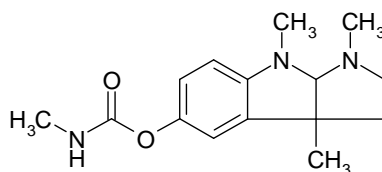
Jihoamerické stromy nebo keře *Pilocarpus microphyllus*, *P. jaborandi* a další druhy poskytují drogu *Jaborandi folium*, jejíž hlavní účinnou složkou je pilokarpin. Při skladování ale obsah alkaloidů rychle klesá³. Pilokarpin řadíme mezi parciální agonisty M-receptorů. Obsahuje terciární dusík, a proto prochází hematoencefalickou bariérou a na CNS působí stimulačně, dobře se resorbuje z GIT i lokálně z oka, zvyšuje žláзовou sekreci – pocení, salivaci, sekreci slz, bronchů, žaludku. Používá se v očním lékařství k vyvolání miózy a snížení nitroočního tlaku při glaukomu^{20,41}.



Obr. 14: Pilokarpin

Fysostigmin

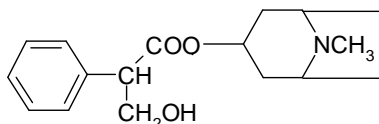
Semeno liány *Physostigma venenosum* sloužilo k tzv. božím soudům³. Fysostigmin v něm obsažený díky terciárnímu dusíku dobře prochází membránami⁴⁰. Používá se jako kognitivum, k blokování anticholinergního syndromu navozeného některými léčivými, snižuje účinek nepolarizujících myorelaxancií, ale prohlubuje a prodlužuje účinek depolarizujících myorelaxancií, dále ho lze využít jako nespecifické antidotum u přetrvávající sedace nebo neklidu po celkové anestézii, je lékem první volby u glaukomu s uzavřeným úhlem, také miotikum. Zajímavostí je mast s obsahem 0,025% fysostigminu, která se používá při pedikulóze řas a obočí^{20,41}.



Obr. 15: Fysostigmin

Atropin

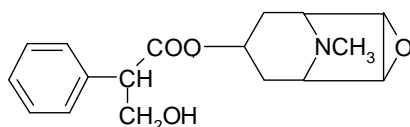
Tento alkaloid je obsažen v několika rostlinách čeledi *Solanaceae*, z nichž můžeme jmenovat dva významné zástupce: *Atropa belladonna* a *Datura stramonium*³. Terciární dusík zajišťuje dobrou resorpci a průchod přes hematoencefalickou bariéru (HEB). Je řazen mezi nesektní parasymptolytika, působí na M-receptorech, ale na N- receptorech v terapeutických dávkách ne. Používá se při bradyarytmii, v premedikaci před celkovou anestézií, při intoxikaci inhibitory AChE, jako spasmolytikum GIT a močových cest, má dlouhý mydriatický účinek, vysoké dávky způsobují halucinace až smrt²⁰.



Obr. 16: Atropin

Skopolamin

Skopolamin se mimo jiné nachází v rostlině rozšířené v Evropě i Asii – *Hyoscyamus niger*³. Již v malých dávkách tento alkaloid vyvolává útlum centrální nervové soustavy, používá se ve stejných indikacích jako atropin, navíc i jako antiemetikum – k prevenci kinetózy ve formě podávané perorálně, v čípcích nebo náplastech. Vysoké dávky způsobují halucinace²⁰.



Obr. 17: Skopolamin

3.4.3 Periferní myorelaxancia

Mezi periferní myorelaxancia řadíme látky blokuující stahy kosterních svalů zásahem do procesů nervosvalového přenosu, čímž vyvolají relaxaci kosterních svalů²⁰.

Toxiferin a tubokurarin

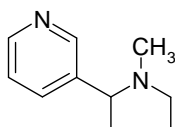
Tyto dva alkaloidy jsou základem tzv. šípového jedu kurare. Jihoameričtí indiáni jed získávali z různých částí rostliny *Strychnos toxifera* a používali ho k lovu i obraně. Zajímavostí je, že aby způsobil ochrnutí dýchacího svalstva, musí se dostat rovnou do krevního oběhu. V terapeutických dávkách se používá k prevenci křečí při šoku^{3,42}.

3.4.4 Látky ovlivňující vegetativní ganglia

Z terapeutického hlediska je to málo významná skupina, neboť mimo substituční terapie u kuřáků se látky patřící do této skupiny v podstatě neuplatňují²⁰.

Nikotin

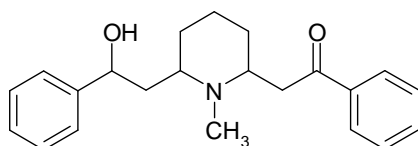
Alkaloid nacházející se v *Nicotiana tabacum* je jednou z nejrozšířenějších drog³. Dobře prochází membránami, snadno se absorbuje z dutiny ústní i dýchacích cest. V periferním nervovém systému zvyšuje sekreci i motilitu GIT, na CNS má povzbuzující účinky. Závislost na něj vzniká nenápadně, ale odvykání je obtížné. V substituční terapii je podáván ve formě žvýkaček, náplastí nebo inhalací²⁰.



Obr. 18: Nikotin

Lobelin

Lobelia inflata je hlavním zdrojem lobelinu, který působí jako analeptikum dechového centra a stimuluje vegetativní ganglia podobně jako nikotin. Proto se používala do bylinných směsí k odvykání kouření tabáku^{3,20}.



Obr. 19: Lobelin

3.4.5 Psychostimulancia a další látky mající afinitu k centrální nervové soustavě

Psychostimulancia zvyšují aktivitu ve sféře myšlení, chování, způsobují euforii, stav po jejich požití může připomínat psychózu. Terapeutické využití mají tzv. psychomotorická stimulantia, a to při léčbě narkolepsie nebo hyperkinetického syndromu dětí²⁰.

Kokain

Vždyzelený keř *Erythroxylon coca* poskytuje první známé lokální anestetikum alkaloid kokain, který mimo jiné blokuje zpětný příjem neurotransmiterů do nervového zakončení, čímž dochází k euforii. Po stimulační fázi se však dostavuje deprese. Kokain dále způsobuje hypertenzi a vazokonstrikci, která při dlouhodobém používání drogy může vést až odumření a perforaci nosní přepážky^{3,41,42}.

Kathin

Listy *Catha edulis* žvýkají obyvatelé Etiopie k odstranění hladu a únavy. V nich obsažený kathin působí stimulačně, chroničtí uživatelé jsou naopak apatičtí, neschopní koncentrace^{3,20}.

Kofein, theobromin, theofylin

Tyto methylxanthiny se nachází v různé míře v rostlinách *Cofea arabica*, *Cola vera*, *Thea sinensis*, *Paulinia cupana* a *Theobroma cacao*, jejichž hlavní využití je jako pochutiny. Nejsilnější centrální účinek vykazuje kofein, proto se ve směsi používá jako anorektikum. Též zvyšuje účinek analgetik a působí diureticky. Theobromin a theofylin mají hlavně vliv na dýchací soustavu, působí relaxaci hladkých svalů bronchů. Terapeuticky se využívají při dechové nedostatečnosti^{3,20,41,43}.

Psilocybin

Houby rodu *Psilocybe* obsahují psilocybin³. Tento alkaloid způsobuje euforii, zrakové, sluchové a hmatové halucinace. Snadno na něho vzniká psychická závislost²⁰.

Meskalin

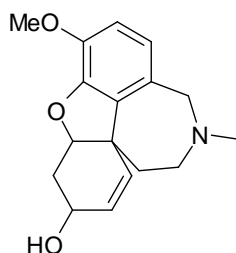
Kaktus rodu *Peyotes* byl využíván v indiánských náboženských obřadech. Nachází se v něm meskalin, který má silné psychotomimetické účinky s vlivem na vegetativní nervový systém, což působí nucení na moč, pocit horka, úzkost^{3,20}.

Tetrahydrokannabinol (THC)

Nejčastějším způsobem příjmu THC z rostliny *Cannabis* je kouření. Halucinogenní účinek nastupuje během minut, po užití ústy je vstřebání nerovnoměrné, a proto i intoxikace mohou mít závažnější důsledky²⁰.

Galantamin

Galantamin, který se získává z *Galanthus woronowii*, je selektivní inhibitor AChE, používá se k symptomatické léčbě Alzheimerovy choroby. Používá se rovněž k zúžení zornic, zvýšení sekrece žláz, léčbě glaukomu a jako antagonist kurarového ochrnutí^{3,20,41}.



Obr. 20: Galantamin

Stimulačně rovněž působí tropanové alkaloidy a efedrin (viz výše).

3.4.6 Analgetika

Analgetika jsou látky tlumící bolesti při zachování vědomí. Silný účinek v tomto směru vykazují látky pocházející z opia, zaschlé šťávy z nezralých makovic *Papaver somniferum*⁴¹.

Morfin

Morfin je hlavní analgetickou složkou opia, kde se nachází asi ve 13 %. Děšť a vítr zhoršují výnos³. Podrobněji viz kap. 3.1.1.3.

3.4.7 Další látky působící na nervový systém

Kodein

Nachází se v rodu *Papaver* a jeho hlavní využití je jako antitusikum²⁰. Podrobněji viz kap. 3.1.1.3.

Koniin

Tento alkaloid způsobující kurarové ochrnutí kosterního svalstva se nachází v *Conium maculatum*. Podle pověsti byl odvarem z této rostliny otráven Sokrates. Dříve se používal výluh z bolehlavu k lokální léčbě neuralgií³.

3.5 Alzheimerova choroba

3.5.1 Úvod

Alzheimerova choroba (AD) v dnešní době představuje spolu s ischemicko-vaskulární demencí nejčastější příčinu demencí u seniorů. Tímto onemocněním trpí až každý desátý nad 60 let a každý druhý nad 85 let, z čehož vyplývá, že s věkem roste incidence i prevalence. Potvrzuje to i studie Copeland a kol. (1996), kteří zjistili, že poměr incidence demencí Alzheimerova, vaskulární, alkoholová je 6,3:1,9:1 na 1000 lidí. Prevalencí této choroby se zabýval Evans a White (3 % v 65-75 let, 18,7 % 75-84 let, 47,2 % u lidí starších 85 let)^{12,44}.

Příznaky choroby jsou často zaměňovány s přirozenými projevy stárnutí, což oddaluje diagnózu a následnou léčbu. Rozlišujeme senilní (nastupuje po 60. roce života) a presenilní formu (první příznaky se objevují již kolem 45. roku)¹². Pro ženy je riziko onemocnění ve vyšším věku asi třikrát vyšší než u mužů. Své místo ve vývoji AD má i dědičnost. Bylo zjištěno, že rizikovým faktorem je nosičství alely eta-4 genu pro apolipoprotein E, lokus 12. chromozomu a dále genové mutace na 21., 14. a 1. chromozomu.

AD postihuje častěji jedince s nižším vzděláním, ty, kteří kouří cigarety nebo utrpěli poranění hlavy. Jednoznačnou spojitost se však nepodařilo prokázat. Rovněž hliník se může podílet na tvorbě abnormálních podob τ -proteinu, z kterého vznikají neuronální klubka a vlákna neuropilu, topografický vztah nebyl ale zjištěn⁴⁴.

3.5.2 Makroskopické změny

V CNS postiženém AD dochází k makroskopickým změnám, a to snížení hmotnosti a objemu mozku, nejčastěji jsou postiženy spánkové laloky, dochází k rozšíření mozkových komor a zúžení mozkové kůry. Stupeň postižení substantia nigra pak odpovídá extrapyramidovým příznakům.

3.5.3 Mikroskopické změny

Změny v důsledku onemocnění AD ale můžeme pozorovat i na mikroskopické úrovni, např. jako numerickou atrofii a další změny na neuronech.

AD doprovází v řadě podkorových oblastí vyšší míra numerické atrofie neuronů, než je tomu u klinicky normálního stárnutí. Změny postihují cholinergní, noradrenergní, dopaminergní, serotonergní a peptidergní systém v hypothalamu a striatu. Snižuje se tedy počet neuronů i jejich plocha, a to v různých částech CNS odlišnou mírou. Zajímavostí je přímá vazba numerické atrofie nucleus basalis a mozkové kůry a také, že pokles aktivity neuronu odpovídá zmenšení plochy Golgiho aparátu v neuronu.

Počítání neuronů je však velmi obtížné, až moderní metody přinesly spolehlivější výsledky. Numerickou atrofii neuronů doprovází i pokles aktivity enzymů i příslušných receptorů, čímž se ve své studii zabýval Wilcock a kol. (1982)⁴⁴.

Během AD dochází ke změnám na dendritických systémech včetně synapsí, kterým odpovídá stupeň postižení kognitivních funkcí. Pomocí barvitelného synaptického proteinu SNAP-25 můžeme měřit počet synapsí. Zdá se, že senilní plaky dendritické systémy neovlivňují, ukládání amyloidu naproti tomu může být odpovědí na poškození synapsí.

