

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA FARMACEUTICKÉ BOTANIKY A EKOLOGIE

Hodnocení alkaloidů pomocí *in vivo* testů s *Artemia salina* II.

Evaluation of alkaloids using *in vivo* tests with *Artemia salina* II.

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Jitka Vytlačilová, Ph.D.

Vedoucí katedry: Doc. Ing. Lucie Cahlíková, Ph.D

Hradec Králové 2015

Beáta Bystroňová

PROHLÁŠENÍ:

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. 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.

Beáta Bystroňová

Děkuji RNDr. Jitce Vytlačilové, Ph.D. za odborné vedení, pomoc se zpracováním výsledků, poskytnutí materiálů a všechny cenné rady a připomínky při psaní mé diplomové práce.

Beáta Bystroňová

| | |
|--|----|
| 1. Úvod..... | 6 |
| 1.1. Cíl práce..... | 9 |
| 2. Teoretická část..... | 10 |
| 2.1. <i>Artemia salina</i> , Linnaeus, 1758..... | 11 |
| 2.1.1. Taxonomické zařazení..... | 11 |
| 2.1.2. Anatomie a morfologie..... | 12 |
| 2.1.3. Vývoj..... | 17 |
| 2.1.4. Osmoregulace..... | 18 |
| 2.1.5. Využití..... | 19 |
| 2.1.5.1. Solární produkce soli..... | 19 |
| 2.1.5.2. Akvaristika..... | 19 |
| 2.1.5.3. Věda..... | 20 |
| 2.1.6. odolnost <i>Artemia salina</i> | 21 |
| 2.1.6.1. Diapauzální cysta..... | 21 |
| 2.1.6.2. Rehydratovaná a aktivovaná cysta..... | 22 |
| 2.1.6.3. Odolnost vůči teplu..... | 23 |
| 2.1.7. Celosvětové rozšíření..... | 24 |
| 2.2. Alkaloidy..... | 25 |
| 2.2.1. Charakteristika..... | 25 |
| 2.2.2. Rozdělení alkaloidů..... | 26 |
| 2.2.2.1. Tropanové alkaloidy..... | 26 |
| 2.2.2.2. Chinolizidinové alkaloidy..... | 27 |
| 2.2.2.3. Steroidní alkaloidy..... | 27 |
| 2.2.2.4. Purinové alkaloidy..... | 28 |
| 2.2.2.5. Pyrrolizidinové alkaloidy..... | 28 |
| 2.2.2.6. Pyridinové alkaloidy..... | 28 |
| 2.2.2.7. Alkaloidy typu fenylethylaminu..... | 29 |
| 2.2.2.8. Indolové alkaloidy..... | 29 |
| 2.2.2.9. Isochinolinové alkaloidy..... | 31 |
| 2.2.2.9.1. Stylopin..... | 32 |
| 2.2.2.9.2. Tetrahydropalmatin..... | 33 |
| 2.2.2.9.3. Kanadin..... | 34 |
| 2.2.2.9.4. Skulerin..... | 35 |

| | | |
|----------|--------------------------------------|----|
| 3. | Experimentální část..... | 36 |
| 3.1. | Použitá metoda | 37 |
| 3.2. | Testovaný organismus | 37 |
| 3.3. | Použitý materiál | 39 |
| 3.3.1. | Chemikálie..... | 39 |
| 3.3.2. | Pomůcky a přístroje | 40 |
| 3.4. | Pracovní postup | 41 |
| 3.4.1. | Příprava | 41 |
| 3.4.1.1. | Příprava mořské vody | 41 |
| 3.4.1.2. | Příprava testovaného organismu | 42 |
| 3.4.1.3. | Příprava testovaných látek..... | 42 |
| 3.5. | Vlastní provedení pokusu | 42 |
| 3.6. | Vyhodnocení výsledků | 44 |
| 4. | Výsledky | 45 |
| 4.1. | STYLOPIN..... | 46 |
| 4.2. | TETRAHYDROPALMATIN | 47 |
| 4.3. | KANADIN | 48 |
| 4.4. | SKULERIN..... | 49 |
| 4.5. | Chlorid manganatý..... | 50 |
| 5. | Diskuse | 51 |
| 6. | Závěr..... | 56 |
| 7. | Seznam zkratk | 58 |
| 8. | Seznam použité literatury..... | 60 |
| | Abstrakt..... | 67 |
| | Abstract..... | 68 |

1. ÚVOD

Alzheimerova choroba (AD) je nejčastější příčinou demence u starších osob^[2]. Je to chronické neurodegenerativní onemocnění mozku, charakterizované poruchou více korových funkcí, včetně paměti (hlavně krátkodobé), úsudku, orientace, chápání, schopnosti učení a jazyka^{[1] [3]}. Může být doprovázená depresi, strachem nebo paranoiou^[1]. Na vzniku se podílejí faktory vnějšího prostředí (stres, toxiny, priony, viry) i genetické vlivy^[2].

Makroskopickým projevem tohoto onemocnění je atrofie mozku. V důsledku redukce bílé hmoty dochází k rozšíření mozkových komor^[4]. Nejdůležitějším mikroskopickým znakem jsou senilní plaky. Senilní plaky, jinak zvané senilní drúzy, jsou chuchvalce amyloidních fibril. Obsahují extracelulární amyloid a kromě toho ještě deformované dendrity a axony s abnormálními intracelulárními neurofibrilami^[5]. Senilní plaky se mohou vyskytovat i u osob bez klinické odezvy^[4]. Specifická pro AD je jejich velká četnost a hustota výskytu^[2]. Vznik těchto netypických cytoskeletálních elementů často vede k zániku neuronů^[5].

Ke snížení počtu nervových buněk dochází v různých částech mozku, především v hippokampu, s tím je spojená i snížená tvorba neurotransmiterů v mozku, hlavně acetylcholinu. Typická pro toto onemocnění je snížená koncentrace acetylcholintransferázy až o 90 %^[5]. Ve zdravém mozku je acetylcholinesteráza (AChE) nejdůležitější enzym regulující hladinu acetylcholinu^[16]. Dochází však k poklesu koncentrace i u dalších neurotransmiterů, například noradrenalinu, serotoninu nebo somatotropinu^[5].

Terapie AD je symptomatická, nemoc nelze vyléčit. Existují však látky, které dokáží průběh nemoci zpomalit^[1]. Mezi nejdůležitější a současně i nejpoužívanější patří inhibitory AChE^{[1] [16]}.

Vzhledem k progresivnímu charakteru nemoci, jsou zapotřebí terapeutické prostředky proti AD působící na různých patologických úrovních. V posledních letech jsou intenzivně studovány přírodní látky, které by mohly farmakologicky ovlivnit neurodegenerativní procesy AD^[43].

Jednou z výzkumných skupin, zabývajících se Alzheimerovou chorobou je skupina ADINACO, která působí na Farmaceutické fakultě Univerzity Karlovy v Hradci Králové. Skupina izoluje látky (alkaloidy) z rostlin a hub v sekci *Eumycota*, provádí jejich identifikaci a stanovení biologické aktivity. Potencionálně účinné látky ovlivňující vývoj Alzheimerovy choroby, jsou podrobeny dalšímu výzkumu ^[44]. Zde patří i hodnocení akutní toxicity, na které je zaměřena tato diplomová práce.

1.1. CÍL PRÁCE

Cílem této diplomové práce bylo zavést metodu toxikologického screeningu pomocí bezobratlého organismu *Artemia salina* pro testování přírodních látek, následně pomocí této metody vyhodnotit 4 látky. Zkoušené látky se řadí k alkaloidům, jsou to: skulerin, kanadin, tetrahydropalmatin a stylopin.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. ARTEMIA SALINA, LINNAEUS, 1758

2.1.1. TAXONOMICKÉ ZAŘAZENÍ



obr. 1: *Artemia salina*, L. převzato z © mirrir.co.uk ^[70]

říše: *ANIMALIA* (ŽIVOČICHOVÉ)

kmen: *ARTHROPODA* (ČLENOVCI)

podkmen: *CRUSTACEA* (KORÝŠI)

třída: *Brachiopoda* (lupenonožci)

řád: *Anostraca* (žábronožky)

rod: *Artemia*

druh: *Artemia salina* (žábronožka solná) ^[28]

2.1.2. ANATOMIE A MORFOLOGIE

kmen: ARTHROPODA (ČLENOVCI)

Kmen členovci je druhově nejpočetnější skupina organismů s vysokým stupněm tělesné organizace. Tělo se skládá z několika segmentů a ty splývají ve větší celky. Končetiny jsou článkované, jednotlivé články jsou spojeny kloubovitě a tak jsou také připojeny k tělu. Tělo i končetiny jsou kryté chitinem ^[27] ^[28].

Členovci jsou gonochoristi, s častým pohlavním dimorfismem ^[28].

podkmen: CRUSTACEA (KORÝŠI)

Korýši jsou převážně vodní členovci, jen minimum druhů je suchozemských a i ti preferují vysokou vzdušnou vlhkost. Tělo je článkované, dělí se na oddíly: hlava, hrud' a zadeček. Hrudní články často srůstají s hlavovým oddílem za vzniku hlavohrudi. U starobylých forem se tělo člení na hlavu a trup (*truncus*). Povrch těla je krytý kutikulou, která může být silně inkrustovaná uhličitanem vápenatým CaCO_3 a vytvářet tak krunýř ^[25] ^[28].

Hlava je tvořena 6 články. První článek (*akron*) je bez končetin, následující články nesou orgány končetinového původu (tykadla, kusadla, čelisti). Komplexně se hlavové končetiny nazývají *cephalopody* ^[28].

Hrud' je tvořena různým počtem článků. Končetiny (*thoracopody*) na prvních třech člancích jsou často změněny v čelistní nožky (*maxillipedy*). Ostatní hrudní končetiny mají pohybovou funkci nebo slouží k dýchání, rozmnožování či filtraci potravy ^[25] ^[28].

Končetiny mohou být jednovětevné (slouží k lezení) nebo dvouvětevné (ty většinou slouží k plavání, dýchání, filtraci potravy aj.). Dvouvětevné končetiny se skládají z části nerozeklané (*protopodit*) a z části rozeklané (*exopodit* a *endopodit*) ^[28].

Zadeček je obvykle bez končetin, výjimku tvoří třída *Malacostraca* (rakovci). Poslední tělní článek (*telson*) je bez končetin a bývá zde i řitní otvor. *Telson* může být opatřen vidličkou (*furka*) nebo ploutvičkou ^[25] ^[28].

Trávicí soustava je trubicovitá, u jednotlivých skupin korýšů je různě diferencovaná. Do střeva ústí vývodní jaterní žlázy (*hepatopankreas*) různého tvaru ^[28].

Dýchání zajišťují žábry, které jsou umístěny ve formě epipoditových přívěšků na končetinách. Suchozemské formy dýchají pomocí vzdušnicových plic. Někteří korýši, hlavně malé formy, mohou dýchat celým povrchem těla ^{[25] [28] [30]}.

Cévní soustava je otevřená s dominující dorzální cévou. U některých nižších skupin korýšů je cévní soustava zredukovaná na srdce (perloočky) nebo úplně vymizela (klanonožci) ^{[28] [30]}.

Vylučovací orgány (modifikovaná *metanefridia*) jsou umístěny buď u báze druhého páru čelistí (maxilární žlázy) nebo u báze druhého páru tykadel (antenální žlázy) ^{[25] [28]}.

U nižších tříd korýšů tvoří nervovou soustavu párovitá ganglia v jednotlivých člancích těla. Největší je první ganglion (nadhltanový). U některých tříd dochází ke splývání ganglií v hlavě s vytvořením mozkového ganglia. Smyslové orgány mechanoreceptory a chemoreceptory jsou umístěné na tykadlech. Oči mohou být jednoduché a pohárkové (naupliová očka) nebo složené ^{[25] [28]}.

Korýši jsou zpravidla gonochoristi. Mají párovité pohlavní žlázy s párovitými vývody. U nižších tříd korýšů pozorujeme nápadný pohlavní dimorfismus – samci jsou menšího věku a jejich rozmnožovací končetiny jsou velmi nápadné. Vývoj probíhá přímo nebo přes larvální stádium. Základními typy larev jsou *nauplius* a *zoea*. *Nauplius* se vytváří u všech tříd korýšů, pouze u třídy *Malacostraca* výjimečně. Má oválné tělo, první tři páry končetin a jednoduché naupliové očko. *Zoea* se vytváří pouze u třídy *Malacostraca*, převážně u mořských druhů. Některé třídy se rozmnožují pomocí partenogenese. ^{[25] [28]}.

třída: *Brachiopoda* (lupenonožci)

Charakteristickým znakem jsou lupenité nožky, které slouží k filtraci potravy, pohybu a dýchání – nacházejí se zde žábry. Mnoho druhů žije pouze v periodických stojatých vodách ^{[25] [28]}.

řád: Anostraca (žábronožky)

Tělo žábronožek tvoří hlava, 11 hrudních článků a 9 zadečkových článků s *furkou*. Tělo je dlouze protáhlé, ze stran mírně zmáčknuté, bez ochranného krunýře. Je jantarově zbarvené a asi dva centimetry dlouhé. Tykadla samečků se podstatně liší od samičích. Na hlavě se nachází složené oči na stopkách a mezi nimi je umístěno jednoduché naupliové očko. Hrudní nožky mají různé funkce. Larválním stádiem je *nauplius*. Celkem je známo přes 180 druhů žábronožek. Identifikace jednotlivých druhů a poddruhů bývá dost obtížná, neboť žábronožky dokážou měnit vnější vzhled podle prostředí ^{[27] [28] [29]}.

druh: Artemia salina (žábronožka solná)

Je typický primitivní členovec se segmentovaným tělem. Patří mezi kosmopolitně rozšířený druh. Žije ve stojatých vodách, často v přímořských tůních a slaných jezerech. *Artemia salina* je natolik přizpůsobivá, že je schopná žít ve slané, brakické i sladké vodě, je tedy euryhalinním organismem ^{[25] [26] [28] [34]}.

Název je odvozen z řeckého *an* = bez, *ostrakon* = skořápka, nemají tedy ochranný krunýř. Celková délka těla u samečků je okolo 8-10 mm, u samiček kolem 10-12 mm. Šířka obou pohlaví, včetně nohou, je kolem 4 mm. Tělo je rozděleno na hlavu, hrud' a zadeček. Podle potravy a koncentrace kyslíku ve vodě dokážou měnit barvu od zelenavé po jasně červenou ^{[25] [26] [29]}.

