

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

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Biologická aktivita obsahových látek rostlin XXII.
Alkaloidy *Papaver somniferum* L. a jejich účinek na lidské cholinesterasy.

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

Vedoucí diplomové práce: prof. RNDr. Lubomír Opletal, CSc.

Hradec Králové, květen 2015

Jiří Daněk

CHARLES UNIVERSITY IN PRAGUE
FACULTY OF PHARMACY IN HRADEC KRÁLOVÉ
DEPARTMENT OF PHARMACEUTICAL BOTANY AND ECOLOGY

DIPLOMA THESIS

Biological activity of plant metabolites XXII.

Alkaloids of *Papaver somniferum* L. and their activity against human cholinesterases.

Head of the department: doc. Ing. Lucie Cahlíková, Ph.D.

Supervisor of the diploma thesis: prof. RNDr. Lubomír Opletal, CSc.

Hradec Králové, May 2015

Jiří Daněk

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že tato diplomová práce je mým původním autorským dílem a veškerá literatura i další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpal, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Tato práce nebyla použita k získání stejného či jiného titulu.

Diplomová práce vznikla za podpory Specifického vědeckého výzkumu UK v Praze, Farmaceutické fakulty v Hradci Králové (SVV 260 062).

V Novém Městě nad Metují

12. 5. 2015

.....
Jiří Daněk

Děkuji panu prof. RNDr. Lubomíru Opletalovi, CSc. za odborné vedení mé diplomové práce, podklady, materiály, cenné rady a připomínky při jejím vypracování. Děkuji vedení a pracovníkům katedry farmaceutické botaniky a ekologie za příjemné pracovní prostředí a ochotnou pomoc při řešení problémů.

OBSAH

1. ÚVOD	8
2. CÍL PRÁCE	10
3. TEORETICKÁ ČÁST	11
3.1 Charakteristika a rozdělení demencí	11
3.2 Charakteristika Alzheimerovy choroby	11
3.3 Farmakoterapie Alzheimerovy choroby	16
3.3.1 Kognitivní farmakoterapie	16
3.3.1.1 Inhibitory acetylcholinesterasy	16
3.3.1.2 Agonisté muskarinových a nikotinových receptorů	19
3.3.1.3 Prekurzory tvorby acetylcholinu	20
3.3.1.4 Nootropika a další látky	20
3.3.1.5 Scavangery volných kyslíkových radikálů	21
3.3.1.6 Parciální inhibitory NMDA receptorů	21
3.3.1.7 Centrálně působící antiflogistika	22
3.3.1.8 Nervové růstové hormony	22
3.3.2 Nekognitivní farmakoterapie	23
3.3.3 Nové způsoby farmakoterapie	23
3.3.4 Alkaloidy a jejich deriváty použitelné pro léčbu a prevenci demencí	24
3.3.4.1 Inhibitory acetylcholinesterasy	24
3.3.4.2 Inhibitory β -sekretas	27
3.3.4.3 Alkaloidy inhibující agregaci β -amyloidu	27
3.3.4.4 Alkaloidy inhibující fosforylaci τ -proteinu	28

3.4	Papaver somniferum L. – mák setý	29
3.4.1	Synonyma	29
3.4.2	Systematické zařazení	30
3.4.3	Botanický popis	30
3.4.4	Rozšíření a ekologie	30
3.4.5	Obsahové látky	31
3.4.6	Farmakologické účinky obsažených alkaloidů	33
3.4.6.1	Morfin	34
3.4.6.2	Thebain	35
3.4.6.3	Kodein	35
3.4.6.4	Papaverin	36
3.4.6.5	Narkotin	36
3.4.7	Biosyntéza obsažených alkaloidů	37
4.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	39
4.1	Obecné metody	39
4.1.1	Příprava a čištění rozpouštědel	39
4.1.2	Odpařování extraktů a jejich uchování	39
4.1.3	Stanovení struktury izolované látky	39
4.2	Rostlinný materiál	39
4.3	Příprava extraktů	40
4.4	Tenkvrstvá chromatografie (TLC)	43
4.4.1	Adsorbenty	43
4.4.2	Chromatografické soustavy	43
4.4.3	Detekční činidla	43