Apoptóze podléhají více gliové buňky než samotné neurony, jedním ze spouštěčů je i β -amyloid. Mechanismus zániku přesně neznáme, podíl pravděpodobně mají odchylky

činnosti genů skupiny Bcl-2 (jejich produkty spouštějí apoptózu i tvorbu neuronálních klubek) a oxidativní stres.

Senilní plaky

V histologických řezech je můžeme pozorovat jako nepravidelně okrouhlé heterogenní útvary velikosti asi 0,2 mm, které obsahují amyloid. Jejich nález ještě neznamena diagnózu AD, protože se vyskytují v průběhu klinicky normálního stárnutí mozku. Při AD je jich však abnormálně více. Různým barvením lze rozlišit 8 typů senilních plak a příbuzných struktur. Typické pro AD jsou neurity s párovými spirálními vlákny, které se vyskytují volně mimo plaky, tzv. neuropilová vlákna⁴⁴.

Ukazatelem poškození kognitivních funkcí je výskyt neuritických plaků v neokortexu, které se zaměřují s non-neuritickými amyloidovými plaky doprovázející stárnutí.

Neuronální klubka (tangles)

Jejich ultrastrukturální povahu přesně neznáme. Podle studie, ve které byla použita metoda AFM, se jedno spirální vlákno stáčí kolem druhého, párového, aniž by je překřížilo. V imunocytochemických studiích se zjistilo, že důležitou složkou spirálních vláken je τ -protein. Tento protein s nízkou molekulární hmotností má v těle fyziologickou funkci. Váže se na tubulin mikrotubulů a startuje jejich polymerizaci. Jakmile je defosforylován, podílí se na jejich stabilizaci. V klucích se τ -protein vyskytuje v jednodušší isoformě s vyšší molekulární hmotností, která je způsobena hyperfosforylací. Dále se na vzniku klubek může podílet i glykosylace a ubikvitinizace^{12,45}.

A- β -protein

Glennier a Wong z cerebrovaskulárního amyloidu pacientů trpících AD vyizolovali a osekvenovali protein o 39-43 aminokyselinách, který nazvali β -protein. Vzniká z větších prekurzorů, nazývaných prekurzorový protein, APP, ukládá se v jádrech senilních plaků a

ve stěnách tepének. Jeho fyziologickou funkci neznáme. Hlavní složku tvoří A- β 42, protein tvořený 42 aminokyselinami, který se účastní všech stadií nemoci, takže jeho ovlivnění bylo terapeuticky výhodné. Podle současných výzkumů je A- β protein klíčovým patogenetickým článkem degenerativních procesů při AD⁴⁵. Zvýšení tvorby A- β proteinu je důsledkem mutací genu pro amyloidový prekurzorový protein na 21. chromozomu, genu kódujícího tvorbu presenilinu 1 na 1. chromozomu. Mechanismus neurotoxického účinku A- β proteinu není dosud znám. Cytotoxicitu A- β proteinu zvyšuje tvorba komplexů s polypeptidem ERAB, což je vazebný protein endoplazmatického retikula, který má enzymatický charakter⁴⁴.

Apolipoprotein E (ApoE)

Tento protein má podíl na redistribuci lipidů mezi buňkami jednotlivých orgánů i mezi buňkami téhož orgánu, neboť po navázání na své receptory je schopen transportu lipidů. Přirozeně se vyskytuje v několika isoformách. U jedinců, kteří nesou alespoň jednu alelu pro ApoE4, je zvýšené riziko výskytu AD. Zdá se, že ukládání apolipoproteinu předchází ukládání β -amyloidu⁴⁴.

Glie, zánětlivé mechanismy a oxidativní stres

V senilních plakách se vyskytuje aktivovaná mikroglie. Bylo zjištěno, že když se k tkáňové kultuře mikroglie přidal β -amyloid, začala vylučovat TNF- α , faktor aktivující apoptózu. Kolem neuritických plaků jsou často hnízda mikroglie, což se přičítá vlivu apolipoproteinu E4.

Aktivovaná mikroglie vyvolává imunitní odpověď, což vysvětluje výskyt interleukinu-1 (IL-1) a interleukinu-6 (IL-6) v blízkosti neuritických plaků. Díky tomuto poznatku se předpokládal pozitivní vliv nesteroidních antiflogistik, který však nebyl prokázán. Podíl na zánětlivé odpovědi má rovněž CAP 37 (kationtový antimikrobiální protein), který způsobuje přilnutí monocytů ke kapilárnímu endotelu, čímž se začnou uvolňovat kyslíkové radikály⁴⁴.

Amyloidová angiopatie

Nevětvená vlákna amyloidu prostupují *tunica media*, nahrazují myocyty hladké svaloviny, oddělují *membrána elastica interna* a někdy procházejí až do přilehlé mozkové tkáně. Se zvyšujícím se věkem se objevuje častěji. Mozková amyloidová angiopatie se vyskytuje nejen u AD (což je nejčastější), ale i při Downově syndromu, demenci boxerů, vaskulitidách, často bez závislosti na výskytu plaků nebo klubek. V 5-10 % případů je příčinou neúrazového mozkového krvácení.

3.5.4 Genetika

Na vývoj AD má vliv mnoho faktorů, mezi které patří i genetická predispozice. Rozlišujeme dvě formy: raná (porucha na chromozomu 21, 14, 1, choroba začíná před 60. rokem a trvá 6 až 8 let) a pozdní (gen pro apolipoprotein E na 19. chromozomu a mutace mitochondriální DNA, pravděpodobně i mutace na 4., 6., 12. a 20. chromozomu, nastupuje po 60. roku, nemoc trvá někdy i déle než 10 let)^{12,44}.

3.5.5 Příznaky AD

V časných stádiích je obvykle obtížné odlišit příznaky nemocnění od příznaků normálního stárnutí. Jedním z časných příznaků jsou poruchy slovní paměti. Řeč je sice plynulá, ale obsahově prázdná, nemocní často hledají slova. Dostaví se zapomínání každodenních událostí⁴⁴.

V dalším stadiu nemocní začínají bloudit, netrefí na místa, kam dlouhá léta chodili. V různé míře je postihnou poruchy exekutivních funkcí vázaných na čelní laloky: přestanou být schopni plánovat jednoduché úkony (oblékání, uklízení). Dále dojde k poruše nekognitivních funkcí a projeví se halucinace, deprese, agresivita. Nemocní si svůj stav většinu času neuvědomují a léčbu odmítají⁴⁶.

V pokročilejších stádiích se ztrácí schopnost komunikace, přestávají poznávat okolí, stanou se naprosto závislými na ošetřovateli, dochází k inkontinenci, ztrátě hybnosti, poruchám příjmu potravy⁴⁴.

3.5.6 Diagnóza

Klinická diagnóza má základ v mezinárodně doporučených a užívaných kritériích skupiny NINCDS/ADRDA z roku 1984. Dělí diagnózu na pravděpodobnou, možnou a jistou. Jestliže se onemocnění projeví typickými příznaky, mluvíme o pravděpodobné diagnóze. V případech s atypickými příznaky nebo v případech s dalšími současnými systémovými chorobami je uváděna možná diagnóza. Definitivní diagnózu lze určit až na základě histologického vyšetření. Numerická atrofie neuronů se při AD prokazuje v hypothalamickém nucleus suprachiasmaticus. Pokud se objeví klubka v nucleus paraventricularis a supraopticus, ač je numerická atrofie nepostihuje, najdou se i v mediobazálním hypothalamu. Součástí diagnostiky je neuropsychologické vyšetření.

Vývoj choroby lze dělit do několika stadií. V raném stadiu, ještě před výskytem klubek a vláken, je možné vývoj choroby sledovat pomocí imunohistochemických protilátek, které se váží na abnormálně fosforylovaný τ -protein. Pak následuje vývoj jemných klubek, nejdříve v odstupu dendritů, později i v somatu buňky.

Braakovi popsali šest vývojových stadií neuropatologických změn, jejichž určení založili na hodnocení topografie a kvantity výskytu neuronálních klubek. Rozlišují se po dvou stádiích transtentorinálních, limbických a isokortikálních. Mezinárodní studie buď užívají histologická kritéria Khachaturyanovy skupiny, nebo kritéria skupiny CERAD vypracovaná Mirrovou skupinou. Nejnověji se rozšiřují kritéria Pracovní skupiny Národního institutu stárnutí a Reaganova institutu, která využívají závěry Mirrové skupiny i studie Braakových. Neurohistologické změny nalezené při vývoji AD dobře korelují zjišťovaný vývoj neuropsychiatrických změn⁴⁴.

3.5.7 Terapie

Není známa etiopatogeneze, proto není ani možná kauzální léčba. Lze však ovlivnit dílčí mechanismy, které spolu souvisí. Terapie má být komplexní. Zahrnuje farmakoterapii, psychosocioterapii, léčbu interkurentních onemocnění, rehabilitaci a také práci s rodinou nebo jinými ošetřovateli⁴⁴⁻⁴⁷.

3.5.7.1 Farmakoterapie kognitivní

Léčiva této skupiny dělíme do několika skupin.

3.5.7.1.1 Prekurzory acetylcholinu

Při AD dochází k poruše některých neurotransmiterových systémů: nejvíce je postižen acetylcholinergní systém, a to převážně presynapticky, ale ne totálně. Podávají se proto **prekurzory acetylcholinu**, protože samotný acetylcholin použít nelze kvůli rychlému odbourávání acetylcholinesterázami. Nejčastěji se tedy podává lecithin, z kterého se uvolní cholin pro syntézu acetylcholinu. Jsou však třeba dávky řádově v desítkách gramů, čehož lze dosáhnout poměrně obtížně, proto se používá jen jako doplňková léčba⁴⁴.

3.5.7.1.2 Inhibitory AChE

Lepších výsledků v terapii je dosaženo při použití **inhibitorů AChE**. Tento enzym odbourává volný acetylcholin, jeho zablokováním zvýšíme množství acetylcholinu schopného vazby na receptory. Používají se léčiva z několika skupin:

Karbamáty: prvním používaným léčivem této skupiny byl **fysostigmin**, má však „úzké terapeutické okno“ (malý rozdíl mezi dávkou terapeutickou a toxickou), a proto byly hledány vhodnější deriváty. **Rivastigmin** vznikl prodloužením řetězce fyzostigminu. Podává se ve dvou denních dávkách do 12 mg, přípravek Exelon®^{44,46}.

Piperidinové přípravky: nejčastěji používaným přípravkem je **donepezil**. Má dlouhý poločas a minimum vedlejších účinků, takže je možné ho podávat 1krát denně v dávce 5-10 mg, originální přípravek Aricept®^{44,46}.

Akridinové přípravky: takrin se pro svou hepatotoxicitu v dnešní době k terapii neužívá. Jeho derivát 7-methoxytakrin, který byl objeven v ČR, zatím není v klinickém užití.

Deriváty organofosfátů: nadějně se jeví metrifonát.

Alkaloidy: **galantamin** (přípravek Reminyl®) se podává v jedné denní dávce 8 mg, kterou lze rozdělit na dvě dílčí dávky v případě neretardované lékové formy¹². **Huperzin A** se dnes již běžně používá v terapii⁴⁴.

3.5.7.1.3 Agonisté muskarinových receptorů

Dalším terapeutickým postupem je použití **agonistů muskarinových a nikotinových receptorů**. Nejlepších výsledků bylo dosaženo při použití látek selektivně působících na M₁ receptory kvůli minimu nežádoucích účinků. Z nich lze jmenovat **xanomelin** a **milamelin**. Použití látek majících vliv na N-receptory, aniž by měly výrazné vedlejší účinky, je předmětem výzkumu.

3.5.7.1.4 Další terapeutické postupy

V neposlední řadě lze ovlivnit i další neurotransmitterové systémy (parciální agonisté GABA-receptorů), zvýšit uvolňování acetylcholinu z presynaptického zakončení (ideloxazin), zlepšení příjmu prekursorů acetylcholinu do neuronu (acetyl-L-karnitin)²⁰.

Tvorbu patologických proteinů, amyloidu a τ -proteinu zatím neumíme účinně ovlivnit. Výzkum se zaměřuje na proteázy, které by byly schopné amyloid štěpit, a dále podávání apolipoproteinu E2, který by měl působit protektivně.

3.5.7.1.5 Nootropika

Jedním z příznaků AD je i snížení neuronálního metabolismu, a to oxidativního metabolismu glukózy a buněčné proteosyntézy. **Nootropika** zvyšují odolnost nervové tkáně vůči hypoxii, zvyšují oxidativní metabolismus glukózy, neuronální proteosyntézu. Jejich výhodou je minimum vedlejších účinků a u některých doplňkové efekty jako zlepšení plasticity erytrocytární membrány, efekt odstraňování volných kyslíkových radikálů.

Piracetam se používá v kombinované terapii třikrát denně minimálně 800 mg.

Pyritinol, derivát pyridoxinu, má mimo jiné i určitý efekt na likvidaci volných kyslíkových radikálů. Podává se třikrát denně 100-200 mg.

Meklofenoxát má určité rysy psychostimulancií. Interferuje s převodním srdečním systémem, a proto nemůže být použit u kardiaků. Používá se v dávce 500-2000 mg denně.