Hlava (*cephalon*) představuje nejspecializovanější část těla. Najdeme zde vyvinuté smyslové a nervové tkáně, komplex svalového a kosterního systému. Je zde umístěná i část trávicího systému a exkrečních orgánů. Má šest segmentů: první segment (*akron*) je bez tykadel, za ním následuje 5 metamerních (opakujících se) článků. Každý z těchto pěti článků nese pár končetin. Z prvního článku vyrůstají malá prvotní tykadla (*antenuly*) – poddajné, válcovité trubičky, které lze ohnout všemi směry. Druhý článek nese pár tykadel (*anteny*), u samečků jsou velmi mohutné ve tvaru kleští, slouží k přidržování samičky během kopulace (tzv. objímavé končetiny). K třetímu článku jsou připojena kusadla (*mandibuly*). Každé kusadlo je vybaveno zuby. Čtvrtý a pátý článek nese čelisti (*maxily*) ^{[26] [30]}.

Hrud' (*thorax*) je tvořena jedenácti články, z nichž každý nese na břišní straně pár rozeklaných nožek. Mají různou funkci: slouží k pohybu (plavání), dýchání, výživě a osmoregulaci. Plovací nožky na prvním a jedenáctém segmentu jsou nejmenší, směrem ke středu hrudi se jejich velikost zvětšuje. Trny a brvy na končetinách značně rozšiřují funkční oblast nohou a tím výrazně usnadňují plavání. Brvy jsou také efektivním nástrojem k filtrování potravy. Typické je plavání hřbetem dolů, žábřonožky se přetáčejí pouze výjimečně (při víření a filtraci sedimentu) ^{[25] [26] [30]}.

Zadeček (*abdomen*) se skládá z osmi kruhových článků, na kterých jsou umístěny pohlavní orgány: párový penis nebo vaječný vak. Druhý až sedmý segment je bez přívěsků. Osmý segment je dlouhý, pravděpodobně vznikl spojením dvou článků a je zakončen vidličkou ^{[26] [30]}.

Celé tělo pokrývá tenký, ohebný chitinový exoskelet, ke kterému jsou z vnitřní strany upevněny příčně pruhované svaly. Kutikula je rozdělena do tří tenkých vrstev. Larvy mívají kutikulu přibližně stejně tlustou na všech částech těla (0,3 až 1,0 μm), kdežto u dospělých jedinců je její tloušťka různá v závislosti na části těla. Chitinový exoskelet je během růstů pravidelně svlékán (*ekdyze*) ^{[26] [34]}.

Oběhový systém

Je otevřený. Srdce je jednoduchá podélná trubice, uložená dorzálně k zažívacímu traktu v tělní dutině. Na bočních stranách srdce jsou párové otvory, zvané *ostia*. Krevní buňky mají améboidní tvar, obsahují poměrně malé jádro a cytoplasmu s granulemi ^{[26] [30]}.

Trávicí systém

Tvoří jednoduchá trávicí trubice uložená volně v *hoemocoelu*, zde je omývána hemolymfou. Dělí se na tři oblasti, které se mezi sebou liší histologicky. Buňky střední části střeva jsou lemovány mikroklyky potaženými vláknitou látkou, pravděpodobně mukopolysacharidem ^{[26] [30]}.

Vylučovací systém

U dospělých jedinců probíhá exkrece pomocí maxilárních žláz, které jsou umístěny hned za kusadly. Nižší vývojová stádia používají žlázy tykadel, které postupem času zakrní ^[25] ^[26].

Respirační systém

Vnější výměna plynů probíhá přes permeabilní povrch polypodíí ^[30].

Reprodukční systém

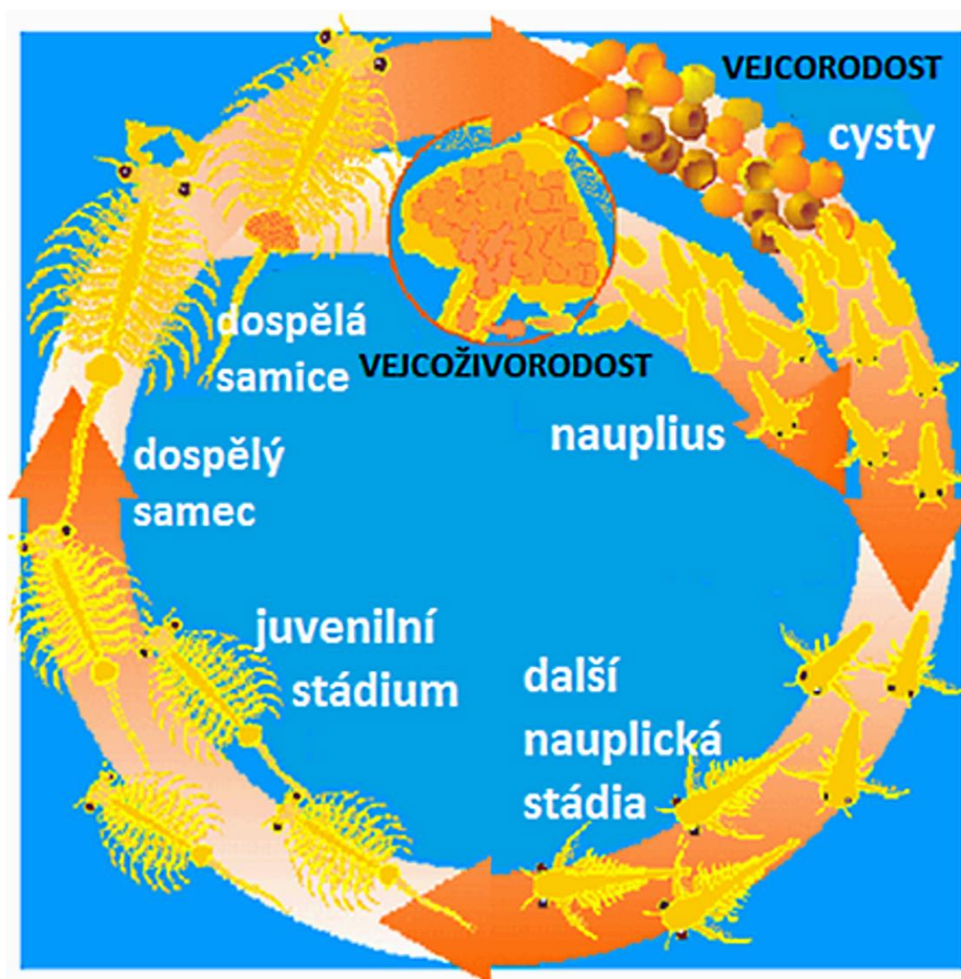
Samčí rozmnožovací aparát tvoří dvojitý penis, pár varlat a přídatné žlázy. Ve varlatech jsou jak somatické, tak i zárodečné buňky.

Samičí rozmnožovací orgány tvoří děloha, pár vaječníků a vejcovodů. Dospělá samice ovuluje přibližně každých 140 hodin. Doba ovulace závisí na okolních podmínkách, a na tom, jakou ze dvou možných cest bude pokračovat vývoj vajíček (vejcorodost, vejcoživorodost) ^[26].

Nervový systém

Je složen z dorzálního mozku a řady párových ganglií, které jsou umístěny v tělních segmentech. Jsou známy dva typy nervových buněk: větší gangliové buňky a menší neurony s jedním nervovým výběžkem. *Protocerebrum* přijímá signály z frontálních orgánů a očí. *Deutocerebrum* je od *protocerebra* zřetelně odděleno, zde se nachází propojená ganglia prvního páru tykadel. V blízkosti mozkového ganglia je umístěn ganglion druhého páru tykadel, který inervuje senzory receptory ^[25] ^[26].

2.1.3. VÝVOJ



obr. 2: Vývojový cyklus žábřonožky, převzato s úpravou z © advancedaquarist.com ^[71]

Artemia salina se rozmnožuje pohlavní cestou nebo partenogenezí (bez oplodnění).

Vývoj žábřonožky solné je nepřímý. Postembryonální vývoj začíná larvou (naupliem), pokračuje přes další larvální a juvenilní stádium až k dospělému jedinci.

Samička klade vajíčka dvěma způsoby v závislosti na podmínkách okolního prostředí. První způsob je vejcoživorodost (nauplia se líhnou hned po naklazení), probíhá za příznivých podmínek. Druhý způsob je vejcorodost (vajíčko se zapouzdří a stane se z něho cysta ve stádiu diapauzy) pokud okolní podmínky nejsou příznivé. Diapauza (stádium vegetativního klidu) je ukončena, jakmile jsou okolní podmínky příznivé pro další vývoj, tzn. optimální dostupnost kyslíku, teplota a složení vody.

Larvy vylíhnuté po ukončení diapauzy jsou morfologicky stejné jako ty, které se vylíhly ihned po naklazení ^[26].

Larvy žábřonožky mají různé morfologické a anatomické rysy. U čerstvě vylíhnutých nauplií není epitel trávicího traktu ve styku s vnějším médiem. Studie na larválních etapách vývoje žábřonožky ukazují, že propustnost trávicí trubice v počátečním stadiu larvy není kompletní. Díky tomu existuje výrazný rozdíl v citlivosti mezi larvami instaru I a instaru II-III. Výrazně citlivější jsou larvy instaru II-III, než larvy instaru I ^[35].

Cysty žábřonožky jsou velmi odolné, snesou i několikaleté vyschnutí a extrémní podmínky (hluboké vakuum, ionizující záření, působení agresivních tekutin, extrémní sušení, anaerobní podmínky) ^{[25] [29]}.

Partenogeneze je běžná, pokud nejsou k dispozici jedinci samčího pohlaví. Samička klade neoplozená vajíčka, mohou být buď diploidní, tetraploidní, nebo oktoploidní ^[31].

2.1.4. OSMOREGULACE

Dospělí jedinci pijí vnější slané médium a následně transportují ionty a tekutiny ze střeva do hemolymfy přibližně stejnou rychlostí, jakou tekutina opouští tělo skrze tělní stěnu ^[26].

Žábřonožka si dokáže udržet své hypotonické vnitřní prostředí vůči vnějšímu médiu ^[30]. Sodné ionty jsou transportovány z těla díky sodno-draselným pumpám, které je pumpují ven proti osmotickému spádu. Vysoká aktivita těchto pump je u metepitopodií, které jsou umístěné na plovacích nožkách. Čelistní žlázy se také podílejí na osmoregulaci. Produkují moč, která však není schopná koncentrovat anorganické ionty. Čím vyšší je salinita prostředí, tím více energie žábřonožka vydá pro regulaci osmózy ^[26].

2.1.5. VYUŽITÍ

2.1.5.1. Solární produkce soli

Sůl je typicky získávána čerpáním mořské vody z jednoho odpařovacího jezírka do druhého, což umožňuje vysrážení uhličitánů a sádrovce. Nakonec se vypouští nasycený roztok NaCl do krystalizačního jezírka, a tím dojde k vysrážení chloridu sodného. Abychom zabránili kontaminaci chloridu sodného bromidy či jinými solemi, musíme odpuštit matečný louh, než dojde k celkovému vysrážení NaCl. Tímto postupem získáme nejčistší možnou formu soli: 99,7 % v sušině ^{[26] [45]}.

Kvalitu a kvantitu můžeme do značné míry ovlivnit hydrobiologickou aktivitou v jezírcích. Vodní řasy jsou obecně prospěšné, zajistí vyšší absorpci tepla, zrychlí se vypařování a zvýší se výtěžek soli. Řasy musí být včas metabolizovány, jinak dojde k redukci velikosti krystalů a sníží se kvalita soli. V nejhorším případě může zvýšená viskozita úplně zastavit srážení NaCl ^{[26] [45]}.

Artemia salina je konzumentem řas a tak dokáže kontrolovat jejich množství v jezírcích. Prostřednictvím svých metabolitů poskytuje základní živiny pro šíření *Halobacterium* v krystalizačních jezírcích. Vysoká koncentrace této bakterie umožňuje snížit množství rozpuštěných organických látek, čímž se sníží i viskozita. Tato skutečnost vede k tomu, že se formují větší krystaly soli ^{[26] [45]}.

Tímto způsobem získáme nejen vysoce kvalitní sůl, ale i cysty *Artemia salina* a její biomasu ^[26].

2.1.5.2. Akvaristika

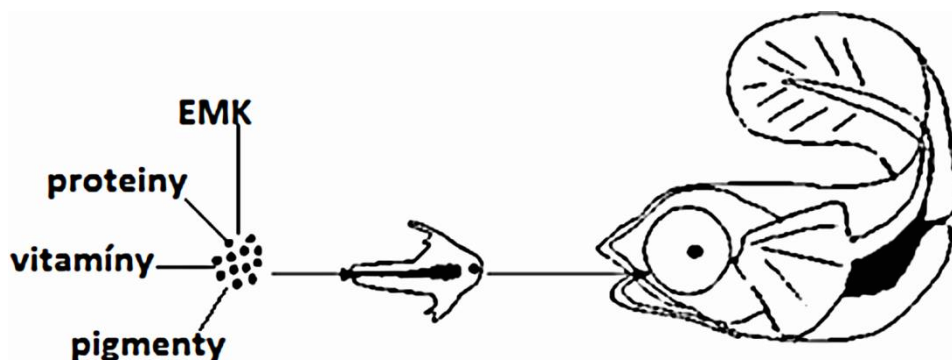
Artemia salina je v akvaristice velmi populární. Je oblíbeným a často využívaným krmivem pro mořské i sladkovodní druhy ryb. Popularitu si získala

především díky snadnosti reprodukce kdykoli v průběhu roku a schopnosti přežít i v náročných podmínkách. Jako krmivo se používají všechny tři fáze životního cyklu.

Vajíčka bez skořápky mají vysoký obsah proteinů, jsou skvělým krmivem pro malé druhy ryb. Nauplia slouží jako počáteční krmivo pro malé akvarijní ryby. Dospělé žábřonožky jsou vhodným krmivem pro většinu druhů dospělých ryb ^[29].

Výživové vlastnosti žábřonožky se dají ovlivnit a popřípadě upravit. Po vylíhnutí probíhá neselektivní filtrace částic, které jsou menší než 25 µm. Díky tomu lze do těla žábřonožky vpravit potřebné látky (vitamíny, esenciální mastné kyseliny, proteiny aj.). Tento způsob obohacování se nazývá bio-enkapsulace ^[26].