4.5	Chemikálie, rozpouštědla a další potřeby	44
4.5.1	Pro přípravu extraktů a TLC	44
4.5.2	Pro stanovení cholinesterasové aktivity (vč. přípravy erytrocytárních pouzder)	44
4.5.3	Pro stanovení antioxidační aktivity	46
4.6	Izolace a stanovení struktury izolovaných látek	47
4.6.1	Dělení výtřepku ADd za použití TLC	47
4.6.2	Zpracování zóny č. 3	48
4.7	Stanovení cholinesterasové inhibiční aktivity (IC₅₀)	49
4.8	Stanovení antioxidační aktivity (DPPH test)	50
5.	VÝSLEDKY	51
5.1	Stanovení struktury JD-1	51
5.2	NMR studie kodeinu	51
5.3	Výsledky cholinesterasové inhibiční aktivity	52
5.4	Výsledky antioxidační aktivity	53
6.	DISKUZE	54
7.	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	57
8.	LITERATURA	58

1. ÚVOD

Na poli medicíny dochází zejména v posledním půlstoletí ke značným změnám a pokrok v oblasti vědy a techniky lidstvu nyní dovoluje dříve nemyslitelné. Moderní diagnostické a léčebné postupy, přístrojové vybavení a neustále se rozvíjející znalosti umožňují současným lékařům zachránit život, či alespoň zlepšit jeho kvalitu u nemocných dosud nevyлéčitelných, i těm pacientům, kteří by před pár desítkami let svému onemocnění podlehl. Spolu se vzrůstající životní úrovní a zvyšováním průměrného věku lidské populace se ve velké míře projevují i onemocnění, která byla donedávna spíše ojedinělá.

Moderní člověk je neustále nucen přizpůsobovat se zrychlujícímu životnímu tempu a narůstajícímu psychickému napětí, což spolu se špatnou životosprávou, kouřením, nadměrnou konzumací alkoholu a minimálním pohybem nese celou řadu vážných komplikací. Ve zvýšené míře se v důsledku toho u obyvatelstva vyskytuje stres a nervozita, celková únava organismu, bolesti hlavy a pohybového ústrojí, bolesti žaludku a obtíže s trávením potravy, poruchy oběhového systému a celá řada dalších fyzických i psychických projevů. Vše je zejména patrné u obyvatel velkých měst, neboť právě městský život je pro výše zmíněný výčet nešvarů typický.

Onemocnění vzniklá jako důsledek současného životního stylu můžeme označit pojmem civilizační (chronické) choroby. Jedná se o soubor zdánlivě nesourodých onemocnění, jejichž společným jmenovatelem je právě nevhodný životní styl. Mezi civilizační choroby řadíme jak onemocnění kardiovaskulárního systému jako aterosklerózu, cévní mozkovou příhodu, infarkt myokardu či vysoký krevní tlak, tak různé formy nádorových či revmatických onemocnění, poruchy metabolismu jako cukrovku a obezitu, dále astmatická onemocnění a chronickou obstrukční plicní nemoc a také onemocnění psychická, jako depresi a demenci. A právě demence se vyskytuje stále častěji a vzniká tak akutní potřeba tuto situaci řešit.

Demence se projevují poruchami paměti, úsudku a myšlení, poruchami orientace, emotivity a společenských konvencí, vznikají často na genetickém základě a charakterizuje je omezení funkce nervových buněk způsobené degenerací či jejich předčasným zánikem, symptomy

se s postupujícím časem zhoršují a onemocnění tak představují závažný zdravotní problém s významným dopadem na společnost a ekonomiku¹.

Nejčastější formou demence je neurodegenerativní onemocnění zvané Alzheimerova choroba projevující se postupnou ztrátou paměti a poznávacích funkcí. Nejvíce postiženou je krátkodobá paměť a díky rozdílné rychlosti rozvoje onemocnění se v průběhu 5 – 15 let objevuje úplná dezorientace a neschopnost dorozumět se². Pacient se tak prakticky stává závislým na svém okolí. Postupná ztráta cholinergní transmise provázející toto onemocnění je jedním z hlavních důvodů úpadku poznávacích funkcí a na její ovlivnění je cílena léčba inhibitory cholinesteras. Inhibicí funkce enzymů štěpících acetylcholin, tj. acetylcholinesterasy a butyrylcholinesterasy, v synaptické štěrbině, můžeme příznivě ovlivnit průběh onemocnění, ne ve smyslu jeho vyléčení, ale zpomalení jeho postupu či zvýšení kvality života nemocných například posílením nervových a poznávacích funkcí.