Naftidrofuryl působí také svým vasodilatačním efektem na hladkou svalovinu cév.

Směs dihydrogenovaných námelových alkaloidů **dihydroergotoxin** zvyšuje toleranci k hypoxii, snižuje permeabilitu vén. Denně 3-6 mg.

Příbuzný **nicergolin** působí proti hypoxii a snižuje agregaci trombocytů. Jeden až dvakrát denně 30 mg.

Extrakt z *Gingko biloba* obsahuje flavonové glykosidy, terpenoidy a organické kyseliny. Likviduje volné kyslíkové radikály, má neuroprotektivní účinek. Podává se třikrát denně nejméně 40 mg^{12, 44}.

3.5.7.1.6 Ovlivnění dalších patogenetických činitelů

Volné kyslíkové radikály (hydroxylová skupina, peroxid vodíku, superoxid, singletový kyslík, NO) v těle normálně vznikají a jsou následně odstraňovány scavengery (zametači) volných kyslíkových radikálů. Patří mezi ně **vitamín E a C, retinol, melatonin**, nootropika pyritinol, extrakt *Gingko bilobae*. Silnými scavengery jsou tzv. lazaroidy. Význam má i podávání selenu.

Další patogenetický činitel je excitotoxicita, tedy nadměrné působení neuromediátorových excitačních AK, zejména glutamátu a aspartátu na své inotropní receptory (NMDA). Antagonistou NMDA receptorů je **memantin**, který se v současné době používá v pokročilých stádiích (Ebixa), a **cykloserin**⁴⁷.

Nervové růstové faktory se podílejí na plasticitě neuronů a celkově na jejich přežití. Mají své receptory, které je možné terapeuticky zasáhnout, je však třeba použít molekulu vhodné velikosti. Patří mezi ně nerve growth factor (NGF), brain-derived neurotrophic factor (BDNF).

Podávání protizánětlivých látek a estrogenů může částečně zmírnit průběh AD.

Obecně se v léčbě AD doporučuje začít inhibitory AChE, které se doplňují lecitinem a neuroprotektivními látkami jako selegilin, případně přidat zametače volných kyslíkových radikálů⁴⁴. U těžších forem se podává memantin, jako adjuvans *Gingko biloba* a vysoké dávky vitamínu E¹².

3.5.7.2 Nekognitivní terapie

Pacienti trpící AD mají i řadu poruch v jiné než kognitivní oblasti, které je třeba řešit, aby se alespoň částečně zachovala kvalita života. Jedná se především o terapii poruch spánku,

agitovanosti a podobných poruch, paranoidních a halucinatorních syndromů, přidružené deprese, úzkosti. Na to navazuje i psychosocioterapie. Cílem je uchovat a posílit pacientovy funkce, které ještě zůstaly, nesnažit se o rozvoj nových nebo již ztracených. Nekognitivní terapie také zahrnuje práci s rodinnými příslušníky a dalšími pečovateli^{12,44,46}.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Všeobecné postupy

4.1.1 Destilace a odpařování

Před použitím byla rozpouštědla predestilována. Celý postup byl veden tak, že nejdříve byl zachycen předek (asi 5 %; většinou s vodným azeotropem) a následně bylo vydestilováno ostatních cca 95 % rozpouštědla. Ta byla dle správné laboratorní praxe uchovávána v tmavých uzavřených nádobách.

K odpařování jednotlivých chromatografických frakcí, které probíhalo při 40 °C za sníženého tlaku, sloužila vakuová odparka Büchi Rotavapor R-114 vybavená vodní lázní Büchi Waterbath B-480.

4.1.2 Chromatografie

4.1.2.1 Chromatografie na tenké vrstvě

Tenkovrstvá chromatografie probíhala v systému normálních komor, předem nasycených mobilní fází. Sycení trvalo 30 minut. Chromatografie byla prováděna vzestupně.

4.1.2.2 Sloupcová chromatografie

Sloupcová chromatografie probíhala systémem gradientové eluce na oxidu hlinitém neutrálním, velikost zrn 0,05-0,2 mm (Acros-Organics). Sloupec jsme plnili obvyklým způsobem – nalitím suspenze adsorbentu v rozpouštědle do sloupce. Po vysušení v exsikátoru byl vzorek nanesen v roztěru s malým množstvím oxidu hlinitého.

4.2 Materiál a vybavení

4.2.1 Rozpouštědla

Benzín, p. a. (PENTA)

Cyklohexan, p. a. (PENTA)

Diethylamin, p. a. (PENTA)

Ethanol 95%, denaturovaný methanolem, p. a.

Ethylacetát, p. a. (PENTA)

n-Hexan, p. a. (PENTA)

Chloroform p. a. (PENTA)

Toluen, p. a. (PENTA)

4.2.2 Chemikálie

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

Hydroxid sodný, p. a. (PENTA)

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

Uhlíčan sodný bezvodý, p. a. (PENTA)

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

4.2.3 Chemikálie a materiál použité ke stanovení účinku erytrocytární AChE a sérové BuChE

Chemikálie:

10 mM acetylthiocholin jodid, (Sigma-Aldrich)

10 mM butyrylthiocholin jodid, (Sigma-Aldrich)

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

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

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

Dimethylsulfoxid, (Sigma-Aldrich)

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

Materiál:

Zdrojem acetylcholinesterázy byla pouzdra lidských erytrocytů. Butylcholinesteráza byla získána z lidské plazmy.

Měření se provádělo v jednorázových semimikro-polystyrenových kyvetách 1,5 ml PLASTIBRAND®.

4.2.4 Chemikálie a materiál ke stanovení antioxidační aktivity

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

Kvercetin (Sigma-Aldrich)

Trolox (Sigma-Aldrich)

4.2.5 Přístroje použité při stanovování biologických vlastností izolovaných látek

Centrifuga typ MPW-340 (Mechanika precyzyjna, Varšava, Polsko)

pH metr Φ 72 METER (Beckmann, USA)

Pro stanovení cholinesterázové inhibiční aktivity byl použit spektrofotometr UV-1601 CE SHIMADZU.

Antioxidační aktivita byla stanovena pomocí FIA lab 3000 analyzátoru (FIALab Instruments Inc., Bellevue, WA, USA), USB 2000-UV/VIS spektrofotometru se zdrojem světla LS-1 (Ocean Optics, USA) a CMA-Z průtokové cely (1 cm délka).

4.2.6 Detekční činidla

D 1: Dragendorffovo činidlo modifikované podle Muniera⁴⁸

- pro alkaloidy a ostatní sloučeniny s obsahem dusíku

- *roztok A*: byl připraven rozpuštěním 1,7 g zásaditého dusičnanu bismutitého a 20 g kyseliny vinné v 80 ml vody

- *roztok B*: 16 g jodidu draselného bylo rozpuštěno ve 40 ml vody

- *zásobní roztok*: byl připraven smísením roztoků A a B v poměru 1:1

- *činidlo pro analýzu*: vzniklo smísením 5 ml roztoku kyseliny vinné rozpuštěné v 50 ml vody a 5 ml zásobního roztoku

4.2.7 Chromatografické adsorbenty

A 1: Kieselgel 60 F254, Merck, 5 × 10 cm a 10 × 20 cm

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

A 2: Oxid hlinitý neutrální, velikost zrn 0,5-0,2 mm (ACROS ORGANICS Aluminium oxide for chromatography neutral, Brockman I)

A 3: Silufol UV 254, Kavalier Votice, 20 × 20 cm

4.2.8 Vyvíjecí soustava pro tenkovrstvou chromatografii

S 1: Toluén + CHCl₃ + EtOH + Et₂NH = 75:20:5:3

S 2: Toluén + CHCl₃ + Ethylacetát + Et₂NH = 77:20:3:3

S 3: Toluén + CHCl₃ + EtOH + Et₂NH = 77:20:3:3

4.2.9 Vyvíjecí soustava pro preparativní tenkovrstvou chromatografii

S 4: Cyklohexan + Et₂NH = 95:5

S 5: Toluén + CHCl₃ + Et₂NH = 80:20:3

S 6: Toluén + CHCl₃ + EtOH + Et₂NH = 78,5:20:1,5:3

S 7: Cyklohexan + Et₂NH = 9:1

S 8: CHCl₃ + Et₂NH = 100:5

4.3 Příprava a zpracování chloroformového výtřepku A z *Chelidonium majus*

Zpracování drogy a příprava jednotlivých alkaloidních frakcí nebylo předmětem této rigorózní práce, ale byly provedeny již dříve na katedře farmaceutické botaniky a ekologie doc. RNDr. Lubomírem Opletalem, CSc. Postup je možný nalézt v mé diplomové práci⁴⁸, na kterou předložená rigorózní práce navazuje.

4.4 Zpracování zbytku výtřepku *Chelidonium majus* chloridy nerozpustné v CHCl₃

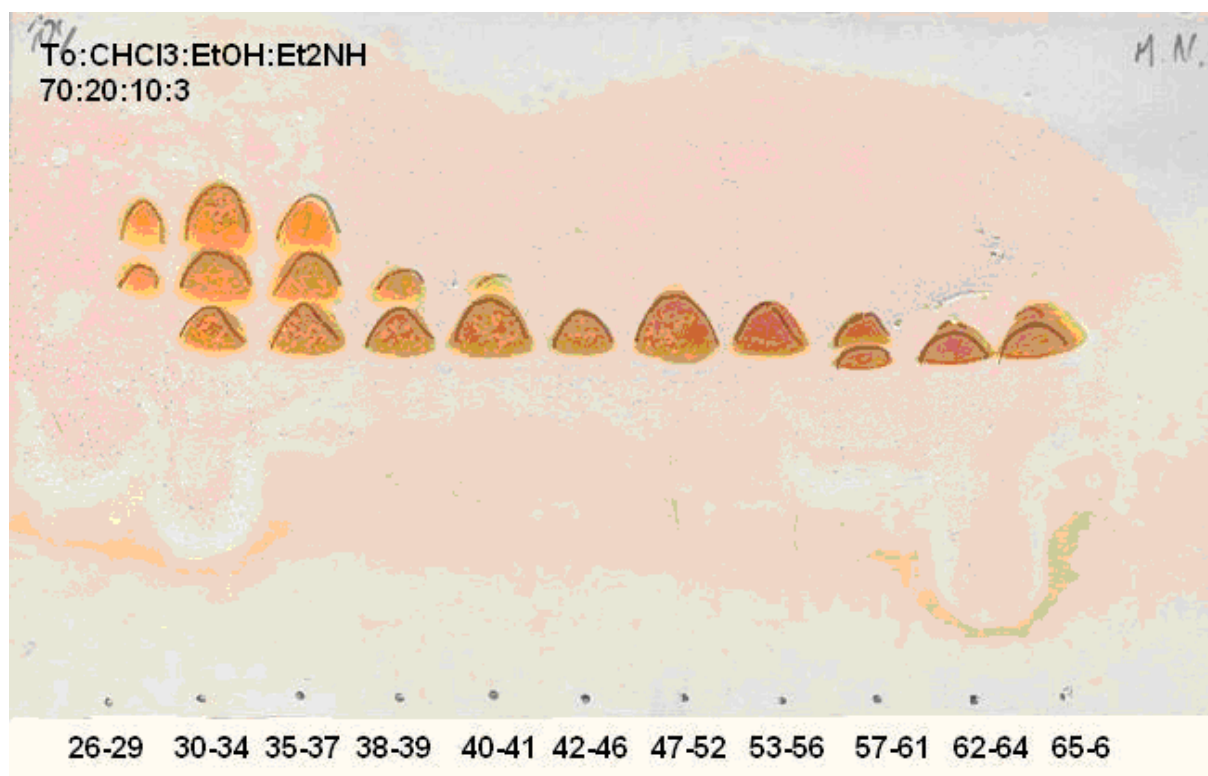
Po izolaci protopinu a allokryptopinu nám zůstalo nedefinované množství výtřepku obsahujícího chloridy nerozpustné v chloroformu, rozděleného již předchozí prací na několik frakcí. Pro ilustraci uvádíme tabulky, v níž jsou shrnuty výsledky sloupcové chromatografie (Tab. 1, Tab. 2) a TLC chromatogramu (Obr. 21).