Živá biomasa má nejvyšší výživovou hodnotu, lze ji však zmrazit nebo zpracovat v jinou formu krmiva. Dospělé jedince lze získat kultivací nebo sběrem ze solných jezírek ^[26].



obr. 3: Schéma přenosu specifických složek do larvy žábřonožky, která je použita jako vektor pro další transport, převzato s úpravou z © advancedaquarist.com ^[71]

2.1.5.3. Věda

Artemia salina nabízí možnost získat velké množství živých jedinců, kteří jsou ihned po vylíhnutí použitelní pro test. Odpadá tak náročný chov. Velkou výhodou je vysoká homogenita jednotlivců ^[37].

Artemia se těší využitím v různých vědních oblastech. Uplatňuje se v ekotoxikologii pro stanovení testů toxicity, v genetice a molekulární biologii pro testování DNA, RNA. Své místo má i ve farmacii v rámci preklinického testování. Biochemici izolují z žábřonožky enzymy, hemoglobin a další potřebné složky. Ekologové ji používají jako krmivo pro svá pokusná zvířata ^[26].

Využití našla i u radiobiologů. V roce 1982 byl tento korýš vybrán pro experimenty, které na oběžné dráze kolem Země prováděla sovětsko-francouzská posádka. Zkoumali vliv kosmického záření na její cysty a na semena rostlin ^[29].

Ekotoxikologie

Akutní testy toxicity s různorodými vodními druhy představují základní kamen postupů, které se využívají pro monitorování a předvídání důsledků působení chemikálií a odpadních vod. Ve velké míře se využívají bezobratlí. Stále častěji se však můžeme setkat s využitím testovacích kitů. Obsahují bioindikátory ve formě opouzdrěných vajíček, jejich výhodou je, že se nechají líhnout až v době potřeby. Pro toxikologické testy mořského prostředí se používají zejména cysty *Artemia salina*. Vhodnost testů zůstává otázkou, kvůli nedostatečné citlivosti pro mnoho běžných škodlivin ^[26].

V určitých případech lze použít žábřonožku jako biosenzor a snížit tak množství pokusů prováděných na vyšších obratlovcích ^[32].

2.1.6. ODOLNOST ARTEMIA SALINA

2.1.6.1. Diapauzální cysta

Trehalosa

Disacharid trehalosa umožňuje cystám přežít téměř úplné vyschnutí. Proces vysychání má devastační účinky na membrány a proteiny. Trehalosa dokáže nahradit vodu ve struktuře membrán a proteinů, a tím je chrání. Tento proces se nazývá teorie náhrady vody, v anglickém podání „water replacement hypothesis“. Trehalosu dokážou ve velkém množství kumulovat organismy schopné odolat

vyschnutí. Tento objev umožnil její praktické využití. Například chrání lidské pankreatické ostrůvky před zničením chladem nebo liposomy před zničením vyschnutím. V současné době se zkoumá schopnost trehalosy ochránit lidské krevní destičky před chladem [26].

Trehalosa se začíná syntetizovat asi druhý den po oplodnění, ale pouze u embryí, která jsou v diapauze (cysty). Trehalosa je cukr a většina se ji tedy využije jako zdroj energie pro vystoupení z režimu spánku. Zbytek se přemění na glykogen a glycerol. U dalších vývojových stádií se trehalosa nenachází [26].

Antioxidanty

Vyschlé cysty jsou především citlivé na oxidaci, potřebují tedy přísun antioxidantů, které je ochrání před působením molekulárního kyslíku. U žábřonožky hrají důležitou roli karotenoidy, které získávají z mořských řas. V tucích rozpustné karotenoidy jsou začleněny do oocytů žábřonožky a jsou hlavní složkou lipidů opouzdřeného embrya. Karotenoidy jsou skvělé antioxidanty a hrají důležitou roli v detoxikačním procesu, během kterého se neutralizují volné radikály [26].

V cystě se nachází i jiné antioxidační systémy, např. vitamín E (tokoferol) nebo vitamín C (kyselina askorbová) [26].

Příčinou oxidačního stresu jsou železnaté a železité ionty, které reagují se širokou škálou sloučenin za vzniku škodlivých produktů. Ionty železa jsou u žábřonožky vázány různými proteiny, zvláště feritinem [26].

2.1.6.2. Rehydratovaná a aktivovaná cysta

Anoxie

Na rozdíl od jiných živých organismů, dokážou cysty *Artemia salina* přežít i několik let bez přísunu kyslíku. Bylo vyzkoušeno, že zhruba 60 % cyst přežije 4 roky anoxie a téměř 10 % přežije více než 6 let. Při nedostatku kyslíku se metabolismus zpomalí a převede do stavu reverzibilního klidu již během prvního dne anoxie. Vývoj pokračuje, jakmile se okolní podmínky upraví [26].

Změna pH

Anoxie způsobuje změnu pH. Dochází k rychlému snížení hodnoty pH z $>7,9$ u aerobních embryí na pH 6,9 po několika dnech. Kyselé prostředí inhibuje RNA, syntézu a degradaci proteinů a některé zásadní enzymy pro reakce, kterých se účastní trehalosa. Jakmile je hladina kyslíku dostatečná, hodnota pH se zvýší a látková přeměna se obnoví.

Změna pH je jedním z hlavních regulátorů metabolismu cyst, to je jedním z důvodů, proč se cysty využívají ke studiu biologických problémů ^[26].

2.1.6.3. Odolnost vůči teplotě

Teplotní odolnost závisí na vývojovém stádiu. Nejodolnější jsou vyschlé cysty ve stádiu diapauzy, které snesou extrémní výkyvy teplot. Přežijí expozici -270 °C , ale ani vysoké teploty kolem 103 °C pro ně nepředstavují problém. Důležitou roli zde hraje trehalosa ^[26].

U hydratovaných cyst je schopnost termoregulace nižší. I v tomto případě dokážou přežít hodinovou expozici 49 °C , což má velký obdiv mezi živočišnými buňkami. U hydratovaných cyst nedochází k vývoji termoregulace ^[26].

Dospělí jedinci mají nejhorší schopnost tolerovat vysoké teploty. Vydrželi 30 minutovou expozici 38 °C . Dospělí jedinci mají schopnost termoregulace, na rozdíl od cyst, ale nemají dostatek trehalosy a stresových proteinů, jejich odolnost vůči vysokým teplotám je nízká ^[26].

2.1.7. CELOSVĚTOVÉ ROZŠÍŘENÍ

Zástupce rodu *Artemia* najdeme po celém světě. Obývají všech pět kontinentů, žijí ve slaných jezerech, pobřežních lagunách a v solných dolech. Na rozšíření žábřonožky se podílí dva faktory. První je dostatek vody, vzhledem k tomu, že žábřonožky žijí celoročně ve vodě a druhým faktorem jsou optimální podmínky životního prostředí [26].

Charakteristickým znakem všech míst, ve kterých se vyskytují zástupci rodu *Artemia*, je vysoká salinita. V prostředí s vysokou salinitou se přirození predátoři vykytují minimálně oproti prostředí, kde je obsah soli nižší.

Vysoká salinita je tedy bezpochyby jeden z hlavních abiotických faktorů, který má vliv na geografické rozšíření.

Ostatní faktory životního prostředí jako jsou: teplota, množství potravy, intenzita světla, ovlivní kvantitativní stránku rozšíření populace a mohou způsobit dočasnou nepřítomnost žábřonožek na určitém místě [26].

V současné době je zaznamenáno 7 druhů tohoto organismu [29]:

- *Artemia tunisiana* (Evropa a severní Afrika)
- *Artemia species* (Amerika, část Evropy, Asie)
- *Artemia franciscana* (Amerika, část Evropy)
- *Artemia parthenogenetica* (Evropa, Afrika, Asie, Austrálie)
- *Artemia sinica* (střední Asie, Čína)
- *Artemia persimilis* (Argentina)
- *Artemia urmiana* (Írán)

Žábřonožky žijící v České republice, jsou převážně ohrožené a přežívají na posledních lokalitách (záplavové oblasti v povodí Dyje, Moravy, Polabí aj.). Na Slovensku najdeme v některých tatranských plesech 1 druh jako glaciální relikt [25].

2.2. ALKALOIDY

2.2.1. CHARAKTERISTIKA

Alkaloidy jsou přírodní dusíkaté látky zásaditého charakteru (baze), různé chemické struktury a biologických účinků. Ve své struktuře mají obvykle heterocyklus^[8].

Vyskytují se v různých částech některých rostlin (kořeny, plody, semena atp.), většinou jako směs příbuzných sloučenin a jejich obsah značně kolísá^[6]^[8]. Jako hlavní se označuje ten, který je zastoupený v největším množství. Nacházejí se zejména v čeledi mákovité, lilkovité, pryšcovité, hvězdnicovité, routovité a zimostřázovité^[10]. Alkaloidy nejsou prakticky vůbec obsaženy v čeledi hluchavkovité a růžovité. Obsah alkaloidů v jednotlivých rostlinách je různý^[6]. Vzácně se mohou vyskytnout také u hub a živočichů, např. mloků, žab či ryb ježíků (tetrodotoxiny). Mají hlavně ochrannou funkci - odpuzují býložravce nebo slouží k lákání opylovačů^[8]^[10].

Díky jejich zásaditému charakteru se v rostlinách vyskytují ve formě solí karboxylových kyselin (kyseliny šťavelové, octové, mléčné, jablečné, vinné, citronové, mekonové a pod.). Jako volné baze se v rostlinách vyskytují vzácně^[6]^[8]. Pro izolaci alkaloidu je třeba ho nejdříve vytěsnit silnější zásadou a následně extrahovat či vydestilovat s vodní parou^[10].

Většina alkaloidů jsou pevné bezbarvé látky, hořké chuti a bez zápachu^[6]. Jsou nerozpustné ve vodě, ale dobře rozpustné v nepolárních rozpouštědlech (např. alkoholech či chloroformu)^[7]. Při vyšších teplotách se za normálního tlaku obvykle rozkládají. Jen malá část alkaloidů je tekutá (koniin, nikotin, spartein). Přirozené alkaloidy jsou často opticky aktivní^[6].

Biosyntéza v rostlinách vychází z aminokyselin. Mohou však vznikat také jako meziprodukty biosyntézy terpenoidů, steroidů, některých kyselin nebo purinů účinkem aminů a amoniaku^[8].

Velká část alkaloidů má silné fyziologické účinky na živočichy. Řada z nich se využívá ve farmacii jako cenná léčiva. Mohou být také zneužívány jako návykové látky či jedy. Alkaloidy, které ovlivňují centrální nervový systém a vyvolávají tak zvláštní stavy (halucinace, euforii, poruchy rovnováhy, agresivitu atd.), označujeme jako omamné drogy. Při jejich opakovaném podání, v některých případech i po prvním použití, může vzniknout závislost – narkomanie ^[9].

Doposud je izolováno více jak 6000 alkaloidů a jejich počet stále stoupá. Důraz se klade na parciální a totální syntézu alkaloidů. Využívá se zvláště tam, kde je nutno získat větší množství alkaloidu, jehož množství v rostlině je minimální nebo je rostlina zcela nedostupná či chráněná. V některých případech je parciální či totální syntéza natolik ekonomická, že vytlačila částečně nebo úplně izolaci z rostlinného materiálu. Jako příklad lze uvést kofein nebo lobelin ^[8].

Chemicky se od sebe alkaloidy velmi liší, proto je jejich toxikologický a farmakologický účinek různý. Dělí se podle heterocyklu, který je součástí jejich molekuly ^[9].

2.2.2. ROZDĚLENÍ ALKALOIDŮ

2.2.2.1. Tropanové alkaloidy

Obsahují sedmičlenný kruh tropan ^[9]. Mezi hlavní zástupce této skupiny patří atropin a kokain ^[7].

Atropin se vyskytuje v čeledi lilkovité (*Solanaceae*), je prudce jedovatý, dráždí centrální nervovou soustavu, rozšiřuje zornice, zpomaluje srdeční tep a tlumí křeče. Využívá se jako spasmolytikum, či k vyšetření očního pozadí (je součástí očních kapek) ^[7] ^[9].

Kokain se nachází v čeledi rudodřevovité (*Erythroxylacea*) ^[9]. Má širokou biologickou aktivitu, je to lokální anestetikum s vazokonstrikčními účinky, působí na srdce a stimuluje CNS – blokuje zpětné vychytávání katecholaminů a serotoninu v mozku do presynaptických neuronů, tím zvyšuje koncentraci těchto

neuromediátorů v synaptických štěrbinách ^[11] ^[13]. Velmi rychle na něj vzniká závislost. Pro využití v lékařství se nahrazuje syntetickými deriváty, které nemají omamné účinky ^[9]. Listy zástupců této čeledi jsou zahrnuty do jednotné úmluvy o omamných látkách, seznamu I ^[11].

2.2.2.2. Chinolizidinové alkaloidy

Někdy se nazývají jako lupinové alkaloidy, podle jejich hojného výskytu v rostlinách rodu *Lupinus* (čeleď *Fabaceae*) ^[8].

Toxikologický významný je cytisin a spartein. Spartein se získává z janovce (*Sarothamnus scoparius*, čeleď *Fabaceae*) ^[6].

2.2.2.3. Steroidní alkaloidy

Tato skupina alkaloidů se biosyntetizuje ze steroidních prekurzorů. Podle povahy steroidu, který tvoří základ struktury, je dělíme do tří skupin: alkaloidy typu pregnanu, cholestanu a O-nor-D-homocholestanu ^[8].

Často se vyskytují ve formě glykoalkaloidů. Některé mají teratogenní účinky, schopnost inhibovat acetylcholinesterázu či destruovat buněčné membrány – podobně jako saponiny ^[6].

Alkaloidy pregnanového typu mají v základním skeletu 21 atomů uhlíku. Najdeme je v čeledi toješťovité (*Apocynaceae*) a zimostrázovité (*Buxaceae*).

Alkaloidy cholestanového typu mají v základním skeletu 27 atomů uhlíku. Řadíme zde solanidin a tomatidin.

Charakteristikou alkaloidů O-nor-D-homocholestanového typu je pětičlenný kruh C a šestičlenný kruh D. Do této skupiny řadíme protoveratrin A a protoveratrin B z rodu *Veratrum* (čeleď *Melanthiaceae*) ^[8].