A právě na výzkum přírodních látek použitelných v terapii této zákeřné choroby se zaměřuje katedra farmaceutické botaniky a ekologie, kde se tým pracovníků sdružený pod názvem ADINACO (Alzheimer's Disease and Natural Compounds) věnuje screeningu vybraných čeledí rostlin pro obsah látek v terapii potenciálně upotřebitelných.

Jedním z významných zdrojů isochinolinových alkaloidů jsou alkaloidy máku setého *Papaver somniferum* L., které se běžně používají v terapii. Je proto zajímavé zjistit chování těchto sloučenin vůči cholinesterasám; moje diplomová práce je příspěvkem k řešení této otázky.

2. CÍL PRÁCE

Cílem mé diplomové práce bylo:

1. Připravit vyhovující mobilní fázi pro kontrolní tenkovrstvou chromatografii směsi alkaloidů pro jednotlivé typy výtřepků extraktu ze suchých tobolek máku setého *Papaver somniferum* L. a to podle polaritý a pH obsažených látek.
2. Zpracování jednoho z výtřepků tenkovrstvou chromatografií za účelem získání minimálně jednoho z alkaloidů v čistém stavu.
3. Stanovení fyzikálně-chemických charakteristik získaného alkaloidu.
4. Účast na stanovení biologické aktivity izolovaného alkaloidu, zejména zjištění míry inhibice lidských cholinesteras.

3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Charakteristika a rozdělení demencí

Demenci je nazýváno onemocnění projevující se postupnou ztrátou paměti, intelektu a poznávacích funkcí, jehož výskyt v populaci výrazně stoupá s věkem.

Demence můžeme dělit dle příčiny vzniku na atroficko-degenerativní, ischemicko-vaskulární a symptomatické. Mezi atroficko-degenerativní demence, vznikající v důsledku sníženého počtu mozkových buněk a synapsí či ukládání patologických bílkovin, řadíme Alzheimerovu chorobu, Huntingtonovu chorobu, korovou nemoc s Lewyho tělísky, Parkinsonovu chorobu či Pickovu chorobu. Ischemicko-vaskulární demence vznikají jako důsledek nedostatečného prokrvení a následného poškození mozkové tkáně. Řadíme mezi ně Binswagnerovu chorobu, multiinfarktovou demenci či vaskulární demenci s akutním začátkem. Symptomatické demence jsou způsobeny celkovým onemocněním organismu. Řadíme mezi ně demence smíšených etiologií, například traumatické, infekční či metabolické³.

Dle stádia, ve kterém se demence nachází, je lze dále dělit na počínající a mírné deprese (relativní soběstačnost pacienta, nevyžaduje nepřetržitou péči), středně pokročilé a rozvinuté demence (soběstačnost je již omezena, schopnost komunikace je však zachována) a demence těžké (pacient vyžaduje nepřetržitou péči, není schopen komunikovat, objevují se poruchy chování)⁴.

3.2 Charakteristika Alzheimerovy choroby

Nejčastěji se vyskytující formou demence je Alzheimerova choroba, která představuje kolem 50 – 60 % všech případů. Dalších asi 10 % má původ smíšený, kdy se na vzniku onemocnění podílejí další faktory postihující mozek. Alzheimerova choroba je neurodegenerativní onemocnění projevující se syndromem demence, u kterého dochází v čase ke zhoršování příznaků. Onemocnění je jasně definováno patologickými nálezy společnými pro všechny nemocné, průběh onemocnění se však u každého pacienta liší, rozdílná je doba vzniku, rychlost postupu onemocnění, různé jsou faktory ovlivňující jeho průběh a rozvoj a rozdíl je i v genetické výbavě každého jedince⁵.