Tab. 1: Sloupcová chromatografie výtřepku *Chelidonium majus* chloridy nerozpustné v CHCl₃

Označení vzorku	Chloridy nerozpustné v chloroformu
Hmotnost vzorku	13,02 g, oříškově hnědý, pevný
Druh a množství adsorbentu	oxid hlinitý neutrální, 0,1-0,2 mm, 520 g, destabilizované 5% vody
Vrstva s extraktem	2,1 × 2,5 cm
Dělicí vrstva	2,1 × 50 cm
Frakce (ml)/doba toku	100 ml/25-30 minut
Mrtvý objem	550 ml

Tab. 2: Výsledky sloupcové chromatografie

Číslo frakce	Eluční systém CHCl ₃ : benzín (%)	Popis	Váha produktu (g)	Poznámky
1-20	30:70	čirá tekutina	0	
21-5	35:65	žlutý olej	0,65	nezpracován, obsahovala vysoké procento příměsí
26-9	4:6	žlutý olej	0,285	
30-4	4:6	bíložlutá pěna	1,22	
35-7	4:6	bíložlutá pěna	0,941	
38-9	4:6	bíložlutá pěna	0,702	
40-1	4:6	bíložlutá pěna	0,704	
42-6	4:6	bíložlutá pěna	1,233	
47-53	4:6	slabě okrový prášek	3,152	
54-6	4:6	bílá pěna	0,898 + 0,112 (mateč. louh)	čistá látka, krystalizace
57-61	45:55	bíložlutá pěna	0,887	
62-4	45:55	bíložlutá pěna	0,678	
65-9	45:55	slabě nažloutlá pěna	1,067	
70-84	100:0	slabě nažloutlá pěna	3,069	čistá látka, krystalizace



Obr. 21: TLC jednotlivých frakcí z *Chelidonium majus* chloridy nerozpustnév chloroformu, (Kieselgel UV 254 Merck, 10 cm (dráha 8,0 cm), toluen+CHCl₃+EtOH+Et₂NH=70:20:10:3, komora nasycená, vyvíjení 1krát, detekce D1).

4.5 Zpracování frakcí 26-9

Frakce 26-9 byly na základě shodného výsledku tenkovrstvé chromatografie spojeny. K získání čistého alkaloidu byla využita preparativní tenkovrstvá chromatografie. K dělení bylo použito několik vyvíjecích soustav (viz kap. 4.2.9) a dva typy desek, a to Merck a Silufol. Většinou se vyvíjelo se 2-3krát po dobu 30 minut. Chromatografie byla provedena celkem na 18-ti deskách (A1 i A2). Z desek byla na základě UV detekce izolována horní a dolní zóna (označené N a D) a směs (S), která byla znovu podrobena preparativní TLC. Z jednotlivých zón s alkaloidy prováděny kontrolní TLC (S1, S2, S3). Získány frakce N₁₋₁₆, D₁₋₁₆. Po zbavení mechanických nečistot (přečištění přes Al₂O₃) byly obě frakce podrobeny krystalizaci ze soustavy chloroform-hexan. Po zvážení bylo zjištěno, že se nepovedlo získat dostatečné množství čistých látek (frakce N – 74,7 mg, fr. D – 70,6 mg), proto bylo nutné zpracovat ještě frakci 30-7.

4.6 Zpracování frakce 30-7

Na základě TLC jsme věděli, že tato frakce obsahuje 3 alkaloidy. Krystalizací za snížené teploty se povedlo oddělit protopin. Matečný louh byl podroben sloupcové chromatografii, jako sorbent byl použit silkagel, jako mobilní fáze $\text{CHCl}_3:\text{Et}_2\text{NH}$ (97:3).

Tab. 3: Zpracování frakce 30-37

Číslo frakce	Váha produktu (g)	Poznámka	Objem (ml)
0	0		75
1-2	0,026	skoro čisté	4,5
3-7	0,2945		11,0
8	0,0104	skoro čisté	2
9-12	0,0894	směs s izolovaným protopinem	7,5

Na základě kontrolní TLC byly spojeny frakce se stejným složením. Ty byly dále přečištěny preparativní TLC. Chromatografie byla provedena na 14 deskách (A2), na základě UV detekce byly opět izolovány horní a dolní zóna. Tak byly získány další frakce N a D. Na základě kontrolní TLC spojeny frakce se stejným složením. Čisté látky o hmotnosti 0,103 g a 0,1064 g byly označeny jako MN-3 a MN-4 a dále podrobeny strukturní analýze (MS, NMR).

4.7 Určení struktury izolované látky

4.7.1 Měření hmotnostního spektra

Spektra byla měřena na LC/MS Thermo Finningan LCQ Duo, iontová past, ionizace elektrosprejem v kladném módu (ESI+). MS/MS spektra byla měřena při kolizní energii 40 eV. Látka byla rozpuštěna v metanolu. (Ing. L. Cahlíková, Ph.D., katedra farmaceutické botaniky a ekologie, Farmaceutická fakulta UK).

4.7.2 Měření NMR spektra izolovaných látek

Spektra izolovaných látek byla měřena na spektrometru Varian Inova 500 s pracovními frekvencemi 499,9 MHz pro ^1H a 125,7 MHz pro ^{13}C jádra. ^{13}C NMR spektra byla měřena v 5mm SW širokopásmové sondě, ^1H a všechna 2D spektra v inverzní 5mm ID PFG sondě s využitím standardních pulzních sekvencí. Experimenty byly měřeny v prostředí deuteriochloroformu při 25 °C.

Hodnoty chemických posunů jsou měřeny 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

K měření teploty tání bylo použito otevřených kapilár v Koflerově bloku, na kterém nelze teplotu korigovat⁵⁰.

4.8 Stanovení inhibičního účinku alkaloidu na erytrocytární AChE a sérové BuChE

4.8.1 Podmínky měření

Experimenty probíhaly za těchto podmínek:

- laboratorní teplota
- prostředí fosfátového pufru (pH 7,4)
- vlnová délka spektrofotometru 436 nm
- měření provedeno v jednorázových plastových kyvetách (optická délka 1 cm)

4.8.2 Příprava erytrocytárních pouzder

Pro přípravu erytrocytárních pouzder byla použita čerstvě odebraná krev, ke které byl přidán kvůli snížení srážlivosti 1 ml citrátu sodného na 10 ml krve podle lehce modifikované metody Stecka a Kanta⁵¹. Plazma byla z plné krve oddělena centrifugací při rychlosti 4000 ot./min. na centrifuze Boeco U-32R s rotorem Hettich 1611. Erytrocyty byly po přemístění do 50 ml zkumavek promyty 5mM fosfátovým pufrům (pH 7,4) obsahujícím 150 mM chloridu sodného (12 000 ot./min., Avanti J-301, rotor JA-30.50). Aby

došlo k lýze erytrocytů, byly 10 minut míchány s 5mM fosfátovým pufrům (pH 7,4). Poté byly centrifugovány (20 000 ot./min.) a vzniklá pouzdra (HuAChE) byla třikrát promyta fosfátovým pufrům.

4.8.3 Stanovení hodnot IC_{50}

Ke stanovení inhibiční aktivity izolovaných látek byla použita Ellmanova spektrofotometrická metoda s použitím 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoové kyseliny (DTNB). Jako substráty byly použity estery thiocholinu, které cholinesterázy štěpí na thiocholin a příslušnou kyselinu. Stanovuje se SH-skupina thiocholinu, která se váže na DTNB. Žlutě zbarvený produkt se stanovuje spektrofotometricky při vlnové délce 436 nm, přičemž se sleduje nárůst absorbance za 1 minutu. Z naměřených hodnot poklesu aktivity acetylcholinesterázy nebo butyrylcholinesterázy nelineární regresí v programu GraphPaD Prism (verze 3.02 pro Windows; výrobce GraphPaD Software) byly vypočítány hodnoty IC_{50} . Výsledky byly následně porovnány s hodnotami IC_{50} známých inhibitorů cholinesteráz: huperzin A (IC_{50} HuAChE = $0,3 \pm 0,1 \mu\text{M}$, HuBuChE > $1000\mu\text{M}$) a galantamin (IC_{50} HuAChE = $6,9 \pm 0,3 \mu\text{M}$, HuBuChE = $156,0 \pm 6,9 \mu\text{M}$)⁵².

4.9 Stanovení antioxidační aktivity získaných alkaloidů

Ke stanovení antioxidační aktivity byl *in vitro* použit DPPH test. Základem metody je reakce stabilního 2,2'-difenyl-1-pikrylhydrazylu (DPPH) se vzorkem. Dochází ke snížení absorbance DPPH měřené při 525 nm, které je závislé na koncentraci antioxidantu ve sledovaném vzorku. Antiradikálová aktivita vzorků byla vyjádřena jako 50% účinná koncentrace (EC_{50}), která byla vypočítána pomocí programu GraphPad Prism 3.02, a následně byla porovnána se známými antioxidanty: kvercetinem $EC_{50} = 25,3 \pm 1,2 \mu\text{M}$ a troloxem $EC_{50} = 27,8 \pm 0,8 \mu\text{M}$ ⁵².

5 VÝSLEDKY

Na základě MS a NMR studií a porovnání dat s literaturou byly izolované látky identifikovány jako chelidonin a homochelidonin.

5.1 Strukturní studie chelidoninu

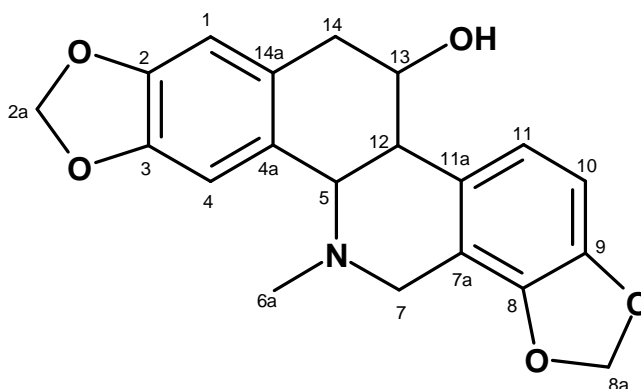
5.1.1 MS studie chelidoninu

ESI-MS m/z 354,2 $[M+H]^+$ (100). MS/MS m/z 323,1 (100) $[M+H-OCH_3]^+$, 305,0 (73) $[M+H-OCH_3-OH]^+$, 275,1 (36) $[M+H-OCH_3-OH-OCH_3]^+$.

Spektra MS a MS/MS studie se způsobem fragmentace jsou uvedené na stranách 60 a 61.

5.1.2 NMR studie chelidoninu

Struktura izolované látky byla určena na základě interpretace 1H - a ^{13}C -NMR spekter a jejich porovnání s daty v literatuře⁵³.

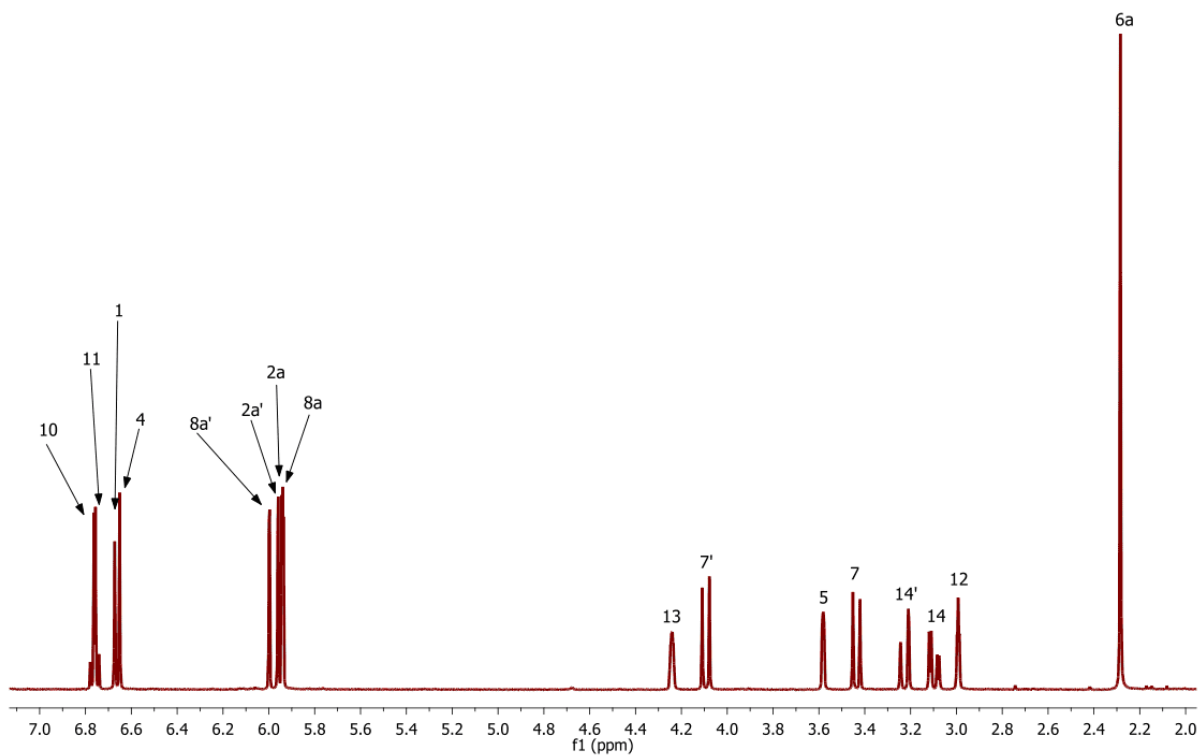


Obr. 22: Struktura chelidoninu

5.1.2.1 1H -NMR spektrum chelidoninu

1H NMR ($CDCl_3$, 25 °C, obr. 24):