2.2.2.4. Purinové alkaloidy

Mezi hlavní zástupce této skupiny patří kofein, theofylin a theobromin ^[11]. Někdy se označují jako pseudoalkaloidy, protože i když obsahují čtyři atomy dusíku, nevykazují zásaditý charakter a netvoří soli s kyselinami ^[8]. Vyskytují se především u druhů rodu *Coffea* (čeleď *Rubiaceae*), *Thea* (čeleď *Theaceae*), *Theobroma* a *Cola* (čeleď *Sterculiaceae*) ^[11]. Povzbuzují organismus (mají slabý psychostimulační účinek) a působí diureticky ^{[10][13]}.

2.2.2.5. Pyrrolizidinové alkaloidy

Pyrrolizidinové alkaloidy jsou v přírodě značně rozšířené. Jejich výskyt je charakteristický pro některé rostliny z čeledi *Asteraceae*, *Boraginaceae* a *Fabaceae*. Jsou silně hepatotoxické ^[8].

Poměrně velký obsah pyrrolizidinových alkaloidů najdeme u kostivalu (*Symphytum officinale*, čeleď *Boraginaceae*), nehodí se tedy k vnitřnímu použití, ale využívá se zevně jako hojivé stimulans a antiflogistikum.

Použití pyrrolizidinových alkaloidů se značně omezilo po objevení karcinogenního účinku ^[11].

2.2.2.6. Pyridinové alkaloidy

Nejnámějším zástupcem je nikotin, je obsažen v listech tabáku (*Nicotina tabacum*, čeleď *Solanaceae*) ^{[9][11]}. Je silně toxický, má mírné psychostimulační účinky, negativně ovlivňuje žaludeční sliznici a cévní systém (dochází ke zúžení cév) ^{[7][9][13]}. Do organismu se dostává kouřením (nově je součástí elektronických cigaret), žvýkáním či šňupáním tabáku ^[13]. Produkty, které vznikají během kouření nikotinu, podporují vznik rakoviny plic. Má pozitivní vliv na Alzheimerovu a Parkinsonovu chorobu. Oxidací nikotinu kyselinou dusičnou vzniká kyselina nikotinová ^[7].

2.2.2.7. Alkaloidy typu fenylethylaminu

Mezi zástupce řadíme bazický efedrin a pseudoefedrin. Produkují je druhy rodu *Ephedra* (čeleď *Ephedraceae*)^[8]. Alkaloidy jsou odvozeny od fenylalaninu^[6].

Efedrin dobře proniká hematoencefalickou bariérou díky své vysoké lipofilitě a stimuluje CNS. Používá se jako dekonjestant (zejména nosní sliznice) a také je součástí antiastmatické terapie v kombinaci s dalšími látkami.

Pseudoefedrin působí převážně nepřímo, má nižší stimulační účinek na CNS. Má broncholidatační, vazokonstrikční a dekongescenční účinek na překrvenou nosní sliznici. Využívá se ke krátkodobé symptomatické léčbě akutních onemocnění horních cest dýchacích v kombinaci s analgetiky-antipyretiky^[12].

Dalším zástupcem je halucinogenní alkaloid mezkalin produkovaný několika druhy kaktusů (např. *Trichocereus*, *Lophophora*), který je odvozen od tyrosinu^{[6][8]}.

2.2.2.8. Indolové alkaloidy

Indolové alkaloidy představují velmi rozsáhlou a terapeuticky dobře využitelnou skupinu sekundárních metabolitů. Většina rostlin, ve kterých jsou obsaženy, se v naší flóře nevyskytuje. Intoxikace hrozí při nedodržení dávkování léčiv s jejich obsahem^[6].

Mimořádně bohatým zdrojem indolových alkaloidů je čeleď toješťovité (*Apocynaceae*), z jejichž zástupců se izolují cenná přírodní léčiva. Dalším významným zdrojem je rod *Claviceps* (čeleď *Clavicipitaceae*). Hojně jsou také zastoupeny u čeledi *Loganiaceae*, *Rubiaceae* a *Euphorbiaceae*. Řadíme zde i některé alkaloidy přítomné v rodu *Cinchona* (čeleď *Rubiaceae*)^[8].

Indolové alkaloidy tvoří čtvrtinu z celkového množství dosud objevených alkaloidů^[6]. Dělíme je na:

Jednoduché indolové alkaloidy

Jedním z představitelů je psilocybin obsažený v houbách čeledi *Agaricaceae*, známý svými halucinogenními účinky.

Patří zde také fyzostigmin (alkaloidy fyzostigminového typu), obsažený v semenech *Physostigma venenosum* (čeleď *Viciaceae*)^[8]. Používá se hlavně v očním lékařství jako krátkodobé miotikum a ke snížení nitroočního tlaku. V praxi se používají také jeho deriváty (neostigmin, pyridostigmin) k léčbě postoperační atonie střev a močového měchýře či myastenia gravis^[12].

Složené indolové alkaloidy

Terapeuticky významným zástupcem je vinkamin obsažený ve *Vinka minor* z čeledi toješťovité (*Apocynaceae*)^[8]. Působí vazodilatačně na cévy, zvyšuje mozkové prokrvení a utilizaci kyslíku, může negativně ovlivnit kardiovaskulární systém^[11].

Dimerní indolové alkaloidy

Jsou to dimery terpenických indolových alkaloidů. Nejvýznamnější se jeví vincristin a vinblastin, vyskytují se ve *Vinca rosea* čeledi toješťovité (*Apocynaceae*)^[8]. V praxi se využívají jako antineoplastika – inhibitory mitózy^{[11][14]}. Jsou však neurotoxické, což se projeví poruchou funkce periferních nervů. Pro tento závažný vedlejší účinek se v terapii využívají jejich polosyntetické deriváty, u kterých je prokázána nižší neurotoxicita^[14].

Hemiterpenické indolové alkaloidy

Označují se také jako námelové alkaloidy nebo alkaloidy ergolinové^[8]. Jsou to produkty sklerocia houby paličkovice nachové (*Claviceps purpurea*, čeleď *Clavicipitaceae*), najdeme je i v některých jiných houbách (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus*). Mezi nejznámější zástupce patří ergotamin a ergometrin^{[8][12]}.

Ergometrin vyvolává stahy hladkého svalstva dělohy a působí vazokonstrikčně, čehož se využívá v porodnictví k zástavě nadměrného poporodního krvácení. V současné době se již nepoužívá, na trhu je dostupný jeho polosyntetický derivát, který má výhodnější vlastnosti^[12].

Ergotamin má specifické antimigrenózní účinky^[12].

2.2.2.9. Isochinolinové alkaloidy

Benzylisochinolinové alkaloidy

Najdeme zde strukturně rozličné a v přírodě hojně rozšířené alkaloidy, které vykazují široké spektrum farmakologických aktivit ^[8] ^[21]. Nacházejí se v rostlinách z čeledí *Papaveraceae*, *Rutaceae*, *Fumariaceae*, *Ranunculaceae*, *Rhamnaceae*, *Laureaceae*, *Berberidaceae*, *Menispermaceae* a dalších ^[8].

Řadíme zde alkaloidy kurare (protokuridin), opiové alkaloidy (narkotin, narcein, papaverin) a tubokurarové alkaloidy (tubokuranin).

D-forma tubokurarinu je součástí šípového jedu a je prudce jedovatá. Využívá se při šokové léčbě některých psychických poruch a odstraňuje křeče vyvolané tetanovým toxinem ^[15]. Vyskytuje se v rostlině *Chondrodendron tomentosum* (čeleď *Menispermaceae*) ^[11].

Papaverin je jeden z přírodních alkaloidů opia, které se získává z nezralých tobolek nebo izolací z makoviny máku setého (*Papaver somniferum*, čeleď *Papaveraceae*) ^[11] ^[12]. V dnešní době se papaverin připravuje většinou synteticky. Farmakologicky se využívá jako muskulotropní spasmolytikum při žlučnickových, střevních či ledvinových spasmech a při různých spastických stavech cévních ^[12]. Pěstování máku setého, manipulace s makovinou a opiem se řídí Zákonem č. 167/1998 SB., o návykových látkách ^[11].

Složené benzylisochinolinové alkaloidy

Významným zástupcem je alkaloid emetin z rodu *Cephaelis* (čeleď *Rubiaceae*) ^[8] ^[11]. Emetin je nepřímé sekretolytikum – lokálně dráždí žaludeční sliznici, čímž je podrážděn parasymptikus a následně dojde ke zvýšení sekrece hlenu ^[13]. Ve vyšších dávkách vyvolává nauzeu a zvracení ^[18].

Morfinanové alkaloidy

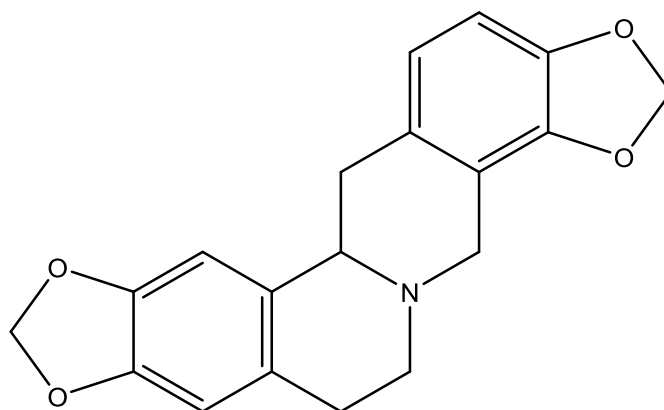
Důležitým meziproduktem při biosyntéze morfinanových alkaloidů je norlaudonosolin. Základní uhlíkatý skelet morfinanů vzniká, pokud při přepisu norlaudonosolinu dojde k ortho-para spojení. Sledem několika dalších reakcí vzniká thebain, pak kodein a z něj morfin ^[8].

Morfin je jedním z hlavních alkaloidů opia, které již bylo zmíněno výše ^[11]. Ze zažívacího traktu je poměrně špatně absorbován, proto se zpravidla podává injekčně. Řadí se mezi analgetika-anodyna ^[13]. Používá se k tlumení krutých bolestí, které nelze zvládnout jinými způsoby, včetně farmak ^[17]. Mechanismus jeho účinku spočívá ve vazbě na opioidní receptory. Existuje více typů opioidních receptorů, zpravidla rozlišujeme tři skupiny: mí, kappa a sigma - na všechny morfin působí jako agonista. Žádný přírodní či syntetický opioid nepůsobí selektivně, pouze na některý typ receptoru, vždy tedy očekáváme výskyt vedlejších účinků (útlum dechového centra, nevolnost, zvracení, zácpu, euforii či vznik návyku) ^[13].

Protoberberinové alkaloidy

Velká část protoberberinových alkaloidů se v přírodě vyskytuje v tetrahydroprotoberberinové formě nebo jako kvarterní protoberberinové soli. Do skupiny protoberberinových alkaloidů řadíme stylopin, tetrahydropalmatin, kanadin a skulerin. Všechny alkaloidy jsou odvozeny od laudanosu ^[22].

2.2.2.9.1. Stylopin



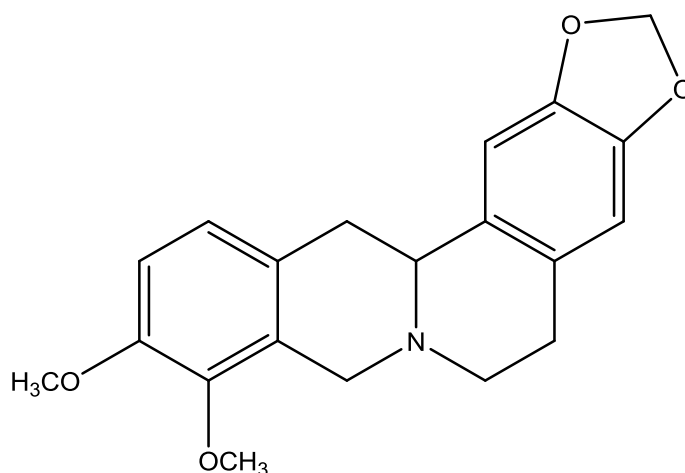
Obr. 4: Struktura stylopinu

Stylopin jinak zvaný chelidamin, je alkaloid obsažený ve vlaštovičníku větším (*Chelidonium majus*, čeleď *Papaveraceae*) ^{[11] [20]}.

Skulerin přechází oxidační kondenzací hydroxylové a methylové skupiny (za vzniku methyendioxy seskupení) na stylopin^[8].

Inhibuje cytochrom CYP 2D6, CYP 2C19 a CYP 3A4^[55]. Má chemoprotektivní a nematocidní účinek^{[53] [54]}. Je insekticidem pro *Drosophila melanogaster*, inhibuje její acetylcholinesterázu^[24]. Působí cytotoxicky (na některé linie karcinomu prsu a prostaty) a antiflogisticky^{[56] [57]}.

2.2.2.9.2. Tetrahydropalmatin



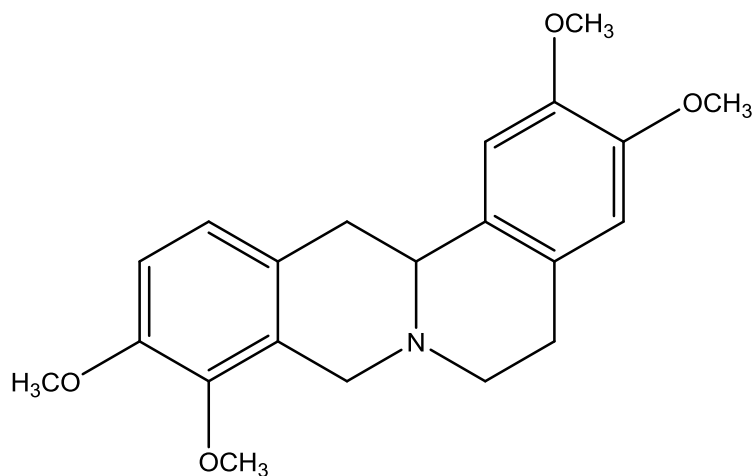
Obr. 5: Struktura tetrahydropalmatinu

Tetrahydropalmatin je alkaloid obsažený v dýmnicce duté (*Corydalis cava*, čeleď *Fumariaceae*)^[11].

Působí inhibičně na mozkové GABA transaminázy a P-glykoprotein^{[59] [62]}. Má hypolipidemickou aktivitu a snižuje hladinu dopaminu ve striatu u potkana^{[58] [61]}. Dokáže inhibovat cytochrom P 450^[60].

Je to nažloutlá, jemně krystalická látka s teplotou tání 141–143 °C^[66].