Onemocnění popsal na začátku 20. století Alois Alzheimer jako nemoc s rychlým průběhem vyskytující se od středního věku kolem padesáti let s výraznou dědičností a postihující především ženy. Od roku 1910 se pro toto onemocnění začal používat název Alzheimerova choroba (AD). Rozlišujeme její dva typy, méně častou presenilní demenci Alzheimerova typu postihující osoby ve věku pod 65 let, vyznačující se rychlým průběhem a po stránce klinické syndromem „pěti A“: afázií (porucha myšlení, chápání a nacházení slov), agrafií (porucha grafického projevu), alexií (neschopnost číst), apraxií (ztráta schopnosti vykonávat účelné pohyby vyžadující koordinaci) a agnózií (ztráta schopnosti rozpoznávání a interpretace smyslových vjemů). Druhý, častěji se vyskytující typ AD začíná ve věku nad 65 let a vyznačuje se pozvolnějším průběhem a delším trváním než forma presenilní. Ve věkovém rozmezí 65 – 69 let trpí onemocněním dle výsledků projektu EuroCoDe (European Collaboration on Dementia) asi 2 % mužů a 1,5 % žen, kdy se každých 5 let tato hodnota zhruba zdvojnásobuje. Projekt přinesl poměrně šokující fakta o výskytu AD u seniorů nad 85 let, kdy se počet nemocných v Evropě ukázal být asi o milion osob vyšší, než byly dosavadní předpoklady. Dle odhadů na základě zjištěné prevalence je v České republice přes 120 tisíc lidí s touto nemocí^{1,6}.

Kromě věku patří mezi další neovlivnitelné faktory rodinná anamnéza a dědičnost. Riziko výskytu onemocnění stoupá s výskytem AD v rodině a dále se zvyšuje s navyšujícím se počtem členů rodiny, trpících touto chorobou. Pokud se v rodině AD vyskytuje, mohou být kromě dědičnosti na vině i vnější faktory či kombinace obou⁷.

Hlavním klinickým znakem rozvíjející se demence u AD jsou kognitivní poruchy. Dle typu demence jde o pomalu či rychle se rozvíjející poruchy paměti. Zprvu se projevuje porucha vstřípivosti způsobená narušením novopaměti. Staropaměť je naopak dlouhodobě zachována. Poruchy orientace s poruchami paměti těsně souvisejí. Nejprve je narušena orientace časová a místní, jako poslední je postižena orientace osobou. Dále pozorujeme poruchy pozornosti a myšlení, které je výrazně zpomalené. Poruchy paměti bývají kompenzovány smyšlenkami. Poruchy intelektu s sebou nesou snižování soudnosti a kritičnosti, poruchy v emotivitě se projevují změnami celkového naladění. U forem expanzivních se někdy vyskytují megalomanické bludy, jindy pouze euforická nálada doprovázená planým vtipkáním.

U depresivních forem se setkáváme se sebeobviňováním, popíráním mravních hodnot a hypochondrickými bludy často absurdního charakteru. Přítomna je emoční labilita, časté změny nálad a afektované chování. Poruchy emotivity zasahují i oblast citovou, kde působí apatickou náladu a citové otupení. Může být přítomna ztráta řeči, ztuhlost či stupor, kdy pacient setrvává ve strnulých, často nepřírodných, polohách. Neklid a agresivní projevy mohou být poruchami emotivity způsobeny také, stejně jako poruchy spánku. Jak onemocnění postupuje, demence se stále prohlubuje a pacienti se stávají závislí na pomoci druhé osoby. V závěrečných fázích onemocnění pacient přestává reagovat na podněty z okolí, není schopen udržovat konverzaci a ztrácí kontrolu nad vlastními pohyby. Je odkázán na každodenní pomoc s osobní péčí včetně stravování a užívání toalety. Reflexy se stávají abnormálními, tuhne svalstvo a objevují se potíže s polykáním^{1,7}. Poslední fáze onemocnění nastává v průběhu 5 – 15 let a ke smrti zpravidla dochází v důsledku zánětlivé infekce, jakou je například bronchopneumonie².