2.29 s, 3H, H-6a; 2.99 t ($^3J_H=2.7$ Hz), 1H, H-12; 3.10 dd ($^2J_H=17.4$ Hz, $^3J_H=4.7$ Hz), 1H, H-14; 3.23 dd ($^2J_H=17.4$ Hz, $^3J_H=1.5$ Hz), 1H, H-14'; 3.44 d ($^2J_H=15.5$ Hz), 1H, H-7; 3.58 m, 1H, H-5; 4.09 d ($^2J_H=15.5$ Hz), 1H, H-7'; 4.24 m, 1H, H-13; 5.94 d ($^2J_H=1.5$ Hz), 1H, H-8a; 5.94(2) d ($^2J_H=1.5$ Hz), 1H, H-2a; 5.96 d ($^2J_H=1.5$ Hz), 1H, H-2a'; 6.00 d ($^2J_H=1.5$ Hz), 1H, H-8a'; 6.65 s, 1H, H-4; 6.67 s, 1H, H-1; 6.75 d ($^3J_H=8.1$ Hz), 1H, H-11; 6.77 d ($^3J_H=8.1$ Hz), 1H, H-10;

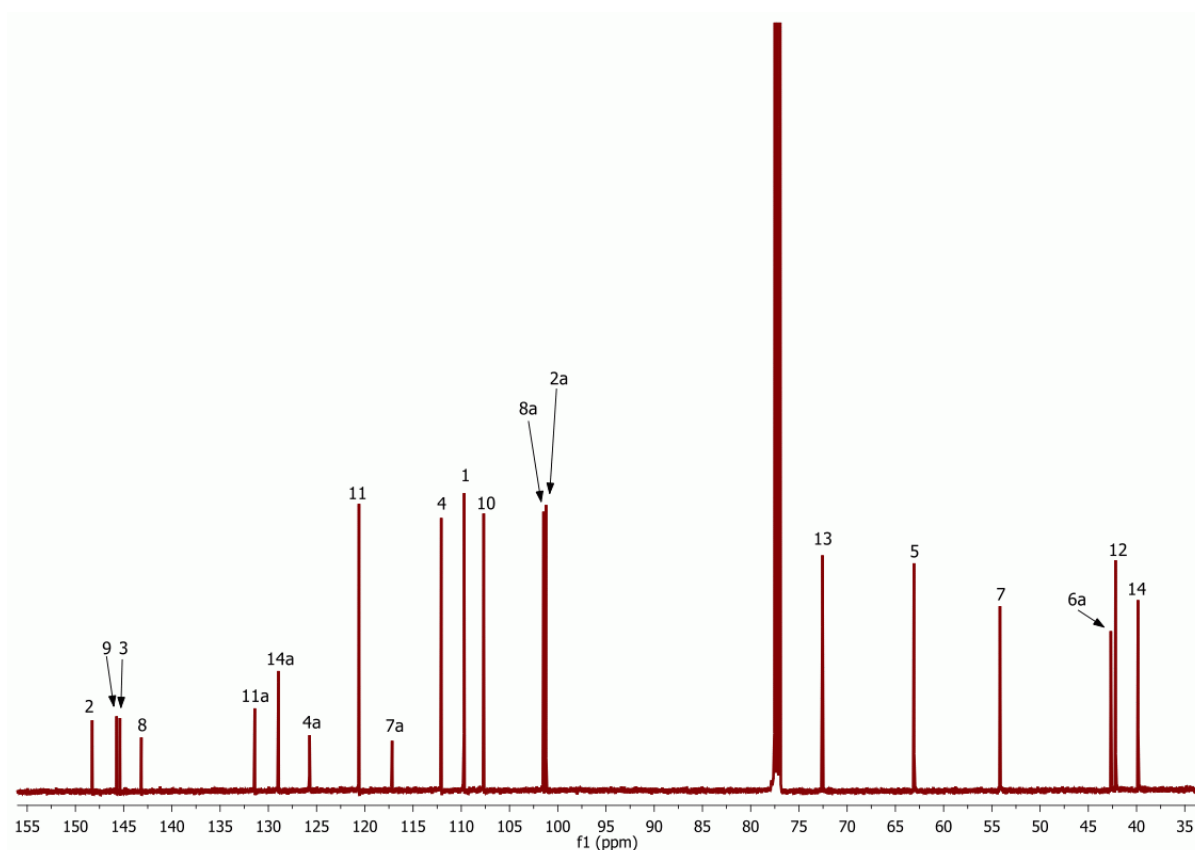


Obr. 23: ^1H -NMR spektrum chelidoninu

5.1.2.2 ^{13}C -NMR spektrum chelidoninu

^{13}C NMR (CDCl_3 , 25 °C, obr. 25):

39.85, C-14; 42.18, C-12; 42.67, C-6a; 54.16, C-7; 63.08, C-5; 72.57, C-13; 101.22, C-2a;
 101.48, C-8a; 107.69, C-10; 109.72, C-1; 112.09, C-4; 117.18, C-7a; 120.62, C-11; 125.74,
 C-4a; 128.97, C-14a; 131.42, C-11a; 143.18, C-8; 145.40, C-3; 145.75, C-9; 148.28, C-2.



Obr. 24: ^{13}C -NMR spektrum chelidoninu

5.2 Strukturní studie homochelidoninu

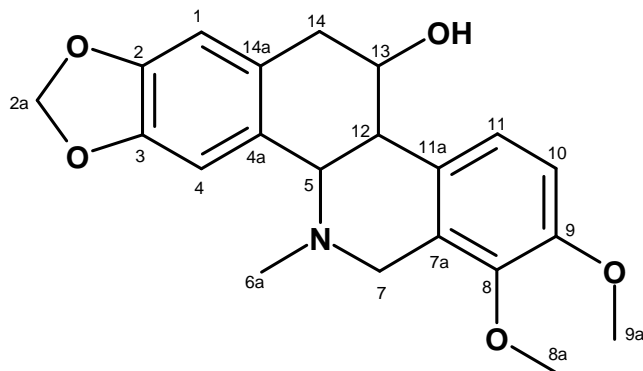
5.2.1 MS studie homochelidoninu

ESI-MS m/z 369,2 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (100). MS/MS m/z 339,1 (100) $[\text{M}-\text{OCH}_3]^+$, 321,1 (45) $[\text{M}-\text{OCH}_3-\text{OH}]^+$, 290 (20) $[\text{M}-\text{OCH}_3-\text{OH}-\text{OCH}_3]^+$.

Spektra MS a MS/MS studie se způsobem fragmentace jsou uvedené na stranách 62 a 63.

5.2.2 NMR studie homochelidoninu

Struktura izolované látky byla určena na základě interpretace ^1H - a ^{13}C -NMR spekter a jejich porovnání s daty v literatuře⁵⁴.

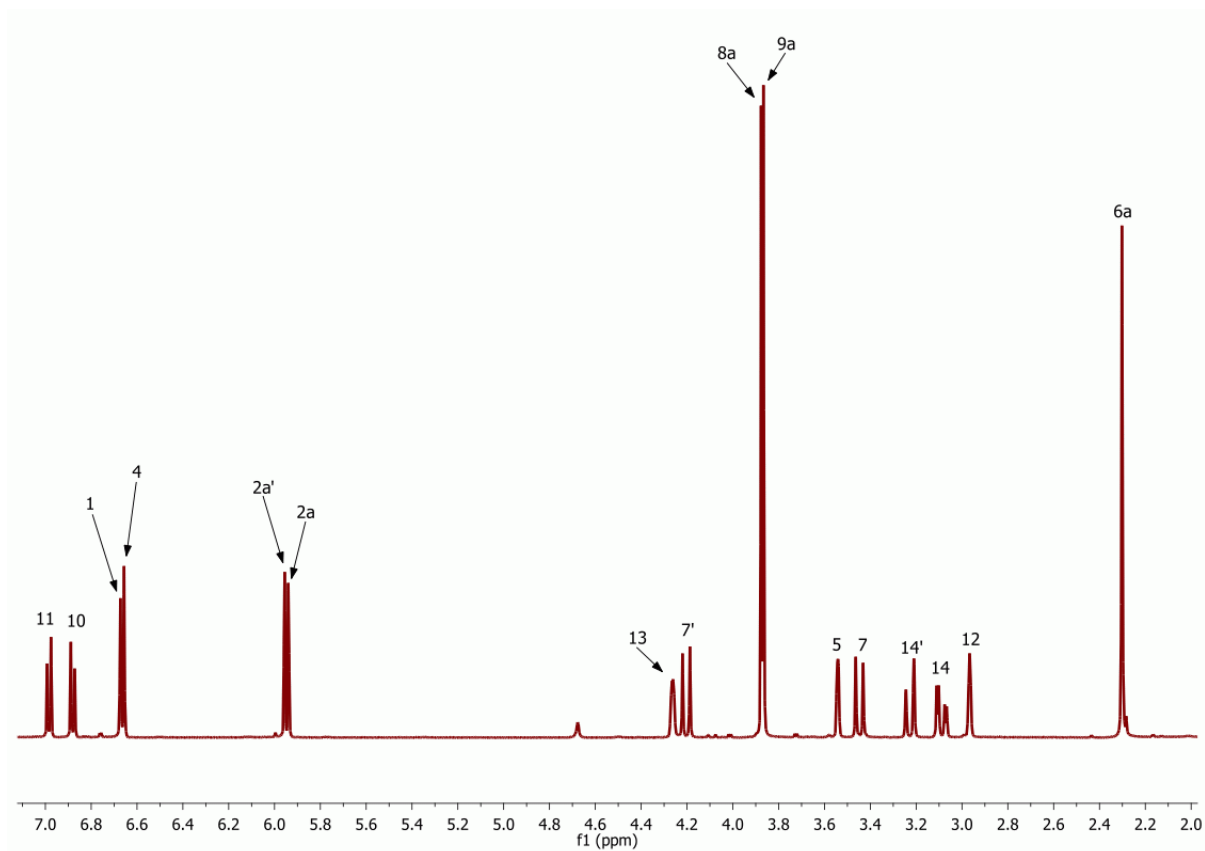


Obr. 25: Struktura homochelidoninu

5.2.2.1 ^1H -NMR spektrum homochelidoninu

^1H NMR (CDCl_3 , $25\text{ }^\circ\text{C}$, obr. 27):

2.30 s, 3H, H-6a; 2.97 t ($^3J_{\text{H}}=2.7\text{ Hz}$), 1H, H-12; 3.09 dd ($^2J_{\text{H}}=17.5\text{ Hz}$, $^3J_{\text{H}}=4.4\text{ Hz}$), 1H, H-14; 3.23 dd ($^2J_{\text{H}}=17.5\text{ Hz}$, $^3J_{\text{H}}=1.5\text{ Hz}$), 1H, H-14'; 3.45 d ($^2J_{\text{H}}=16.1\text{ Hz}$), 1H, H-7; 3.54 m, 1H, H-5; 3.87 s, 3H, H-9a; 3.88 s, 3H, H-8a; 4.20 d ($^2J_{\text{H}}=16.1\text{ Hz}$), 1H, H-7'; 4.26 m, 1H, H-13; 5.94 d ($^2J_{\text{H}}=1.3\text{ Hz}$), 1H, H-2a; 5.96 d ($^2J_{\text{H}}=1.3\text{ Hz}$), 1H, H-2a'; 6.66 s, 1H, H-4; 6.67 s, 1H, H-1; 6.88 d ($^3J_{\text{H}}=8.4\text{ Hz}$), 1H, H-10; 6.98 d ($^3J_{\text{H}}=8.4\text{ Hz}$), 1H, H-11;