2.2.2.9.3. Kanadin

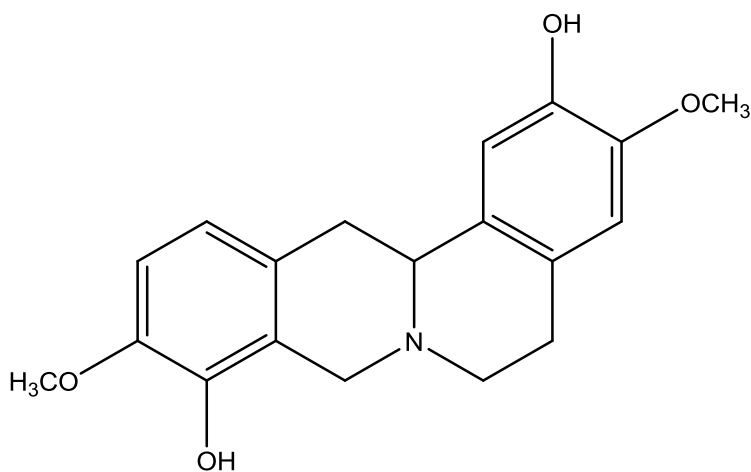


Obr. 6: Struktura kanadinu

Kanadin, jinak zvaný tetrahydroberberin, je alkaloid obsažený v dýmnivce duté (*Corydalis cava*, čeleď *Fumariaceae*) a vodilce kanadské (*Hydrastis canadensis*, čeleď *Hydrastidaceae*)^{[11] [20]}.

Působí jako sedativum a svalové relaxans^[42]. Inhibuje acetylcholinesterázu a mozkové GABA transaminázy^{[62] [69]}. Vzhledem k jeho antioxidační aktivitě a nízké toxicitě je slibným kandidátem v uplatnění jako nový typ antioxidačního činidla^[51].

2.2.2.9.4. Skulerin



Obr. 7: Struktura skulerinu

Skulerin jinak zvaný diskretamin, je důležitý meziprodukt při tvorbě alkaloidů ftelidtetrahydroisochinolivé skupiny. Nachází se v dýmnicce duté (*Corydalis cava*, čeleď *Fumariaceae*)^{[8] [11] [19] [20]}.

Skulerin vzniká z laudanosinu přes retikulin^[8].

Má antiagregační, sedativní a cytotoxické účinky^{[63] [64] [65]}. Skulerin vykazoval silnou inhibiční aktivitu vůči topoizoméráze I, která byla srovnatelná s kamphotecinem, typickým inhibitorem topoizomérázy I^[23].

Je inhibitorem acetylcholinesterázy a cytochromu CYP 2D6^{[55] [69]}. Bylo zjištěno, že je také agonistou receptoru GABAA a D1-dopaminových receptorů^{[67] [68]}.

Je to slabě narůžovělá, jemně krystalická látka bez zápachu s teplotou tání 200-203 °C^[66].

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1. POUŽITÁ METODA

Larvy *Artemia salina* se používají jak k toxikologickému screeningu, tak i v ekotoxikologických testech ^[40].

Krátkodobé testy toxicity s využitím *Artemia salina* se provádějí v mnoha laboratořích po celém světě. Existuje několik variant tohoto testu. Využívají se Petriho misky, zkumavky nebo mikrotitrační destičky. Pokusem se stanoví procento uhynulých nauplií *Artemia salina* v různých koncentracích k získání hodnoty LC₅₀ (letální koncentrace) ^[37].

V našem případě jsme provedly alternativní screeningový test, pro stanovení toxicity přírodních produktů a jejich LC₅₀ ^[46].

Použily jsme mikrotitrační destičky. Námi připravenou ředící řadu roztoků zkoumané látky jsme napipetovaly do jamek destičky. Následně jsme do každé jamky přenesly 10 nauplií žábřonožky. Provedly jsme několik paralelních stanovení včetně kontroly. Celý test probíhal v prostředí mořské vody. Následující den (po 24 hodinách) jsme zaznamenaly úmrtnost nauplií pomocí pozorování pod mikroskopem. Jako uhynulé jsme označily ty jedince, kteří nevykázali po mechanickém dráždění sebemenší pohyb žádné části těla ^[38].

3.2. TESTOVANÝ ORGANISMUS

Pro experiment jsme použily cysty (vajíčka) *Artemia salina*, které lze zakoupit v běžných akvaristických potřebách. Prodávají se v konzervách nebo neprodyšných sáčcích. Uchovávají se v lednici při 5°C. Po otevření je nutno zamezit přístupu světla a vzdušné vlhkosti ^[39]. Cysty umístěné do slané vody rehydratují a jejich rozvoj může pokračovat ^[41]. Z jedné konzervy lze získat i několik milionů nauplií u nichž je zaručena vysoká homogenita (stejně vlastnosti). Pro sledování toxicity jsou vhodná nauplia, neboť jsou vysoce citlivé na celou řadu chemických látek ^[39].



obr. 8: larva *Artemia salina*, L. 48 hodin starý jedinec, dorzální pohled
(poskytla RNDr. Jitka Vytlačilová, Ph.D.)

3.3. POUŽITÝ MATERIÁL

3.3.1. CHEMIKÁLIE

Testované látky:

Skulerin hydrochlorid izolován z *Corydalis cava*

Stylopin hydrochlorid izolován z *Chelidonium majus*

Kanadin hydrochlorid izolován z *Hydrastis canadensis*

Tetrahydropalmatin hydrochlorid izolován z *Corydalis cava*

MnCl₂ × 4 H₂O

Všechny testované látky, kromě MnCl₂, byly získány z katedry farmaceutické botaniky a ekologie.

Látky pro přípravu mořské vody:

NaCl (PENTA)

MgCl₂ × 6 H₂O (PENTA)

CaCl₂ (PENTA)

KCl (PENTA)

Na₂SO₄ (PENTA)

deionizovaná voda

3.3.2. POMŮCKY A PŘÍSTROJE

Pomůcky:

Kádinky 25 ml a 50 ml

Váženka

Laboratorní lžička

Automatické mikropipety a špičky 20-200 μ l; 50-200 μ l; 100-1000 μ l; 0,5-5,0 ml

Skleněné zásobní láhve s plastovým uzávěrem 100 ml; 250 ml; 500 ml a 1000 ml

Petriho misky skleněné (průměr 10 cm)

Teploměr

Zkumavky se zábrusem

Stojan na zkumavky

Mikrotitrační desky s 96 jamkami

Přístroje:

ultrazvuková lázeň (SONOREX DIGITAL 10P BANDELIN)

předvážky (KERN)

analytické váhy (KERN ABJ)

inkubátor

stereomikroskop (LEICA EZ4 D)

3.4. PRACOVNÍ POSTUP

3.4.1. PŘÍPRAVA

3.4.1.1. Příprava mořské vody

Standardně připravená mořská voda slouží jako médium pro líhnutí cyst i pro samotný experiment, její salinita je v rozmezí $35 \pm 1 \text{ ‰}$ ^[36].

Složení na 1000 ml mořské vody:

Chlorid sodný (NaCl) 23,00 g

Chlorid hořečnatý ($\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$) 11,00 g

Síran sodný ($\text{Na}_2\text{SO}_4 \times 10\text{H}_2\text{O}$) 9,07 g

Chlorid vápenatý (CaCl_2) 2,11 g

Chlorid draselný (KCl) 0,70 g

Deionizovaná voda do 1000 ml

Všechny pevné složky jsme navážily do odměrné nádoby s ryskou o objemu 1000 ml. Poté doplnily deionizovanou vodou po rysku. Uzavřenou nádobu jsme umístily do ultrazvukové lázně, kde došlo k úplnému rozpuštění všech solí.

Po rozpuštění se pH mořské vody pohybovalo kolem $8 \pm 0,2$. Pokud pH nevyhovovalo stanovenému rozmezí, bylo možné ho upravit pomocí roztoku kyseliny chlorovodíkové nebo hydroxidu sodného. Pro odstranění případných nečistot jsme vodu zfiltraly před provedením vlastního pokusu.

Množství rozpuštěného kyslíku by nemělo klesnout pod 90 %.

3.4.1.2. Příprava testovaného organismu

Nejdřív jsme nechaly vylíhnout naulia. Líhnutí probíhalo v mořské vodě při teplotě 25 +/- 2 °C. Petriho misku s nauplii uzavřenou víčkem jsme umístily asi 30 cm od lampy se 100 W žárovkou. Po hodině zahřívání jsme misku s vajíčky přemístily do inkubátoru, ve kterém bylo zamezeno přístupu světla. K vylíhnutí došlo za 24 hodin. Pokud byly použity kvalitní cysty, líhivost se blížila k 100 %. Po vylíhnutí ležely mrtvé cysty na dně misky a prázdné skořápky plavaly na hladině. Polovinu Petriho misky jsme zakryly materiálem nepropouštějícím světlo. Díky pozitivní fototaxi se živé larvy (nauplia) nahromadily na nezakryté straně, čehož jsme využily při následném lovení. Za dokonalých podmínek byla životnost nauplií 96-120 hodin ^[37].

3.4.1.3. Příprava testovaných látek

Množství látky, které odpovídá nejvyšší koncentraci, jsme navázily do zábrusové zkumavky a rozpustily. Jako rozpouštědlo jsme použily mořskou vodu. Pro dokonalé rozpouštění jsme použily ultrazvukovou lázeň, testované látky jsme zde nechaly několik hodin.

Ředící řadu jsme připravily tak, že vzorek s nejvyšší koncentrací jsme ředily mořskou vodou v poměru 2:1 (ředící faktor 1,5). Tímto způsobem jsme připravily jedenáct koncentrací v sestupné řadě.

3.5. VLASTNÍ PROVEDENÍ POKUSU

Vychází z metodiky, kterou navrhl Paul Vanhaecke a kol. Pokusy jsme prováděly v plastových 96 jamkových mikrotitračních destičkách. Každá destička měla 8 řad a 12 sloupců. Do jedenácti sloupců (1-11) jsme napipetovaly předem připravenou ředící řadu roztoku zkoumané látky. Dvanáctý sloupec plnil funkci kontroly (K), do něj jsme napipetovaly pouze mořskou vodu. V řadách (A-G) bylo 7

paralelních stanovení. Jamky v první řadě sloužily jako promývací (P). Schéma pokusu je znázorněno v tabulce 1.

Tabulka 1: Schéma pokusu

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | K |
|---|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|-----------------|-----------------|-------------|
| P | C ₁ | C ₂ | C ₃ | C ₄ | C ₅ | C ₆ | C ₇ | C ₈ | C ₉ | C ₁₀ | C ₁₁ | mořská voda |
| A | C ₁ | C ₂ | C ₃ | C ₄ | C ₅ | C ₆ | C ₇ | C ₈ | C ₉ | C ₁₀ | C ₁₁ | mořská voda |
| B | C ₁ | C ₂ | C ₃ | C ₄ | C ₅ | C ₆ | C ₇ | C ₈ | C ₉ | C ₁₀ | C ₁₁ | mořská voda |
| C | C ₁ | C ₂ | C ₃ | C ₄ | C ₅ | C ₆ | C ₇ | C ₈ | C ₉ | C ₁₀ | C ₁₁ | mořská voda |
| D | C ₁ | C ₂ | C ₃ | C ₄ | C ₅ | C ₆ | C ₇ | C ₈ | C ₉ | C ₁₀ | C ₁₁ | mořská voda |
| E | C ₁ | C ₂ | C ₃ | C ₄ | C ₅ | C ₆ | C ₇ | C ₈ | C ₉ | C ₁₀ | C ₁₁ | mořská voda |
| F | C ₁ | C ₂ | C ₃ | C ₄ | C ₅ | C ₆ | C ₇ | C ₈ | C ₉ | C ₁₀ | C ₁₁ | mořská voda |
| G | C ₁ | C ₂ | C ₃ | C ₄ | C ₅ | C ₆ | C ₇ | C ₈ | C ₉ | C ₁₀ | C ₁₁ | mořská voda |

Dle uvedeného schématu jsme napipetovaly celou mikrotitrační destičku a do každé jamky jsme umístily 10 nauplií. Nejdřív jsme odlovily větší množství nauplií z Petriho misky a přenesly je do promývací jamky. Z té potom pomocí Pasteurovy pipety jsme přenesly po deseti kusech nauplií do zkoumaných jamek v rámci jednoho sloupce. Tímto způsobem jsme naplnily celou destičku. Odlov žábřonožek jsme provedly co nejrychleji a snažily jsme se přenášet žábřonožky s co nejmenším objemem vody, aby nebyly příliš vystaveny stresu a nedocházelo k dalšímu naředění roztoku.

Naplňenou destičku jsme přiklopily víčkem a vložily na 24 hodin do inkubátoru. Inkubace probíhala při 25 °C.

Po 24 hodinách jsme vyjmuly destičku z inkubátoru a pomocí mikroskopu jsme zhodnotily úmrtnost v každé jamce (kromě jamek promývacích). Za mrtvé jsme považovaly všechny larvy, u kterých nebyl pozorován pohyb déle než deset sekund.

Každý test jsme provedly 2-3× pro potvrzení výsledku.

3.6. VYHODNOCENÍ VÝSLEDKŮ

Pro každou koncentraci jsme vypočítaly procento úmrtnosti nauplí žábronožky a pomocí statistického programu GraphPadPrism 6 jsme získaly hodnotu 24hLC₅₀ v jednotkách mM pro všechny testované látky.

Výsledky jsme považovaly za platné, pokud procento úmrtnosti v kontrolách nepřesáhlo 10 %.