Ač přesně nevíme, jak onemocnění vzniká, umíme ho diagnostikovat díky základním neuropatologickým a histopatologickým nálezům a moderním zobrazovacím metodám, jako magnetická rezonance či počítačová tomografie. Základními nálezy u pacientů s AD jsou:

- atrofie mozku, především frontálního, parietálního a temporálního laloku
- selektivní zánik acetylcholinergních neuronů
- tvorba β -amyloidních plaků, amyloidová angiopatie
- degenerace τ -proteinu a vznik tangles, shluků hyperfosforylovaného τ -proteinu
- zánětlivá reakce v oblasti plaků, působení volných kyslíkových radikálů, protizánětlivých působků a oxidačního stresu
- zvýšená syntéza a činnost na potenciálu neuronu závislých vápníkových kanálů^{2,5}

Za tvorbu amyloidních plaků je odpovědný protein β -amyloid, vznikající koagulací z β -peptidu, běžné součásti nervových buněk, který se při AD ve zvýšené míře ukládá v jádrech amyloidních plaků a stěnách tepének. Ve své polymerované formě tvoří jádra (drúzy), kolem kterých dochází k odumírání neuronů, vzniku gliového lemu a projevům akutní reakční fáze na vznikající sterilní zánět. Za hlavní zdroj β -amyloidu je považován tzv. amyloidový prekurzorový protein (APP), který byl zjištěn v neuronech v několika frakcích. Fyziologicky je

APP štěpen enzymem α -sekretasou na β -peptid, fragmenty o 40 aminokyselinách. β -peptid hraje v organismu důležitou roli, je solubilní a za fyziologických podmínek se podílí na neuroprotektivním působení a zajišťování neuroplasticity, schopnosti centrální nervové soustavy (CNS) se přizpůsobovat, přestavovat a reorganizovat ve své funkci na molekulární úrovni. V patologickém stavu do štěpení APP zasahuje též enzym β -sekretasa a zřejmě i γ -sekretasa, jejichž působením vznikají fragmenty delší než fyziologický β -peptid o 42 nebo 43 aminokyselinách. Toto nadměrné štěpení APP je u části pacientů podmíněno geneticky, a to buď na dlouhém raménku 21. chromozomu nebo na 1. a 14. chromozomu u pacientů s časným nástupem onemocnění a jeho výskytem v rodinné anamnéze. Tyto delší fragmenty již neplní svou fyziologickou roli a díky snížené solubilitě koagulují a polymerují v extracelulárním prostoru za vzniku patologického β -amyloidu, který je základem plaků. Toxické působení β -amyloidu pak zřejmě způsobuje další druh proteinové degenerace, degeneraci intraneuronálního τ -proteinu. Zdegenerovaný τ -protein pak tvoří párově helikální filamenta, z kterých následně vznikají neuronální klubíčka, shluky hyperfosforylovaného τ -proteinu, zvané tangles. Postižené neurony pak zanikají vlivem apoptózy – buněčné smrti^{5,10}.

Ke zvýšené koagulaci a polymeraci delších fragmentů a k celkovému rozvoji onemocnění zřejmě přispívá přítomnost genu pro apolipoprotein E, konkrétně pro jeho izoformu apolipoprotein E-e4 (ApoE-e4). Apolipoprotein E, geneticky kódovaný na chromozomu 19, je v těle přirozeně se vyskytující látkou s řadou fyziologických funkcí, např. transportem cholesterolu. Lidé vybavení izoformou ApoE-e4 po obou rodičích inklinují ke vzniku onemocnění 3 – 5 krát častěji než srovnatelná populace s jinými izoformami apolipoproteinu E. K ukládání amyloidu dochází též ve stěnách cév za vzniku amyloidové angiopatie. Vzniklým sterilním zánětem dochází k aktivaci buněk mikroglíí a astrocytů, uvolnění cytokininových působků a volných kyslíkových radikálů. Akutní reakční fáze tak způsobuje další neurodegenerativní změny, jako je zánik neuronů vlivem peroxidace jejich lipidových membrán volnými kyslíkovými radikály. Zánik neuronů způsobuje uvolnění excitačních aminokyselin, glutamátu a aspartátu, s jejich následnou vazbou na vlastní receptory v CNS. Hyperexcitací těchto ionotropních receptorů (např. NMDA receptor) dochází k nadměrnému influxu Ca^{2+} do neuronů, destabilizaci vnitřního prostředí a aktivaci proteinkinas.