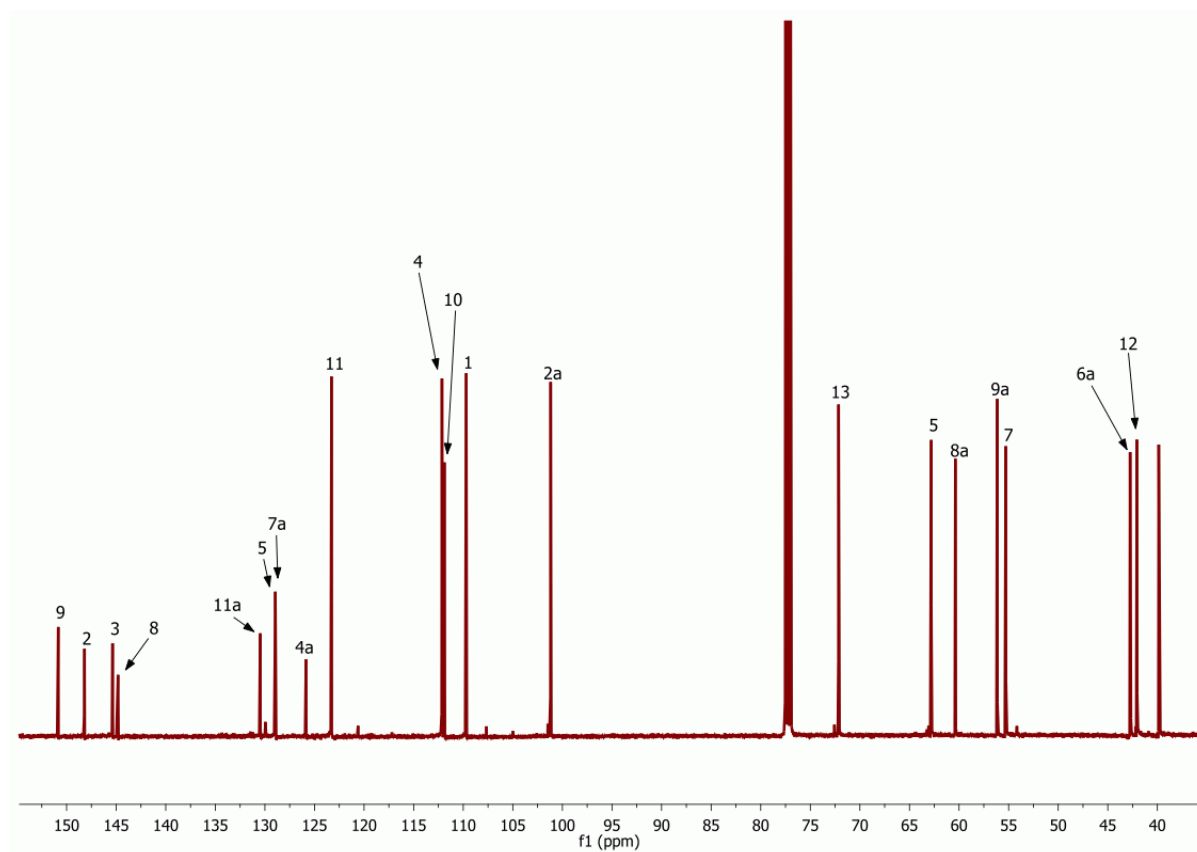


Obr. 26: ^1H -NMR spektrum homochelidoninu

5.2.2.2 ^{13}C -NMR spektrum homochelidoninu

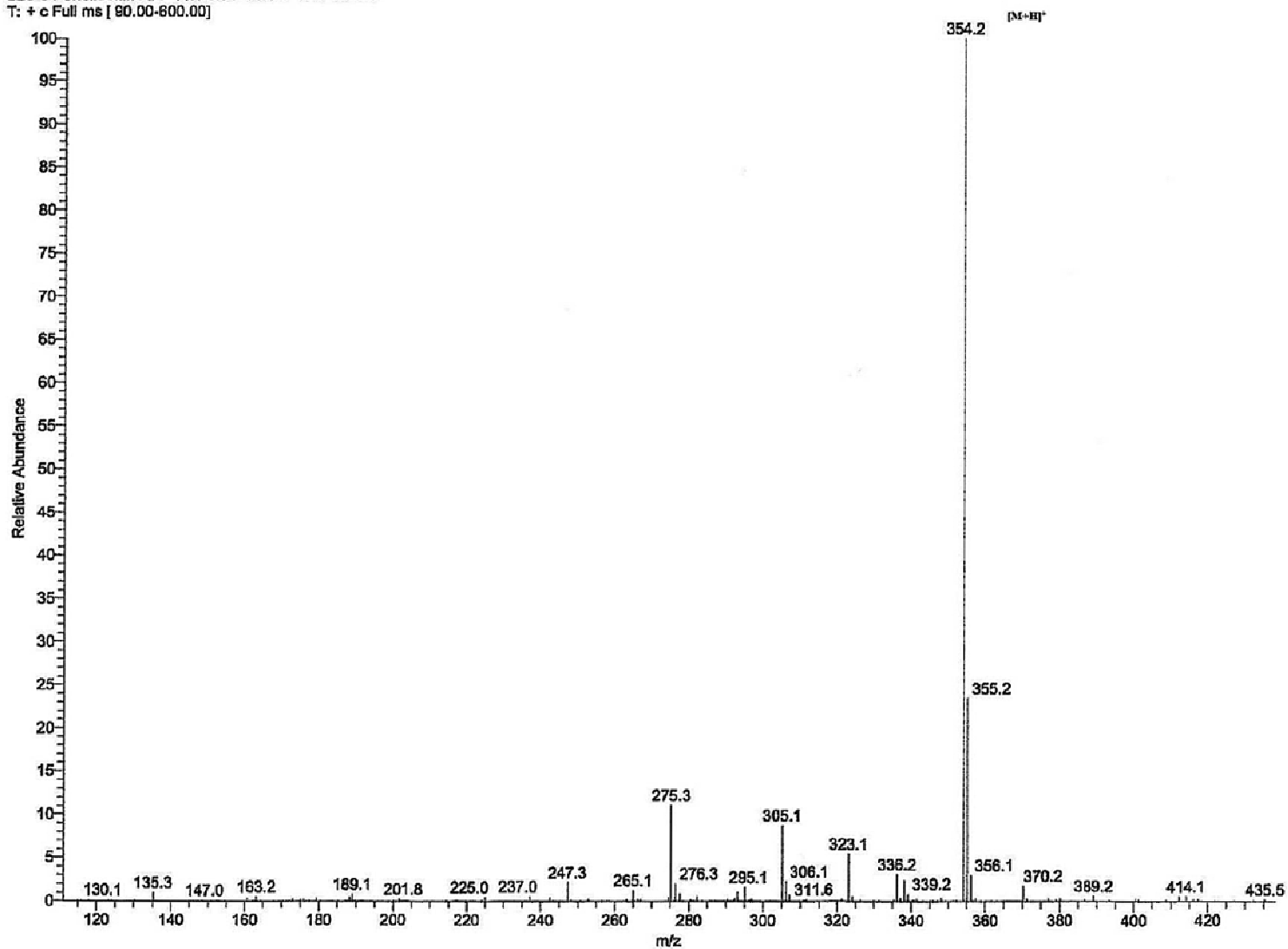
^{13}C NMR (CDCl_3 , 25 °C, obr. 28):

39.87, C-14; 42.07, C-12; 42.75, C-6a; 55.30, C-7; 56.16, C-9a; 60.39, C-8a; 62.82, C-5; 72.16, C-13; 101.19, C-2a; 109.71, C-1; 111.91, C-10; 112.16, C-4; 123.30, C-11; 125.87, C-4a; 128.93, C-7a; 128.96, C-14a; 130.48, C-11a; 144.82, C-8; 145.38, C-3; 148.21, C-2; 150.85, C-9.



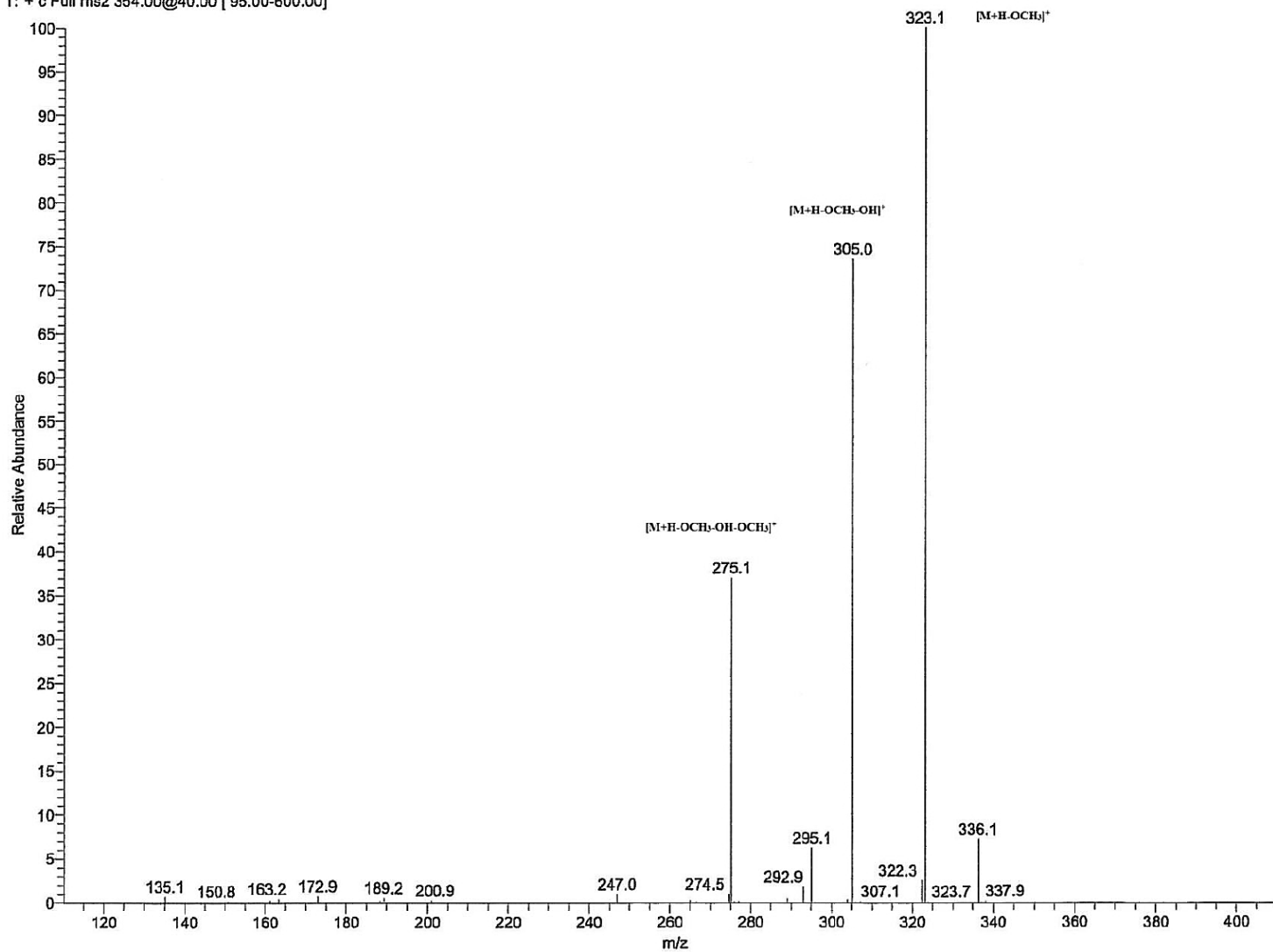
Obr. 27: ^{13}C -NMR spektrum homochelidoninu

LLC 64 Chelidone #1 RT: 0.01 AV: 1 NL: 1.44E7
T: + c Full ms [80.00-600.00]



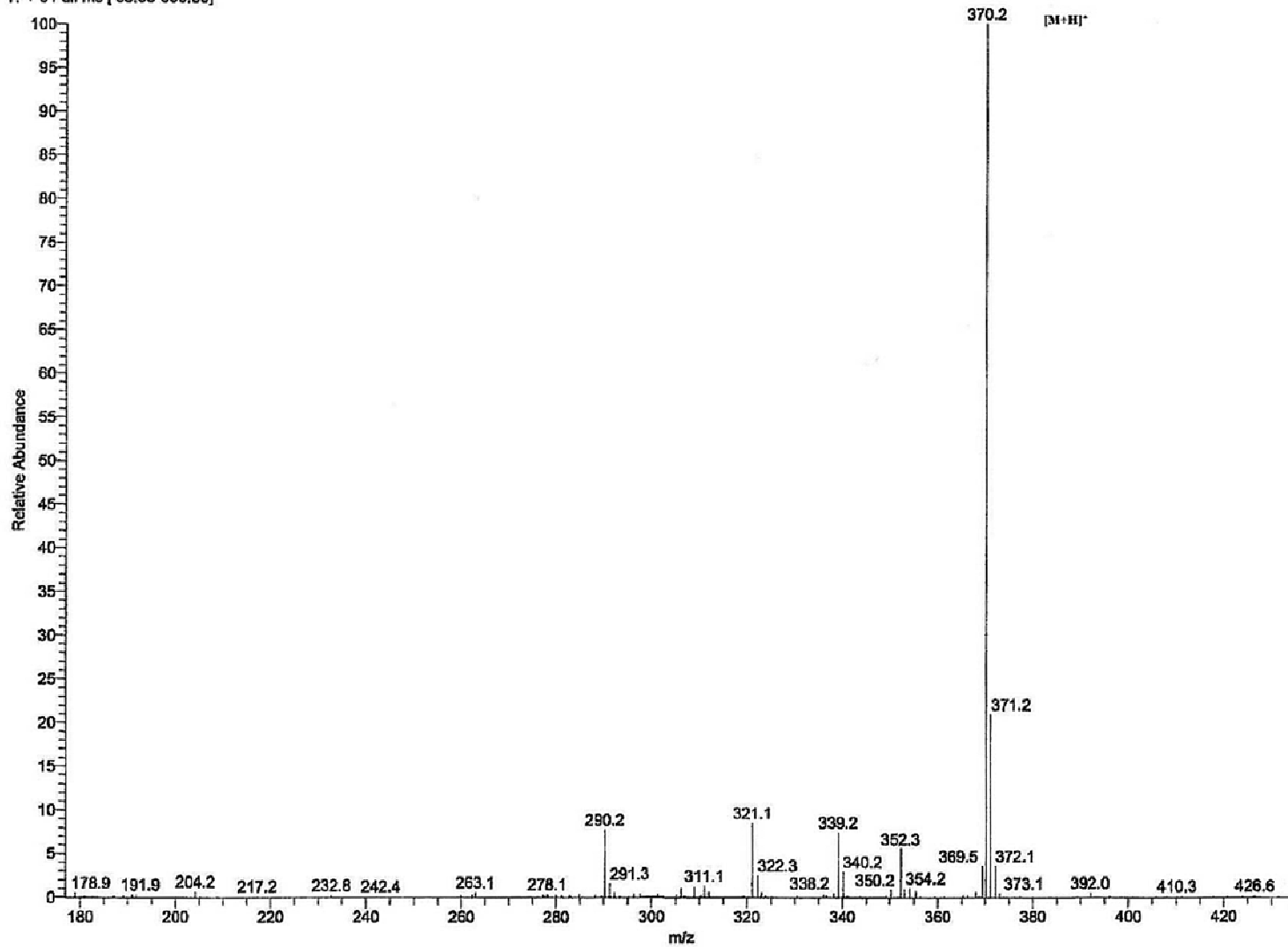
Obr. 28: Hmotnostní spektrum chelidoninu