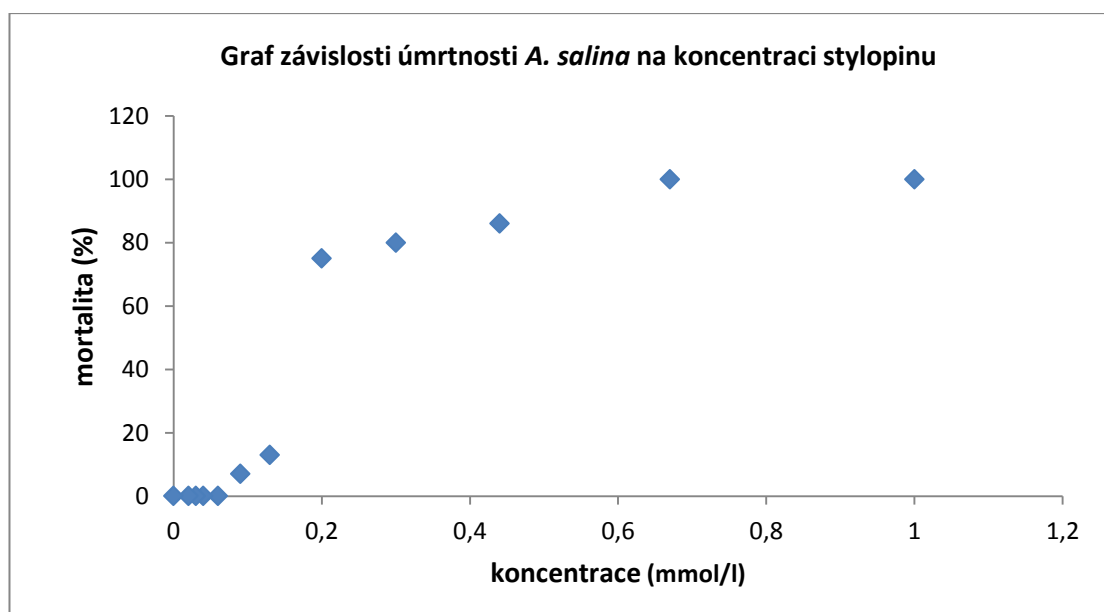
4. VÝSLEDKY

4.1. STYLOPIN

Jedním ze čtyř testovaných alkaloidů je stylopin. Ten jsme si připravili v iniciální koncentraci 1,00 mM. Koncentrace po naředění geometrickou řadou jsou uvedeny v tabulce 2.

Tabulka 2: Průměr úmrtnosti *A. salina* v procentech a směrodatná odchylka pro každou koncentraci při použití stylopinu.

| c(mM) | 1,00 | 0,67 | 0,44 | 0,30 | 0,20 | 0,13 | 0,09 | 0,06 | 0,04 | 0,03 | 0,02 | 0,00 |
|--------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|------|------|------|------|------|------|
| Průměr | 100,00 | 98,67 | 87,00 | 78,00 | 71,00 | 16,67 | 8,67 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| SD ± | 0,00 | 2,31 | 2,65 | 2,00 | 3,46 | 5,51 | 1,53 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |



Obr. 9: Závislost úmrtnosti *A. salina* na koncentraci při použití stylopinu 1,0 mM

Hodnota letální koncentrace vypočtená pomocí statistického programu GraphPadPrism 6 je:

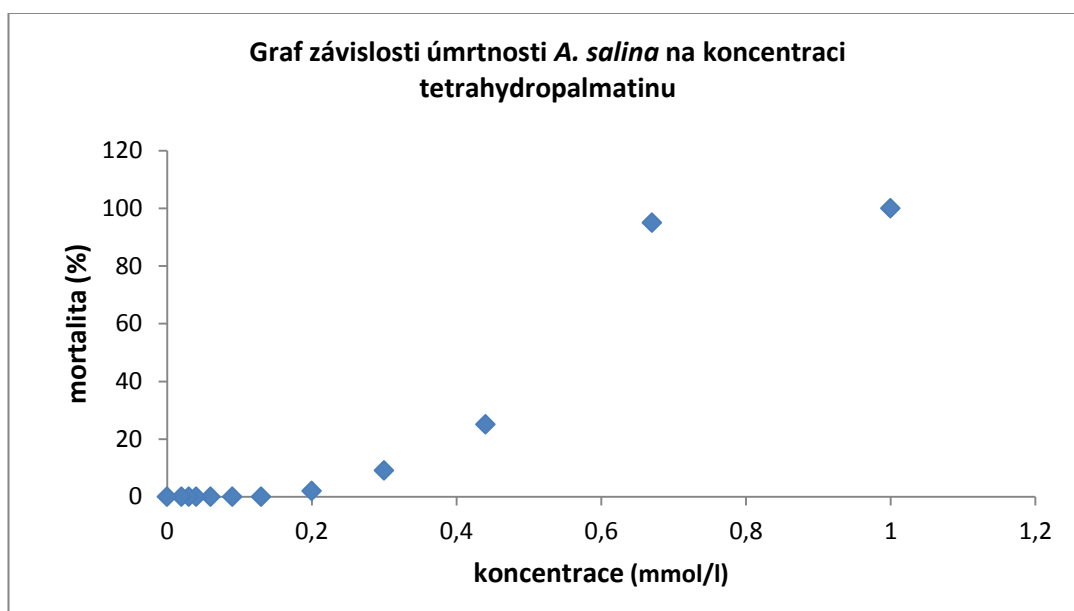
$$24hLC_{50} = 0,179 \pm 0,011 \text{ mM}$$

4.2. TETRAHYDROPALMATIN

Tetrahydropalmatin jsme si připravily v iniciální koncentraci 1,00 mM. Koncentrace po naředění geometrickou řadou jsou uvedeny v tabulce 3.

Tabulka 3: Průměr úmrtnosti v procentech a směrodatná odchylka pro každou koncentraci při použití tetrahydropalmatinu.

| c(mM) | 1,00 | 0,67 | 0,44 | 0,30 | 0,20 | 0,13 | 0,09 | 0,06 | 0,04 | 0,03 | 0,02 | 0,00 |
|--------|--------|-------|-------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| Průměr | 100,00 | 92,30 | 25,67 | 8,00 | 2,67 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| SD ± | 0,00 | 2,56 | 1,15 | 1,00 | 0,58 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |



Obr. 10: Závislost úmrtnosti *A. salina* na koncentraci při použití tetrahydropalmatinu 1,0 mM

Hodnota letální koncentrace vypočtená pomocí statistického programu GraphPadPrism 6 je:

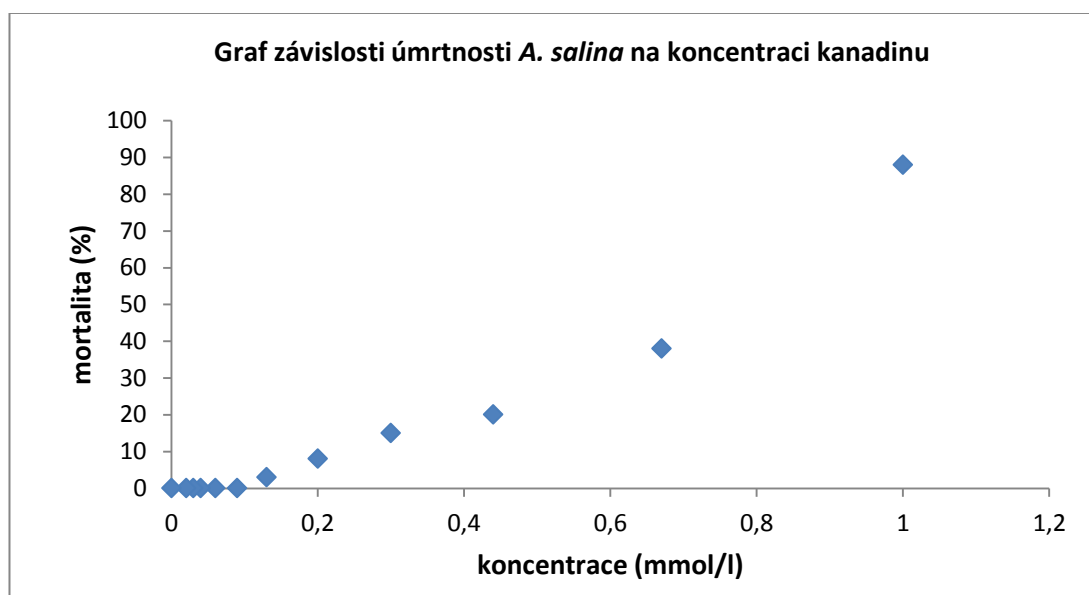
$$24hLC_{50} = 0,500 \pm 0,009 \text{ mM}$$

4.3. KANADIN

Kanadin jsme si připravily v iniciální koncentraci 1,00 mM. Koncentrace po naředění geometrickou řadou jsou uvedeny v tabulce 4.

Tabulka 4: Průměr úmrtnosti v procentech a směrodatná odchylka pro každou koncentraci při použití kanadinu.

| c(mM) | 1,00 | 0,67 | 0,44 | 0,30 | 0,20 | 0,13 | 0,09 | 0,06 | 0,04 | 0,03 | 0,02 | 0,00 |
|--------|-------|-------|-------|-------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| Průměr | 79,33 | 45,00 | 16,67 | 13,33 | 7,67 | 2,33 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| SD ± | 9,02 | 8,89 | 5,77 | 2,89 | 0,58 | 0,58 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |



Obr. 11: Závislost úmrtnosti *A. salina* na koncentraci při použití kanadinu 1,0 mM

Hodnota letální koncentrace vypočtená pomocí statistického programu GraphPadPrism 6 je:

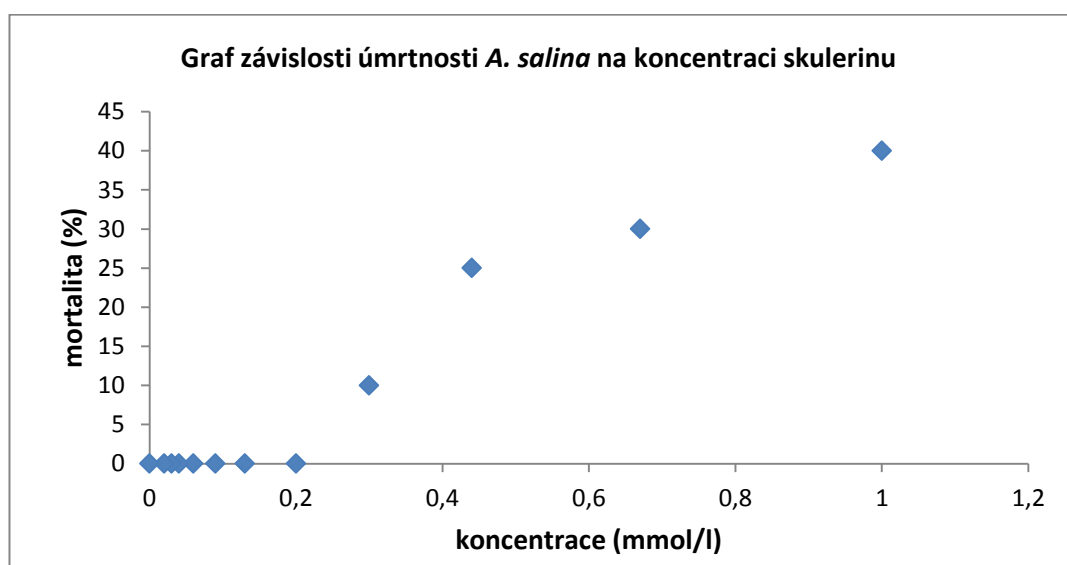
$$24hLC_{50} = 0,691 \pm 0,036 \text{ mM}$$

4.4. SKULERIN

Skulerin jsme si připravily v iniciální koncentraci 1,00 mM. Koncentrace po naředění geometrickou řadou jsou uvedeny v tabulce 5.

Tabulka 5: Průměr úmrtnosti v procentech a směrodatná odchylka pro každou koncentraci při použití skulerinu.

| c(mM) | 1,00 | 0,67 | 0,44 | 0,30 | 0,20 | 0,13 | 0,09 | 0,06 | 0,04 | 0,03 | 0,02 | 0,00 |
|--------|-------|-------|-------|-------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| Průměr | 39,00 | 23,33 | 23,33 | 10,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| SD ± | 3,61 | 5,77 | 2,89 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |



Obr. 12: Závislost úmrtnosti *A. salina* na koncentraci při použití skulerinu 1,0 mM

Hodnota letální koncentrace vypočtená pomocí statistického programu GraphPadPrism 6 je:

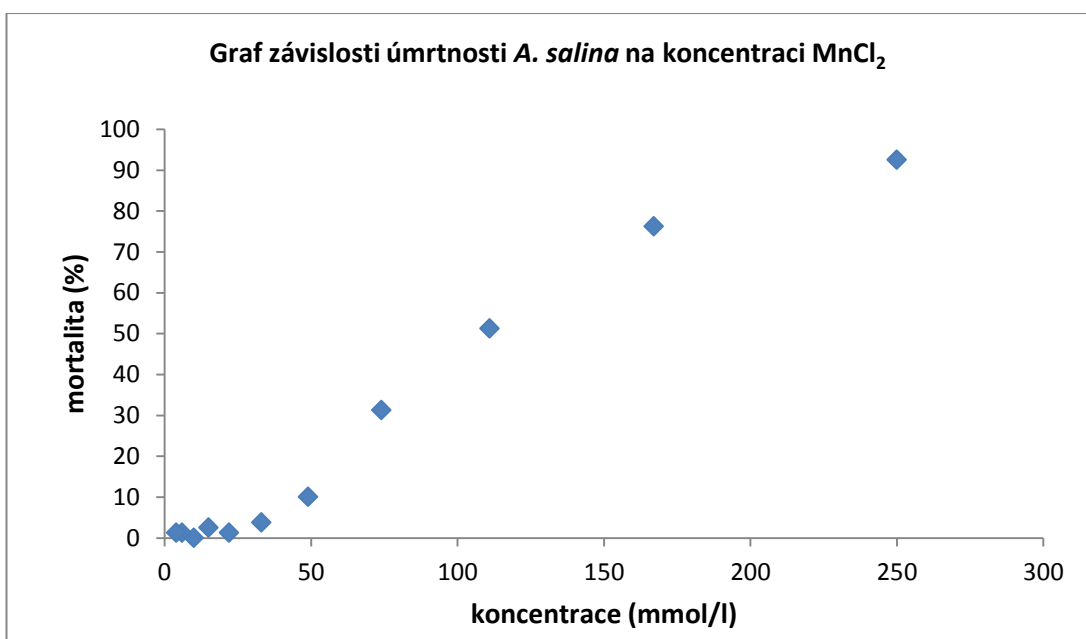
$$24hLC_{50} = 1,318 \pm 0,189 \text{ mM}$$

4.5. CHLORID MANGANATÝ

Chlorid manganatý MnCl_2 je narůžovělá, krystalická látka, dobře rozpustná ve vodě. Tato látka sloužila jako standard, pro ověření citlivosti testovaných žábřonožek.