To má za následek smrt neuronu a uvolnění dalších excitačních aminokyselin v rámci kaskádové reakce. Při AD též dochází k nadměrné aktivaci a zřejmě i nadměrné tvorbě vápníkových kanálů otevíraných v závislosti na potenciálu membrány neuronu. Výsledkem je pak aktivace stejné kaskády jako v případě působení excitačních aminokyselin. Další patogenetickou kaskádou, podílející se na rozvoji onemocnění, je zánik mitochondrií. Zjišťována je zvýšená aktivita sukcinyldehydrogenázy a jiných enzymů a to převážně v místech, kde později vznikají senilní plaky. U osob vyššího věku, ale zvláště pak u pacientů s AD, bývá zjišťována zvýšená hladina enzymu monoaminoxidasy B. Uvažováno je také o nedostatečné produkci nervových růstových faktorů gliovými buňkami⁵.

Zánik neuronů způsobuje snížení množství neuromediátorů a enzymů, tak důležitého acetylcholinu (ACh) či cholinacetyltransferasy (CAT), která jej syntetizuje z cholinu a acetylkoenzymu A (AcCoA). Dochází ke snížení počtu nikotinových acetylcholinergních receptorů při relativním zachování počtu acetylcholinergních receptorů muskarinových. Mezi cholinesterasami odbourávajícími ACh v synaptické štěrbině převažují acetylcholiesterasy (AChE) nad butyrylcholinesterasami (BuChE), jejichž podíl je za fyziologického stavu zcela minimální. Při AD ale dochází ke zvyšování podílu BuChE a k jejich novotvorbě v gliových lemech amyloidních plaků, zvýšené množství BuChE pak přispívá k nedostatku ACh jeho odbouráváním^{10,11,12}. V mozku nemocného též počíná převládat acetylcholinesterasa G1 nad formou G4, u zdravého jedince tvoří forma G1 pouze minoritní podíl¹³. AChE a BuChE se od sebe odlišují reakční kinetikou a to v závislosti na množství dostupného ACh. Vysoká koncentrace ACh způsobuje zvýšení aktivity BuChE, která není za nízkých koncentrací ACh prakticky aktivní. Vysoká mozková aktivita může místně způsobit vzestup koncentrace ACh na mikromolární úroveň, kdy je AChE inhibována a aktivitu přebírá BuChE. Spojitost BuChE s gliovými buňkami má zřejmě podporou hydrolýzy ACh pomáhat zachovat fyziologické cholinergní funkce. BuChE je proto nyní důležitým cílem ve farmakoterapii AD¹⁴.

3.3 Farmakoterapie Alzheimerovy choroby

Farmakoterapii AD lze dělit na dvě základní skupiny:

- kognitivní farmakoterapie
- nekognitivní farmakoterapie – léčba přidružených symptomů¹³

Využíváno je široké spektrum látek řadících se mezi léčiva i neléčiva. Tato kapitola se proto věnuje všem látkám, které mohou pozitivně působit proti vývoji demence, zejména AD.

3.3.1 Kognitivní farmakoterapie

3.3.1.1 Inhibitory acetylcholinesterasy

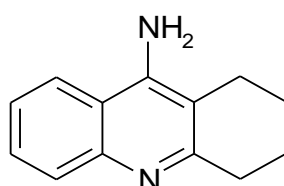
Inhibitory acetylcholinesterasy blokují nadměrné odbourávání ACh a udržují tak jeho molekuly ve stavu, kdy je schopen vazby na své receptory umístěné pre- i postsynapticky. Některé inhibitory inhibují prakticky pouze AChE, jiné významně inhibují i BuChE. Pro léčbu AD jsou využívány centrálně působící inhibitory, předpokladem pro jejich účinnost je dobrá schopnost procházet hematoencefalickou bariérou (HEB), specifická inhibice mozkových (nikoliv periferních) forem AChE a dobrá snášenlivost.