LLC 64 Chelidone MS 354 #1 RT: 0.01 AV: 1 NL: 1.08E7
T: + c Full ms2 354.00@40.00 [95.00-600.00]



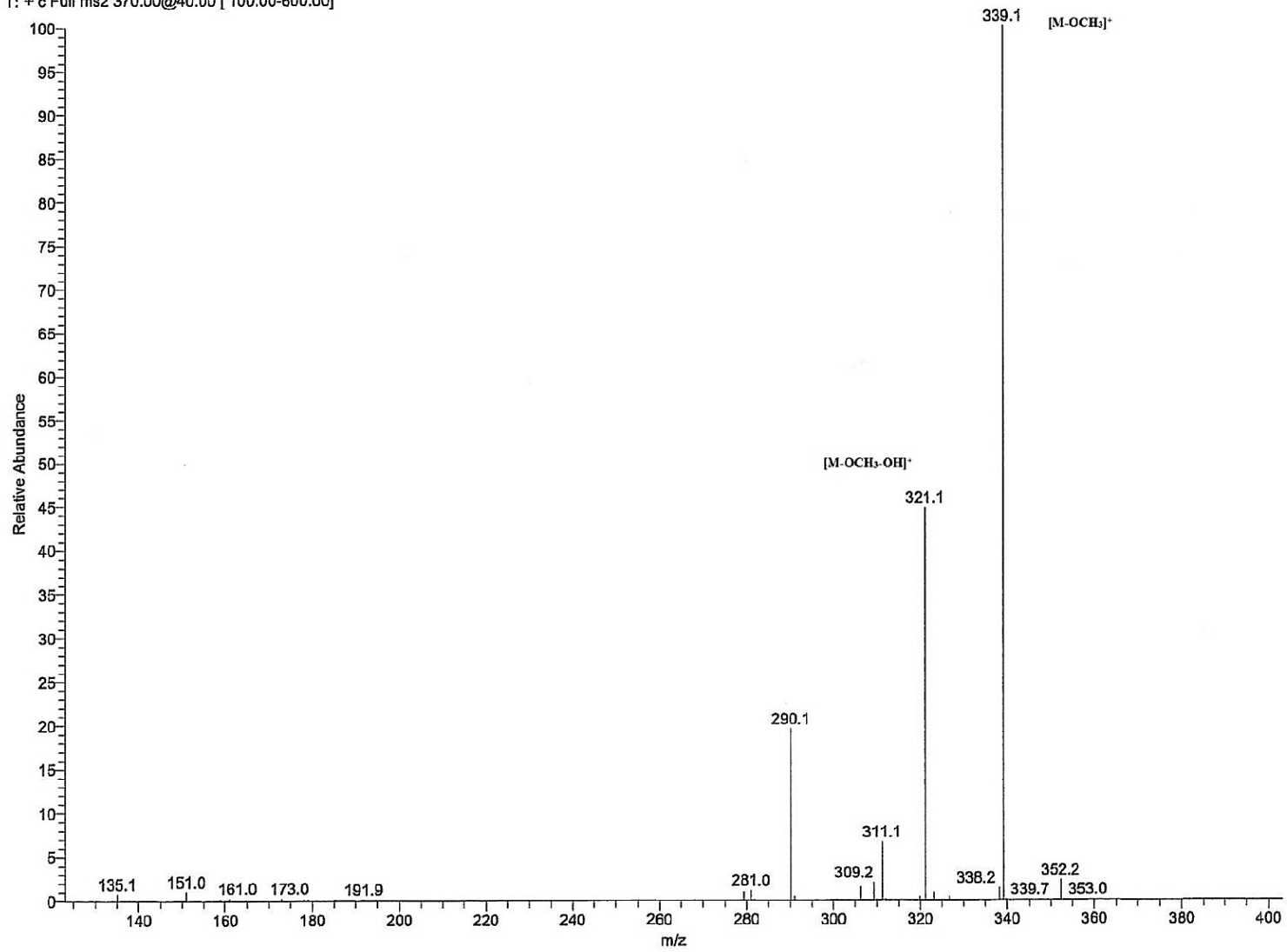
Obr. 29: MS2 spektrum chelidoninu

LLC 65 Homochelidonine #1 RT: 0.00 AV: 1 NL: 3.29E7
T: + c Full ms [95.00-600.00]



Obr. 30: MS spektrum homochelidoninu

LLC 65 Homochelidonine MS2 #1 RT: 0.01 AV: 1 NL: 1.17E7
T: + c Full ms2 370.00@40.00 [100.00-600.00]



Obr. 31: MS2 spektrum homochelidoninu

5.3 Inhibiční aktivita vůči erytrocytární AChE a sérové BuChE

Izolované látky byly podrobeny studii jejich inhibiční aktivity vůči lidské erytrocytární acetylcholinesteráze a sérové butyrylcholinesteráze. Výsledky hodnot IC_{50} jsou shrnuty v následující tabulce (Tab. 4).

Tab. 4: *In vitro* inhibiční aktivita izolovaných alkaloidů (1, 2) vůči HuAChE a HuBuChE

Látky	IC_{50} (μM) ^a	
	HuAChE	HuBuChE
Chelidonin (1)	26,8 ± 1,2	31,9 ± 1,4
Homochelidonin (2)	350 ± 6,7	62,3 ± 2,9
Gаланthamin ^b	6,9 ± 0,3	156 ± 6,9
Huperzin ^b	0,25 ± 0,01	> 1000

^a Každé měření bylo opakováno třikrát

^b Referenční látka

5.4 Antioxidační aktivita alkaloidů

Izolované látky byly podrobeny studii jejich antioxidační aktivity. Výsledky hodnot EC_{50} jsou shrnuty v následující tabulce (Tab. 5).

Tab. 5: Antioxidační aktivita alkaloidů (1, 2)

Látky	EC_{50} (μM) ^a
Chelidonin (1)	> 1000
Homochelidonin (2)	> 1000
Kvercetrin ^b	25,3
Trolox ^b	27,8

^a Každé měření bylo opakováno třikrát

^b Referenční látka

6 DISKUSE A ZÁVĚR

Stárnutí populace a s tím související vyšší výskyt neurodegenerativních onemocnění se v dnešní společnosti stává stále naléhavějším problémem. Alzheimerova choroba je spolu s vaskulární demencí nejčastější příčinou demencí ve starším věku. Bohužel neznáme příčinu vzniku AD, takže není možná kauzální léčba. Terapie se zaměřuje na ovlivnění důsledků nemoci, tedy symptomů.

Na Katedře farmaceutické botaniky a ekologie Farmaceutické fakulty UK v Hradci Králové probíhá screening vybraných rostlin čeledi *Papaveraceae*, *Fumariaceae* a *Amaryllidaceae*, které jsou testovány na aktivitu vůči erytrocytární AChE a sérové BuChE. Vzhledem ke skutečnosti, že v progresi AD významnou roli hraje oxidační stres, jsou extrakty i izolované látky testovány na jejich antioxidační aktivitu (DPPH test). Testům byl podroben i *Chelidonium majus* z čeledi *Papaveraceae*, protože se předpokládala určitá aktivita vzhledem k příbuznosti s rostlinami, které anticholinesterázovou aktivitu vykazují (*Sanguinaria canadensis*, rod *Berberis*).

Cílem této rigorózní práce, která navazovala na diplomovou práci, bylo izolovat další alkaloidy z výtřepku chloridy nerozpustné v chloroformu získaného z *Chelidonium majus* a stanovit jejich biologickou aktivitu. Za použití sloupcové chromatografie a preparativní TLC se podařilo izolovat další dvě sloučeniny. Obě izolované látky pozitivně reagovaly s Dragendorfovým činidlem, z čehož plyne, že se jednalo o alkaloidní sloučeniny. Na základě strukturní analýzy (NMR, MS) a porovnání dat v literatuře byly látky identifikovány jako benzofenantridinové alkaloidy chelidonin a homochelidonin^{53, 54}.

Oba alkaloidy byly z rostliny *Chelidonium majus* izolovány již dříve a jsou pro tuto rostlinu charakteristické. V literatuře je popsána izolace chelidoninu z další rostliny a to *Berberis sibirica*⁵⁵.

Chelidonin byl poprvé izolován v roce 1924 Godefroyem²¹. Má spasmolytické účinky na hladkou svalovinu bronchů, dělohy a GIT. Rovněž vykazuje cholagogický a choleretický účinek.

U získané dvojice alkaloidů byla studována inhibiční aktivita vůči humánní erytrocytární acetylcholinesteráze a sérové butyrylcholinesteráze pomocí Ellmannovy spektrofotometrické metody, která využívá k důkazu testované látky 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoovou kyselinu (DTNB). Inhibitory AChE jsou v současné době v popředí zájmu vědců, zabývajících se vývojem nových léčiv na Alzheimerovu chorobu. Hledají se látky, které by i současně inhibovaly BuChE, protože i ona má významný podíl na odbourávání acetylcholinu v CNS, především v pokročilých stádiích AD její koncentrace výrazně stoupá

Získané hodnoty IC_{50} byly porovnány se standardy, které se používají v terapii AD, a to galantaminem (pro AChE byly $6,9 \pm 0,3 \mu\text{M}$, pro BuChE $156 \pm 6,9 \mu\text{M}$) a IC_{50} huperzinem A (pro AChE $0,25 \pm 0,01 \mu\text{M}$ a pro BuChE $>1000 \mu\text{M}$). Zajímavé hodnoty IC_{50} vůči HuAChE a HuBuChE byly získány u chelidoninu (IC_{50} $26,8 \pm 1,2 \mu\text{M}$ pro HuAChE a $31,9 \pm 1,4 \mu\text{M}$ pro HuBuChE). Především v případě inhibice HuBuChE byly získány lepší výsledky než-li u galantaminu. Tato látka se jeví zajímavá a mohla by sloužit jako „lead-structure“ pro případné parciální obměny. Ve studii, kterou provedla Kuznetsova a kol. (2002), bylo zjištěno, že chelidonin je kompetitivní inhibitor obou cholinesteráz¹⁰.

Hodnoty IC_{50} získané pro homochelidonin byly vyšší, pro AChE $350 \pm 6,7 \mu\text{M}$ a pro BuChE $62,3 \pm 2,9 \mu\text{M}$. Z toho plyne, že tato látka nevykazuje zajímavou aktivitu a nejspíše nebude využitelná v hledání nových potenciálních léčiv využitelných pro terapii AD.

V patogenezi Alzheimerovy choroby se uplatňují i volné kyslíkové radikály, proto byla u obou alkaloidů testována i jejich antioxidační aktivita (DPPH test). Protože výsledné hodnoty EC_{50} obou testovaných alkaloidů byly vyšší než $1000 \mu\text{M}$, lze konstatovat, že nejsou terapeuticky využitelné jako lapače volných kyslíkových radikálů⁵².

7 POUŽITÁ LITERATURA

1. Broncová D.: Historie farmacie v českých zemích, Praha, Milton 2003, 174 s.
2. Rusek V., Smečka V.: České lékárny, Praha, Nuga 2000, 145 s.
3. Hubík J.a kol.: Farmakognosie II, Praha, Státní pedagogické nakladatelství 1981, 274 s.
4. Svobodný P., Hlaváčková L.: Dějiny lékařství v českých zemích, Praha, Triton 2004, 248 s.
5. Suchomelová J., Táborská E.: HPLC studium kvartérních benzofenanthridinových alkaloidů ve vybraných rostlinných druzích čeledi *Papaveraceae*, Masarykova univerzita, Lékařská fakulta v Brně, Biochemický ústav, disertační práce, 2007, 81 s.
6. Dewick P.: Medicinal natural products, Wiley J. a. Sons 2002, 292, 339-341 s.
7. Hu W., Wang M-H.: Antioxidant and Antiproliferative Activities of Methanolic Extract from Celadine, *Food Sci. Biotechnol.* 18, 1., 207-212 (2009).
8. Colombo M. L., Bosisio E.: Pharmacological activities of *Chelidonium majus* L. (Papaveraceae), *Pharmacol. Res.* 33, 2., 127-133 (1996).
9. Meng F., Zuo G., Hao X., Wang G., Xiao H., Zhang J., Xu G.: Antifungal activity of the benzo[*c*]benzophenanthridine alkaloids from *Chelidonium majus* Linn against resistant clinical yeast isolates, *J. Ethnopharmacol.* 125, 496-497 (2009).
10. Kuznetsova L. P., Nikoľskaya E. B., Sochilina E. E., Faddeeva M. D.: Inhibition of Human Blood Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase by some Alkaloids, *J. Evol. Biochem. Phys.* 38, 1., 35-39 (2002).
11. Kábrt J., Kábrt J. jr.: *Lexicon medicum*, Praha, Galén 2004, 643 s.
12. Jiráček R.: Diagnostika a terapie Alzheimerovy choroby, *Neurol. praxe*, 4, 224-227 (2008)
13. Hostettmann K., Borloz A., Urbain A., Marston A.: Natural Products Inhibitors of Acetylcholinesterase, *Curr. Org. Chem.* 10, 834-835 (2006).
14. Henry T. A.: *The plant alkaloids*, Totonto, The Blakiston Company 1949, 466 s.
15. Patočka J.: Jak může toxikologický výzkum mravenců nebo žab prospět psychiatrii?, *Psychiatrie* 4, 243-246 (2000).