Tabulka 6: Průměr úmrtnosti v procentech a směrodatná odchylka pro každou koncentraci při použití MnCl_2 .

| c (mM) | 250,00 | 167,00 | 111,00 | 74,00 | 49,00 | 33,00 | 22,00 | 15,00 | 10,00 | 0,00 |
|--------|--------|--------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|------|
| Průměr | 92,50 | 76,25 | 51,25 | 31,25 | 10,00 | 3,75 | 1,25 | 2,50 | 0,00 | 0,00 |
| SD ± | 8,29 | 16,54 | 7,81 | 10,53 | 5,00 | 2,84 | 1,01 | 1,33 | 0,00 | 0,00 |



Obr. 13: Závislost úmrtnosti *A. salina* na koncentraci při použití MnCl_2

Hodnota letální koncentrace vypočtená pomocí statistického programu GraphPadPrism 6 je:

$$24\text{hLC}_{50} = 118,8 \pm 6,6 \text{ mM}$$

5. DISKUSE

Tato práce byla zaměřena na stanovení toxicity alkaloidů a jejich LC₅₀ pomocí alternativního precreeningového testu na žábřonožce solné. Testované alkaloidy nám poskytla vědecká skupina ADINACO, která studuje látky získané z rostlin a hub. Jejím výzkum je zaměřen na látky, které ovlivňují vývoj Alzheimerovy choroby na patologické úrovni^[44].

Artemia salina patří mezi bezobratlé živočichy a je schopná se přizpůsobit značnému rozpětí salinity (5 – 250 g·l⁻¹) a teplot (6 – 35 °C)^{[40] [46]}. Během testů je však nutné zajistit optimální salinitu, která umožní správný vývoj a růst nauplií žábřonožky.

V posledních letech byl vyvinut velký počet krátkodobých testů toxicity s využitím bezobratlých živočichů. Obrovskou výhodou alternativních testů s využitím žábřonožky, je možnost jejich miniaturizace. Mikrobiotesty jsou snadno dostupné, cenově i časově nenáročné, úsporné z hlediska pracovních sil i prostoru a nevyžadují nákladné laboratorní vybavení. I když jsou tyto testy řazeny mezi alternativní metody, jsou prováděny *in vivo*. To znamená, že organismus, se kterým pracujeme, má zachovány životní funkce po celou dobu testování^{[35] [47]}.

Vědci tvrdí, že žábřonožka je velmi vhodným kandidátem pro vývoj standardního biotestu s možností celosvětového využití^[35]. Žábřonožku lze také využít jako biosenzor ve farmakologii a farmakotoxikologii^[32]. Díky stále častějšímu využívání alternativních testů můžeme snížit počet používaných laboratorních zvířat^[32].

Jednotlivá vývojová stádia (instary) *Artemia salina* mají různou citlivost. Výrazně citlivější jsou larvy instaru II-III než larvy instaru I. Přejchod mezi jednotlivými vývojovými stádii závisí na teplotě, množství a kvalitě potravy. Pokud larvy nemají přísun živin, umírají během třetího nebo čtvrtého vývojového stádia. Pro test používáme pouze čerstvě odlovená nauplia^{[35] [48]}.

Nutno podotknout, že vlastnosti a citlivost k chemikáliím, se mezi jednotlivými kmeny žábřonožek liší. Pro reprodukovatelnost testu je tedy nutné znát přesný geografický původ kmene žábřonožky. Důraz je také kladen na dodržení podmínek experimentu, jako je časové rozpětí mezi vylíhnutím a začátkem testu, teplota a salinita média, teplota během inkubace a líhnutí, a použití stejného vývojového stádia *A. salina*^[48]. Při nedodržení podmínek test nelze hodnotit.

Paralelně s každým testem by měl probíhat kontrolní test se standardním toxinem, v našem případě jsme použily chlorid manganatý.

Artemia salina je často porovnávána s dalším vodním živočichem – *Daphnia magna* (hrotnatka velká), která je sladkovodním organismem a používá se při standardních ekotoxikologických testech. V závislosti na mineralizaci média, volíme testovaný organismus. Citlivost hrotnatky se s rostoucí mineralizací snižuje, proto ve vysoce mineralizovaném prostředí používáme pro testy toxicity žábřonožku. Citlivost žábřonožky vůči testovaným látkám je však ve srovnání s hrotnatkou o něco nižší^[49].

Při hodnocení výsledků musíme brát v potaz, že přímá extrapolace získaných dat na člověka není možná. Lidský organismus bude mít vždy určitá specifika, která u testovaného organismu nenajdeme.

Látky, které se po prvotních testech toxicity jeví jako vysoce toxické, by neměly být podrobeny dalšímu testování. Zařazení žábřonožky do fáze prescreeningu nám může dovolit zachytit potenciálně toxické látky.

Toxicita byla testována pro čtyři vybrané alkaloidy: stylopin, tetrahydropalmatin, kanadin a skulerin. Jsou to organické sloučeniny, které mají v základním skeletu isochinolinovou strukturu. Celý experiment probíhal v prostředí mořské vody. Vzhledem k tomu, že testované látky jsou v mořské vodě obtížně rozpustné, využily jsme ultrazvukovou lázeň pro usnadnění rozpouštění. I přes použití ultrazvuku se nepodařilo všechny testované látky dokonale rozpustit. Zpravidla vznikla jemná suspenze, kterou jsme použily pro další testování.

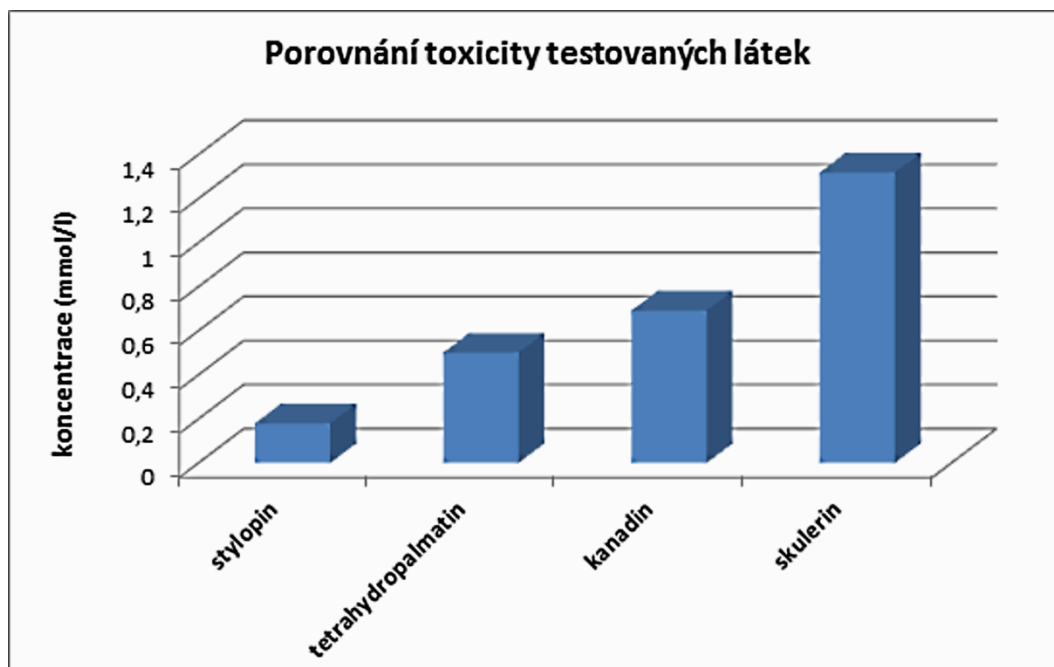
Všechny roztoky alkaloidů byly připraveny ve výchozí koncentraci 1 mM a ředěny geometrickou řadou s ředícím faktorem 1,5. Jejich měřením jsme získaly hodnoty letální koncentrace 24hLC₅₀, což je koncentrace zkoušené látky, která po jednorázovém podání usmrtí 50 % testovaných jedinců. Vždy musí být doplněná časovým údajem (dobou expozice), který je pro konečný efekt rozhodující. V našem případě byla doba expozice 24 hodin^[50]. Čím nižší je hodnota LC₅₀, tím toxičtější je zkoušená látka.

Stylopin byl použit ve výchozí koncentraci 1 mM, jak bylo zmíněno výše, což po naředění odpovídalo koncentracím od 1 mM do 0,02 mM. Naměřená letální koncentrace se rovnala 0,179 mM. Pro kanadin se hodnota LC_{50} rovnala 0,691 mM. Kanadin a stylopin byl využit také v jiné studii, která byla zaměřená na hodnocení inhibičního účinku vůči AKR1C3 (aldo-keto redukující enzym). AKR1C3 je důležitý lidský enzym, který se účastní biotransformace xenobiotik, jako jsou léky či prokarcinogeny. Jeho koncentrace je často zvýšená u různých druhů rakoviny, proto při léčbě těchto patologických stavů je AKR1C3 terapeutickým cílem. Na inhibiční schopnost byly testovány různé isochinolinové alkaloidy. Vyšší inhibiční účinnost projevili kanadin a stylopin, kromě toho vykazují relativně vysokou selektivitu vůči AKR1C3. Stylopin byl nejsilnějším AKR1C3 inhibitorem, významně inhiboval AKR1C3 u zdravých buněk bez výrazného cytotoxického účinku. Z tohoto důvodu může být použit jako model AKR1C3 inhibitorů ve výzkumu nebo hodnocen jako možné protinádorové léčivo. IC_{50} pro kanadin byla 0,029 mM a pro stylopin 0,0077 mM. Stylopin snižoval životaschopnost buněk o 29 % při koncentraci 0,050 mM ^[52].

Dalším strukturním analogem je tetrahydropalmatin. Jeho hodnota letální koncentrace byla 0,500 mM a lze ji srovnat s kanadinem. Oproti tomu ve studii, která zkoumala jeho inhibiční aktivitu vůči AChE, byla dosažena IC_{50} 0,876 mM ^[66].

Poslední testovanou látkou byl skulerin, který vůči *A. salina* vykazoval nízkou toxicitu. Nejvyšší dosažená úmrtnost byla 42 % u maximální měřené koncentrace (1 mmol/l). Vyšších koncentrací nebylo možné dosáhnout díky zmíněné nerozpustnosti látky. Jeho hodnota letální koncentrace byla 1,318 mM. V jiné studii, kde byla měřena jeho inhibiční aktivita vůči AChE, se IC_{50} rovnala 0,245 mM ^[66].

Při porovnávání toxicity testovaných látek vůči *A. salina* jsme vycházely z naměřených hodnot LC_{50} .



Obrázek 14: porovnání hodnot LC_{50} testovaných alkaloidů

Pro zvýšení rozpustnosti testovaných látek by bylo možné využít DMSO do 2 % jako kosolvens. Jeho toxicita vůči *Artemia salina* je nízká, neovlivňuje její životní děje a neměl by ovlivnit vyhodnocení získaných dat ^[38].

Další variantou je použití pozdějších vývojových stádií žábřonožky, které jsou citlivější ^[35].

6. ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo zavést metodu toxikologického screeningu alkaloidů na žábřonožce solné (*Artemia salina*) a následně pomocí této metody vyhodnotit čtyři alkaloidy: stylopin, tetrahydropalmatin, kanadin a skulerin.

Nauplia žábřonožky jsou vhodné pro akutní toxikologický screening. Pro testování byly použity čerstvě vylíhnuté larvy odlovené do roztoků různých koncentrací zkoumané látky. Byla zjišťována akutní toxicita po 24 hodinách. Celý pokus probíhal v prostředí mořské vody, protože *Artemia salina* je vodním organismem.

Testované látky bylo nutno rozpustit v mořské vodě. Pro snadnější rozpouštění byla použita ultrazvuková lázeň. Všechny čtyři zkoumané alkaloidy mají podobnou chemickou strukturu, řadíme je mezi isochinolinové alkaloidy.

Jako nejtoxičtější z testovaných alkaloidů byl vyhodnocen stylopin, izolovaný z vlašovičnicku většího. Naměřená hodnota letální koncentrace (24hLC_{50}) byla $0,179 \pm 0,011$ mM. O něco méně toxický byl tetrahydropalmatin, který je obsažen v dýmnicve duté. U tetrahydropalmatinu byla hodnota letální koncentrace (24hLC_{50}) $0,500 \pm 0,009$ mM. Třetí testovanou látkou byl kanadin, izolovaný z vodilky kanadské. Hodnota letální koncentrace (24hLC_{50}) byla rovna $0,691 \pm 0,036$ mM. Nejmenší toxicitu projevil skulerin, získaný z dýmnicvy duté. Hodnota letální koncentrace (24hLC_{50}) pro skulerin byla $1,318 \pm 0,189$ mM.

Test se standardním toxinem, chloridem manganatým, pro stanovení citlivosti larev žábřonožky, probíhal za stejných podmínek jako testy s hodnocenými alkaloidy.