Inhibice AChE se dle reverzibility vazby dělí na reverzibilní, ireverzibilní a pseudoreverzibilní. Reverzibilní inhibitory blokují AChE po dobu jejich přítomnosti v plazmě a likvoru, po odbourání reverzibilních inhibitorů v játrech jsou AChE restaurovány a je obnovena jejich funkce. Ireverzibilní inhibice AChE způsobí vytvoření komplexu inhibitor – cholinesterasa, který je nevratný a je následně eliminován. Při pseudoreverzibilní inhibici dochází v molekulách cholinesteras ke kompetitivnímu vytěsnění ACh inhibitorem, který je jimi následně odbouráván. Účinnost je proto delší než samotná doba přítomnosti inhibitoru v plazmě a likvoru. Délka trvání inhibice a schopnost pronikat HEB je závislá na chemické struktuře inhibitoru, inhibitory obsahující v molekule kvarterní dusík mají vlastní aktivitu na nikotinových receptorech, ale na rozdíl od inhibitorů s terciárním dusíkem nepronikají do CNS^{12,13,15}.

Inhibitory acetylcholinesteras tvoří chemicky nejednotnou skupinu léčiv, jednotlivé preparáty odlišují různé mechanismy účinku a schopnost inhibovat ve zvýšené míře i BuChE.

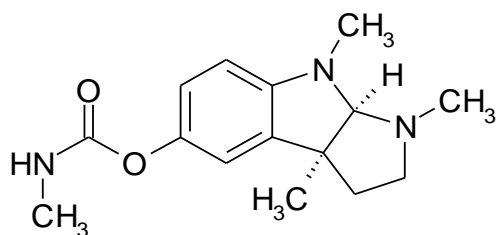
Svým působením zpomalují rozvoj AD a oddalují tak přechod demence do těžších stadií. V současné době jsou využívány přípravky několika chemických skupin¹³.

Akridinové deriváty – reverzibilní inhibitory AChE, přednostně inhibují AChE před BuChE. Mezi jejich zástupce řadíme tetrahydroaminoakridin – takrin, který byl z trhu stažen pro hepatotoxické účinky, dále velnakrin, suronakrin a 7-metoxytakrin, jehož vývoj byl z finančních důvodů pozastaven i přes slibné výsledky¹³.

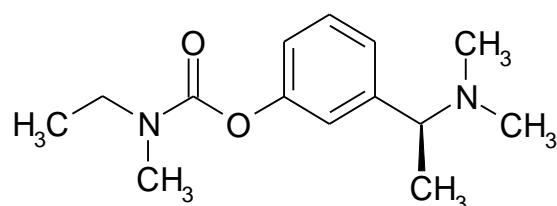


takrin

Karbamátové deriváty – pseudoreverzibilní inhibitory AChE i BuChE. Řadíme mezi ně fysostigmin, látku experimentálního významu s krátkým poločasem a řadou vedlejších účinků. Rivastigmin (Exelon[®]) je u nás i ve světě hojně používaným pseudoreverzibilním inhibitorem cholinesteras, kromě mozkových AChE účinně inhibuje i BuChE, což má za následek vyšší výskyt gastrointestinálních potíží přechodného charakteru. Jinak má minimum lékových interakcí. Proniká do CNS, kde zvyšuje koncentraci ACh, čímž zlepšuje kognitivní funkce, neexistují však důkazy o příznivém vlivu na průběh AD. Dávkování se musí titrovat, léčivo je dostupné pro perorální i transdermální podání. Výhodou transdermálního podání je minimalizace nežádoucích gastrointestinálních efektů. Rivastigmin příznivě ovlivňuje psychotické příznaky vyskytující se především u korové nemoci s Lewyho tělísky, používá se i v terapii parkinsonických demencí. Eptastigmin je v procesu klinického zkoušení a řadí se mezi perspektivní látky^{13,16,17}.