16. Dostál J., Slavík J.: Novější poznatky o sanguinarinu a příbuzných alkaloidech, Chem. Listy 94, 15-20 (2000).
17. <http://www.biotox.cz/toxikon/rostliny/alkaloidy.php>, (staženo: 5.7.2011).
18. <http://www.liberherbarum.com/Minor/CZ/IN1577.htm> (staženo: 5.7.2011).
19. Slavík J., Slavíková L.: Minor alkaloids from *Chelidonium majus*, Collect. Czech. Chem. C. 42, 2686-2694 (1977).
20. Lincová D., Fargalli H.: Základní a aplikovaná farmakologie, Praha, Galén 2007, 622 s.
21. Slavík J.: Alkaloidy rostlin makovitých (*Papaveraceae*) I., Látky z vlašovičnicku (*Chelidonium majus* L.), Chem. Listy 48, 15-17 (1954).
22. Táborská E., Bochořáková H., Dostál J., Paulová H.: Vlaštovičnick větší (*Chelidonium majus* L.) – přehled současných poznatků, Česk. Slov. Farm., 44, 71-75 (1995).
23. Jahodář L.: Farmakobotanika, Praha, Karolinum 2006, 52-54 s.
24. Korbelař J., Endris Z.: Naše rostliny v lékařství, Praha, Avicenum 1981, 450 s.
25. <http://www.zahady-zdravi.cz/data/sharedfiles/obrazky/clanky/hlavni-fotka/Vlaštovičnick%20větší,%20zdroj%20Wikipedia%20Commons-jpg/pOverview.jpg> (staženo: 5.7.2011).
26. Čihař J. a kol.: Příroda v ČSSR, Praha, Práce 1988, 84 s.
27. <http://www.cestabylin.mypage.cz/menu/herbar/makovite> (staženo: 5.7.2011).
28. <http://botanika.wendys.cz/kytky/K261.php> (staženo: 5.7.2011).
29. Veselský Z., Vanžura M.: Komplexní problematika parafarmak v léčbě benigní hyperplazie prostaty, psychologie nemocného muže, Med. Prax, 6, 302-304 (2006).
30. Boiron M., Parge-Ficot A.: Homeopatie rady pro každý den, Boiron 1996, 11-13 s.
31. Demarque D., Jouanny J., Poievin B., Saint-Jean Y.: Farmakologie a materia medica homeopatica, Boiron a Cedk 1998, 116-117 s.
32. Marek R.: Strukturně – reaktivní vztahy isochinolinových alkaloidů, Chem. Listy 96, 914 (2002).

33. Sethi M. L.: Enzyme Inhibition VI: Inhibition of Reverse Transcriptase Activity by Protoberberine Alkaloids and Structure-Activity Relationships, *J. Pharm. Sci.* 72, 538-541 (1983).
34. Hbjtmankova N., Walterova D., Preininger V.: Antifungal activity of quaternary benzo[c]phenanthridine alkaloids from *Chelidonium majus*, *Planta Med.* 43, 161-165 (1981).
35. Cordes N., Plasswilm L., Bamberg M., Rodemann H. P.: Ukrain, an alkaloid thiophosphoric acid derivative of *Chelidonium majus* L. protects human fibroblasts but not human tumour cells in vitro against ionizing radiation, *Int. J. Biol.* 78, 1, 17-27 (2002).
36. Korabecny J., Musilek K., Holas O., Binder J., Zemek F., Marek J., Pohanka M., Opletalova V., Dohnal V., Kuca K.: Synthesis and in vitro evaluation of *N*-alkyl-methoxytacrine hydrochlorides as potential cholinesterase inhibitors in Alzheimer disease, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 20, 6093-6095 (2010).
37. Song J-Y., Yang H-O., Shim J-Y., Ahn J-Y., Han Y-S., Jung I-S., Yun Y-S.: Radiation Protective Effect of an Extract from *Chelidonium majus*, *Int. J. Hematol.* 78, 226-232 (2003).
38. Banerjee A., Pathak S., Biswas S. J., Roy-Karmakar S., Bujedaini N., Belon P., Khuda-Bukhsh: *Chelidonium majus* 30C and 200 C in induced hepato-toxicity in rats, *Homeopathy*, 167-176 (2010).
39. Vokurka M., Hugo J.: *Velký lékařský slovník*, Praha, Maxdorf 2009, 1144 s.
40. Hartl J. a kol.: *Farmaceutická chemie II/1*, Praha, Karolinum 2001, 106 s.
41. Lullman H.: *Farmakologie a toxikologie*, Praha, Grada 2004, 725 s.
42. Hart J a kol.: *Farmaceutická chemie II/2*, Praha, Karolinum 2001, 148 s.
43. Hynie S.: *Speciální farmakologie V.*, Praha, Karolinum 1999, 161 s.
44. Koukolík F., Jiráček R.: *Alzheimerova nemoc a další demence*, Praha, Grada 1998, 227 s.
45. Jiráček R.: Farmakoterapie Alzheimerovy choroby, *Čes. Ger. Rev.*, 2., 10-12 (2003).
46. Rössner P.: Alzheimerova choroba – diagnostika a léčba, *Neurol. Prax.*, 1, 11-16 (2004).

47. Hort J., Vyhnálek M., Bojar M.: Časná stadia demence - možnosti diagnostiky a léčby, *Neurol. Prax.*, 6, 308-311 (2005).
48. Stahl, E.: *Thin-layer Chromatography, A Laboratory Handbook*, Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York, 1969.
49. Novotná M.: Biologicky aktivní metabolity rostlin 2. Alkaloidy *Chelidonium majus* L. a jejich inhibiční aktivita vůči acetylcholinesteráze, UK v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Hradec Králové, diplomová práce, 2010, 64 s.
50. Hrabálek A. a kol.: *Chemická laboratorní technika*, Praha, Karolinum 2000, 113-114 s.
51. Steck T. L., Kant J. A.: Preparation of impermeable ghosts and inside-out vesicles from human erythrocyte membranes, *Method. Enzymol.* 31, 172 (1974).
52. Cahlíková L., Hořčíčková Z., Opletal L., Macáková K., Kufírst M.: Isochinolinové alkaloidy a jejich biologická aktivita, 38. Konference Syntéza a analýza léčiv, 14-16., Hradec Králové, Sborník abstraktů Faf v Hradci Králové, 73 (září 2009).
53. Bozhadze A., Mshvildadze V., Vachnadze V., Tsitsishvili V., Bakuridze A.: Analytical studies of (+)-chelidonine, protopine and *l*-stylopine in *Chelidonium majus* growing in Georgia using high performance liquid chromatography, *Chem. Nat. Compd.* 47, 3, 477 (2011).
54. Necas M., Dostal J., Kejnovska I., Vorlickova M., Slavik J.: Molecular and crystal structures of (+)-homochelidonine, (+)-chelamine, and (+)-norchelidonine, *J. Mol. Struct.* 734, 1-6 (2005).
55. Istatkova R., Philipov S., Tuleva P., Amgalan S., Samdam J., Dangaa S.: Alkaloids from Mongolian species *Berberis sibirica* Pall., *CR. Acad. Bulgar. Sci.* 60, 1177-1182 (2007).

8 SEZNAM ZKRATEK

AChE	acetylcholinesteráza
AD	Alzheimerova choroba
BuChE	butyrylcholinesteráza
CH, DH	označení ředění používaných v homeopatii
CNS	centrální nervová soustava
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DPPH	2,2'-difenyl-1-pikrylhydrazyl
DTNB	5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ERAB	vazebný protein vyskytující se v endoplazmatickém retikulu
GABA	kyselina gama-aminomáselná
GIT	gastrointestinální trakt
HEB	hematoencefalická bariéra
<i>Ch. majus</i>	<i>Chelidonium majus</i>
IL	interleukin
MAO	monoaminoxidáza
MIC	minimální inhibiční koncentrace
MR	magnetická rezonance
MS	hmotnostní spektrometrie
NMR	nukleární magnetická rezonance
NSAID	nesteroidní antiflogistika
NMDA	N-metyl-D-aspartát
RNA	ribonukleová kyselina
RT	reverzní transkriptáza
TLC	tenkovrstvá chromatografie
TNF α	tumor nekrotizující faktor

ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické botaniky a ekologie

Kandidát: Novotná Magdalena, Mgr.

Konzultant: Cahlíková Lucie, Ing., Ph.D.

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

Předmětem této rigorózní práce, která navazuje na diplomovou práci, bylo zpracovat druhou polovinu alkaloidního výtřepku z *Chelidonium majus*, chloridů nerozpustných v chloroformu, za účelem izolace zbývajících alkaloidů v čisté formě, otestovat jejich biologickou aktivitu vůči lidským cholinesterázám (HuAChE, HuBuChE) a stanovit jejich antioxidační aktivitu.

Po rozdělení pomocí sloupcové chromatografie byly oba alkaloidy přečištěny pomocí preparativní chromatografie. Na základě strukturní analýzy (NMR, MS) a porovnání dat v literatuře byly látky identifikovány jako chelidonin a homochelidonin.

U obou alkaloidů byla stanovena jejich aktivita vůči lidským cholinesterázám (HuAChE, HuBuChE). Získané hodnoty IC_{50} byly porovnány se standardy, které se používají v terapii Alzheimerovy choroby (galantamin a huperzin A). Zajímavé hodnoty IC_{50} vůči HuAChE a HuBuChE byly získány u chelidoninu (IC_{50} $26,8 \pm 1,2 \mu\text{M}$ pro HuAChE a $31,9 \pm 1,4 \mu\text{M}$ pro HuBuChE), a to především v případě inhibice HuBuChE. Tato látka se jeví zajímavá a mohla by sloužit jako „lead-structure“ pro případné parciální obměny. Hodnoty IC_{50} získané pro homochelidonin byly vyšší, pro AChE $350,0 \pm 6,7 \mu\text{M}$ a pro BuChE $62,3 \pm 2,9 \mu\text{M}$. Tato látka tedy nevykazuje zajímavou aktivitu a nejspíše nebude využitelná v hledání nových potenciálních léčiv využitelných pro terapii Alzheimerovy choroby.

Oba alkaloidy byly testovány i na antioxidační aktivitu, výsledky však z hlediska terapie Alzheimerovy choroby nejsou zajímavé.

ABSTRACT

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmaceutical Botany and Ecology

Candidate: Novotná Magdalena, Mgr.

Consultant: Cahlíková Lucie, Ing., Ph.D.

Thesis title: Biologically Active Metabolites of Plants. IV. Alkaloids from *Chelidonium majus* L. and Their Neurotropic and Antioxidant Activity

The aim of this thesis, which follows the diploma thesis, was to process the second half pool of alkaloids of *Chelidonium majus*, chlorides insoluble in chloroform, to isolate the remaining alkaloids in a pure form, to test their biological activity against two human cholinesterases (HuAChE, HuBuChE) and to determine their antioxidant activity.

After division by column chromatography, the two alkaloids were purified using preparative chromatography. Based on structural analysis (NMR, MS) and comparison of data from the literature, the substances have been identified being chelidonine and homochelidonine.

The activity of both alkaloids against two human cholinesterase (HuAChE, HuBuChE) was determined. Experimentally obtained IC_{50} values were compared with the standard drugs, that are used in the treatment of the Alzheimer's disease (galantamine and huperzin A). Chelidonine exhibited promising IC_{50} values towards HuAChE and HuBuChE (IC_{50} $26.8 \pm 1.2 \mu\text{M}$ HuAChE and $31.9 \pm 1.4 \mu\text{M}$, respectively), especially the inhibition activity of HuBuChE is significant. This substance could be considered being a lead-structure for possible partial modifications. IC_{50} values obtained from homochelidonine evaluation were higher for HuAChE $350.0 \pm 6.7 \mu\text{M}$, $62.3 \pm 2.9 \mu\text{M}$ for HuBuChE. It means, that the substance doesn't show an interesting activity, and it isn't probably useful for researching of new potential drugs for the treatment of the Alzheimer's disease.

Both alkaloids were tested on the antioxidant activity, but the results in the point of view of the treatment of the Alzheimer's disease haven't been interesting.