7. SEZNAM ZKRATEK

ZKRATKY

| | |
|---------------------|---|
| AD | Alzheimerova choroba |
| AChE | acetylcholinesteráza |
| LC ₅₀ | koncentrace, při které zemře 50 % testovaných organismů |
| 24hLC ₅₀ | koncentrace zkoušené látky mající za následek 50% úmrtnost testovaného organismu po 24 hodinovém působení |
| DMSO | dimethylsulfoxid |
| CNS | centrální nervová soustava |
| RNA | ribonukleová kyselina |
| CYP | cytochrom P |
| AKR1C3 | aldo-keto redukující enzym |
| GABA | kyselina γ -aminomáselná |

8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. HYNIE, S. *Farmakologie v kostce*. Praha: Triton, 2001, 520. ISBN 80-725-4181-1.
2. MAČÁK, J. a MAČÁKOVÁ, J. *Patologie*. Praha: Grada, 2004, 347. ISBN 80-247-0785-3.
3. ELLIS, J. M. Cholinesterase inhibitors in the treatment of dementia. *J Am. Osteopath. Assoc.* 2005, 105 : 145–158.
4. POVÝŠIL, C. a CIPROVÁ, V. *Speciální patologie*. Praha: Galén, 2007, 430. ISBN 978-807-2624-942.
5. SILBERNAGL, S. *Atlas patofyziologie člověka*. Praha: Grada, 2001, 390. ISBN 80-716-9968-3.
6. KRMENČÍK, P. a KYSILKA J. Toxikon - alkaloidy. [online]. [cit. 2015-03-04]. Dostupné z: <http://www.biotox.cz/toxikon/rostliny/alkaloidy.php>
7. BRÍŽĎALA, J. Alkaloidy. [online]. [cit. 2015-03-04]. Dostupné z: <http://www.e-chembook.eu/cs/alkaloidy>
8. SUCHÝ, V. *Farmakognosie: Část všeobecná*. Brno: Univerzita Komenského, 1994, 213. ISBN 9788022307284.
9. STREBLOVÁ, E. *Souhrnné texty z chemie: pro přípravu k přijímacím zkouškám (přírodovědné obory, lékařství)*. Praha: Karolinum, 2013, 237. ISBN 978-802-4622-422.
10. KALAČ, P. *Organická chemie přírodních látek a kontaminantů*. České Budějovice: Jihočeská univerzita, 2001, 120. ISBN 80-704-0520-1.
11. JAHODÁŘ, L. *Farmakobotanika: semenné rostliny*. Praha: Karolinum, 2006, 258. ISBN 80-246-1225-9.
12. DOLEŽAL, M. *Farmaceutická chemie léčiv působících na autonomní nervový systém*. Praha: Univerzita Karlova, 2009, 134. ISBN 978-802-4616-339.
13. DOLEŽAL, M. *Farmaceutická chemie léčiv působících na centrální nervový systém*. Praha: Karolinum, 2013, 188. ISBN 9788024623825.
14. HARTL, J. et al. *Farmaceutická chemie IV*. Praha: Karolinum, 2012, 166. ISBN 978-802-4621-296.
15. Benzylisochinolinové alkaloidy. Velký lékařský slovník. [online]. [cit. 2015-03-08]. Dostupné z: <http://lekarske.slovniky.cz/pojem/benzylisochinolinove-alkaloidy>

16. ADSERSEN, A. et al. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory compounds from *Corydalis cava* Schweigg. *Journal of Ethnopharmacology*. 2007, 113 : 179-182.
17. LÜLLMANN, H. et al. *Farmakologie a toxikologie*. Praha: Grada, 2004, 725. ISBN 80-247-0836-1.
18. SUCHÝ, V. *Farmakognosie: Část speciální I*. Brno: Univerzita Komenského, 1993, 178. ISBN 80-223-0727-0.
19. Scoulerine Pubchem. [online]. [cit. 2015-03-08]. Dostupné z: <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/439654#section=Top>
20. AZIMOVA, S. S. *Natural compounds: plant sources, structure and properties*. 2012, 824. ISBN 978-1-4614-0559-7.
21. HAWKINS, K. M. et al. Production of benzylisoquinoline alkaloids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature Chemical Biology*. 2008, 4 : 564-573.
22. SHAMMA, M. *The Isoquinoline Alkaloids Chemistry and Pharmacology Chemistry and Pharmacology*. Oxford: Elsevier Science, 1972. ISBN 978-032-3144-506.
23. CHENG, X. et al. DNA Topoisomerase I Inhibitory Alkaloids from *Corydalis saxicola*. *Chemistry*. 2008, 5 : 1335-1344.
24. MIYAZAWA, M. et al. Insecticidal alkaloids from *Corydalis bulbosa* against *Drosophila melanogaster*. *J. Agric. Food Chem*. 1998, 46 : 1914 –1919.
25. Korýši (Crustacea) Zoologie pro veterinární mediky, Brno. [online]. [cit. 2014-03-10]. Dostupné z: <http://www.zoologie.frasma.cz/abecedni%20seznam.html>
26. ABATZOPOULOS, Th. *Artemia: basic and applied biology*. Boston: Kluwer Academic Publishers, 2002, 286. ISBN 14-020-0746-9.
27. ŘÍHOVÁ AMBROŽOVÁ, J. Encyklopedie hydrobiologie. výkladový slovník. Vysoká škola chemicko-technologická, Praha. [online] [cit. 2015-03-10]. Dostupné z: http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es006/ebook.copyright.htm
28. SEDLÁK, E. *Zoologie bezobratlých*. Brno: Masarykova univerzita, 2002, 336. ISBN 80-210-2892-0.
29. Artemia World. [online]. [cit. 2015-03-11]. Dostupné z: <http://www.artemiaworld.com/home/index.php?lng=cz>

30. Brine Shrimp. [online]. [cit. 2015-03-11]. Dostupné z: <http://www.discusnews.com/article/cat-01/brine-shrimp.shtml>
31. EMSLIE, S. Reproduction from Animal Diversity Web. *Encyclopedia of Life* [online]. [cit. 2015-03-11]. Dostupné z: http://eol.org/data_objects/18634424
32. DVOŘÁK, P. et al. Use of the Crustacean *Artemia franciscana* for Alternative Biotests. *Acta Veterinaria*. 2010, 79 : 47-53.
33. BROWNE, R. A. et al. *Artemia biology*. Boca Raton: CRC Press, 1991, 374. ISBN 08-493-6729-8.
34. HICKMAN, C. P. *Biology of the invertebrates*. Saint Louis: Mosby, 1973, 757. ISBN 08-016-2170-4.
35. TOĞULGA, M. The short-term toxicity of two toxicants to *Artemia Nauplii*. *Turkish Journal of Zoology*. 1998, 22 : 259-266.
36. VANHAECKE, P. et al.. Proposal for a short-term toxicity test with *Artemia nauplii*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 1981, 5 : 382-387.
37. Standardní operační postup Laboratoře ekotoxikologie a LCA. [online]. [cit. 2015-02-25]. Dostupné z: <http://old.vscht.cz/uchop/udalosti/skripta/I5r/AkutnitestArtemia.htm>
38. SKLENÁŘ, Z. et al. Možnosti využití biotestu s *Artemia salina* při studování toxikologických účinků inhibitorů cyklindependentních kináz. *Klin Farmakol Farm*. 2006, 20 : 62-65.
39. Test akutní toxicity na žábřonožkách *Artemia salina* [online]. [cit. 2015-03-10]. Dostupné z: <http://ekotoxikologie.sweb.cz/toxlab/vyuka/artemia.htm#Toc526134013>
40. NUNES, B. S. et al. Use of the genus *Artemia* in ecotoxicity testing. *Environmental Pollution*. 2006, 144 : 453-462.
41. MARINI, F. The Breeder's Net. *Artemia Nauplii As A Food Source* [online]. [cit. 2015-03-13]. Dostupné z: <http://www.advancedaquarist.com/2002/12/breeder>

42. Kanadin - Velký lékařský slovník [online]. [cit. 2015-03-08]. Dostupné z : <http://lekarske.slovníky.cz/pojem/kanadin>
43. PARK, S. Potential therapeutic agents against Alzheimer's disease from natural sources. *Archives of Pharmacal Research*. 2010, 33 : 1589-1609.
44. ADINACO - Vědecký portál farmaceutické fakulty UK. [online]. [cit. 2015-03-17]. Dostupné z: <http://portal.faf.cuni.cz/Groups/ADINACO/>
45. TACKAERT, W. and SORGELOOS P. The Use of Brine Shrimp *Artemia* in Biological Management of Solar Saltworks, *Seventh Symposium on Salt*, 1993, 1 : 617-622.
46. LAGARTOPARRA, A. Comparative study of the assay of and the estimate of the medium lethal dose (LD50 value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. *Phytomedicine*. 2001, 8 : 395-400.
47. DOLEŽALOVÁ WEISSMANNOVÁ, H. et al. Stanovení toxicity "MUSK" sloučenin s využitím alternativních testů ekotoxicity. *Chem. Listy*. 2013, 107: 172-177.
48. SORGELOOS, P. et al. The Use of *Artemia* Nauplii for Toxicity Tests - A Critical Analysis. *Ecotoxicology and environmental safety*. 1978, 2: 249-255.
49. TOUSSAINT, M. W. et al. A comparison of standard acute toxicity tests with rapid-screening toxicity tests. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 1995, 14 : 907-915.
50. LINHART, I. *Toxikologie: interakce škodlivých látek s živými organismy, jejich mechanismy, projevy a důsledky*. Vyd. 1. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2012, 375. ISBN 978-807-0808-061.
51. CORRECHÉ, E. R. et al. Biological effects and structural aspects. *Bioorganic*. 2008, 16 : 3641-3651.
52. SKARYDOVA, L. et al. Isoquinoline alkaloids as a novel type of AKR1C3 inhibitors. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 2014, 143 : 250-258.
53. ITO, C. et al. Chemopreventive activity of isoquinoline alkaloids from *Corydalis* plants. *Planta Med*. 2001, 67: 473 –475.
54. SATOU, T. et al. Assay of nematocidal activity of isoquinoline alkaloids using third-stage larvae of *Strongyloides ratti* and *S. venezuelensis*. *Vet. Parasitol*. 2002, 104 : 131–138.

55. SALMINEN, K. A. et al. Inhibition of human drug metabolizing cytochrome P450 enzymes by plant isoquinoline alkaloids. *Phytomedicine* 2011, 18 : 533–538.
56. LEE, J. et al. Cytotoxic isoquinoline alkaloids from *Chelidonium majus* var. *asiaticum*. *Agric. Chem. Biotech.* 2005, 48: 198–201.
57. JANG, S. I. Stylophine from *Chelidonium majus* inhibits LPS-induced inflammatory mediators in RAW 264.7 cells. *Arch. Pharmacol Res.* 2004, 27 : 923–929.
58. JIN, G. et al. Different effects of enantiomers of tetrahydropalmatine on dopaminergic system. *Sci. Sin. B* 1986, 29 : 1054–1064; Chem. Abstr. 106, 131533 (1987).
59. SUN, S. et al. Application of tetrahydropalmatine enantiomer in preparation of P-glycoprotein inhibitor. Faming Zhu-anli Shenqing CN 102100694 A 20110622; Chem Abstr. 155, 84048 (2011).
60. ZHAO, M. et al. Inhibitory and inductive effects of (–)- and (+)-tetrahydropalmatine on CYP450 in mice. *Zhejiang Daxue Xuebao, Yixueban* 2011, 40 : 33–39; Chem. Abstr. 156, 114502 (2011).
61. HAIYAN, L. et al. Corydaline derivatives useful for reducing lipid levels. PCT Int. Appl. WO 2010075469 A1 20100701; Chem. Abstr. 153, 145700 (2010).
62. CHOI, S. Y. et al. Human brain GABA-T (γ -aminobutyric acid transaminase) inhibitory alkaloids from *Corydalis tuber*. *Agric. Chem. Biotech.* 2003, 46 : 67–72.
63. CHEN, J. J. et al. A new tetrahydroprotoberberine N-oxide alkaloid and anti-platelet aggregation constituents of *Corydalis tashiroi*. *Planta Med.* 2001, 67 : 423–427.
64. CHEN, J. J. et al. New tetrahydroprotoberberine N-oxide alkaloids and cytotoxic constituents of *Corydalis tashiroi*. *Planta Med.* 1999, 65 : 643–647.
65. SADRITDINOV, F. S. et al. Relation between chemical structure and sedative activity of derivatives of diisoquinoline alkaloids. *Dokl. Akad. Nauk UzSSR* 1982, 10 : 34–35; Chem. Abstr. 98, 83240 (1982).
66. CHLEBEK, J. Doktorská práce. Univerzita Karlova v Praze. Farmaceutická fakulta. Hradec Králové. 2012

67. DONG, Z. J. et al. GTP regulation of (–)-stepholidine binding to RH of D1 dopamine receptors in calf striatum. *Biochem. Pharmacol.* 1997, 54 : 227–232.
68. HALBSGUTH, C., MEISSNER, O., HABERLEIN, H. Positive cooperation of protoberberine type 2 alkaloids from *Corydalis cava* on the GABAA binding site. *Planta Med.* 2003, 69 : 305 –309.
69. CHLEBEK, J. et al. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory compounds from *Corydalis cava* (Fuma-riaceae). *Nat. Prod. Commun.* 2011, 6 : 607–610.
70. <http://www.mirror.co.uk/news/uk-news/killer-shrimp-has-invaded-uk-waters-175486> , staženo 12. března 2015
71. <http://www.advancedaquarist.com/2002/12/breeder> , staženo 12. března 2015

ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra farmaceutické botaniky a ekologie

Kandidát: Beáta Bystroňová
Školitel: RNDr. Jitka Vytlačilová, Ph.D.
Název diplomové práce:

Hodnocení alkaloidů pomocí *in vivo* testů s *Artemia salina* II.

Nejčastější příčinou demence u starších pacientů je pravděpodobně Alzheimerova choroba (AD). Prevalence tohoto onemocnění značně stoupá. V současné době se k léčbě AD používají hlavně inhibitory acetylcholinesterázy, ty však mohou zmírnit příznaky AD, ale ne zastavit progresi nemoci. V důsledku toho jsou zapotřebí terapeutické prostředky proti AD, které působí na různých patologických úrovních.

V poslední době jsou intenzivně studovány přírodní látky, které by mohly farmakologicky ovlivnit neurodegenerativní procesy AD. Pro každou látku je potřeba udělat toxikologický screening, což bylo naším úkolem. Vhodným organismem k hodnocení akutní toxicity se zdá být *Artemia salina*, kterou jsme použily i v pokusu pro účely této práce. Test probíhal v 96 jamkové destičce.

Byly testovány čtyři látky, které patří mezi isochinolinové alkaloidy: stylopin, tetrahydropalmatin, kanadin a skulerin. Největší toxicitu vykazoval stylopin, o něco menší tetrahydropalmatin a kanadin. Nejmenší toxicitu z testovaných látek měl skulerin.

ABSTRACT

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmaceutical Botany and Ecology

Candidate: Beáta Bystroňová

Consultant: RNDr. Jitka Vytlačilová, Ph.D.

Title of diploma thesis:

The evaluation of alkaloids using *in vivo* tests with *Artemia salina* II.

The most common cause of dementia in the elderly is probably Alzheimer's disease (AD). The prevalence of this disease increases considerably. Nowadays only acetylcholinesterase inhibitors are being used for the treatment of AD, they can relieve symptoms of AD, but can't stop progression of the disease. Consequently there is a need for therapeutic agents against AD, which act on various pathological levels.

More intensive recent studies are being carried out on natural substances that could pharmacologically affect AD neurodegenerative processes. Our aim was to carry out the toxicological screening for each tested substance. For the purpose of this work we have used *Artemia salina* in the experiment which seems to be suitable organism for evaluating acute toxicity. The experiment was conducted in a miniature environment.

Four substances which belong to isoquinoline alkaloids: stylophine, tetrahydropalmatine, canadine and scoulerine were tested. The greatest toxicity showed stylophine, slightly lower tetrahydropalmatine and canadine. The lowest toxicity of tested substances showed scoulerine.