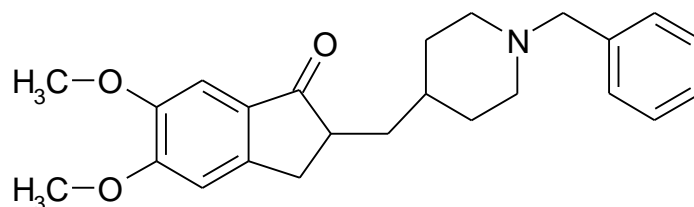


fysostigmin



rivastigmin

Piperidinové deriváty – reverzibilní inhibitory ovlivňující především AChE. Donepezil (Aricept[®], Calofra[®], Donepezil-Teva[®], Yasnal[®] a další) je ve světě nejpoužívanějším centrálním inhibitorem acetylcholinesteras, proniká do CNS a zvýšením koncentrace ACh příznivě ovlivňuje kognitivní funkce, bez zjevného vlivu na vlastní průběh AD. Inhibice AChE vyvolaná donepezilem je jistou měrou tkáňově specifická, ve srovnání s CNS dochází k slabší inhibici AChE v hladkém a příčně pruhovaném svalstvu a v myokardu. Účinek se obvykle objevuje během 12 týdnů od počátku terapie, indikován je pro léčbu mírné až středně těžké AD. Přestože je odbouráván játry přes enzymatický systém P450, má málo lékových interakcí, nepůsobí hepatotoxicky a je všeobecně dobře snášen. Poločas více než 70 hodin umožňuje jeho podávání jednou denně. Icopezil je v procesu klinického zkoušení a vykazuje ještě vyšší specifitu pro molekuly AChE^{12,13,16}.

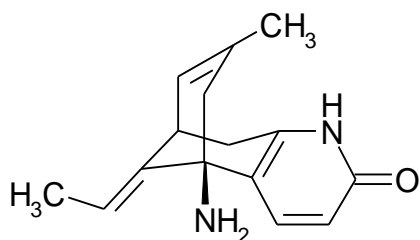


donepezil

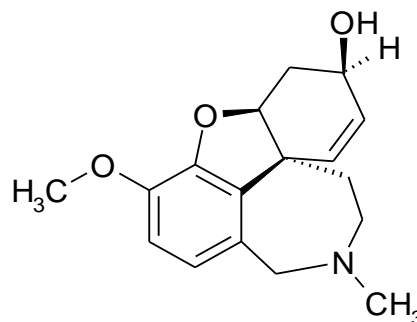
Alkaloidy – Huperzin A je seskviterpenový alkaloid získaný z vrance pilovitého *Huperzia serrata*. Jedná se o silný reverzibilní inhibitor s vysokou selektivitou, rychlým vstupem přes HEB, vysokou biologickou dostupností po perorálním podání, dlouhým inhibičním účinkem na AChE a minimálními účinky na periferním cholinergním systému. Účinky huperzinu A souvisí s jeho schopností snižovat oxidační stres, s regulací exprese apoptických působků, nervového růstového faktoru a jeho receptoru a se zásahem do metabolismu APP^{18,19}. Je dále schopen reverzibilně inhibovat N-methyl-D-aspartátové (NMDA) receptory a přispívat tak k neuroprotektivním účinkům. Na základě chemické struktury huperzinu A bylo připraveno několik derivátů s vyšší selektivitou vůči AChE^{20,21}.

Galanthamin (Reminyl[®], Galantamin-Teva[®] a další) je terciární alkaloid izolovaný ze sněženky *Galanthus woronowii*. Vyskytuje se i u ostatních druhů rodu *Galanthus* a u dalších zástupců čeledi Amaryllidaceae. Jedná se o inhibitor AChE benzazepinové struktury se schopností alostericky modulovat nikotinové receptory, což má za následek zvýšené uvolňování ACh.

Proniká do CNS, kde zvyšuje hladinu ACh, zlepšuje kognitivní funkce, ale není dokázán příznivý vliv na rozvoj AD. Biotransformace probíhá v játrech na tři účinné metabolity, biologický poločas je kolem 7 hodin, předepsaná denní dávka galanthaminu se dělí do dvou dílčích, užívá se ráno a večer^{16,19,22}.

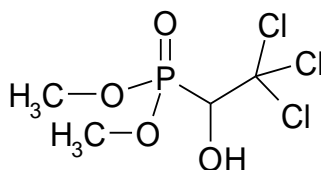


huperzin A



galanthamin

Organofosfáty – Metrifonat, piperidinový ireverzibilní inhibitor AChE, byl pro velké množství nežádoucích účinků stažen z trhu¹³.



metrifonat

3.3.1.2 Agonisté muskarinových a nikotinových receptorů

Nikotin jako agonista nikotinových receptorů účinkuje neuroprotektivně, má však řadu nežádoucích účinků, především na kardiovaskulární systém, plynoucích z neselektivní aktivace centrálních i periferních nikotinových acetylcholinergních receptorů²³.

Xanomelin je muskarinový agonista, jako nadějnější se však jeví podávání agonistů nikotinových receptorů se selektivním účinkem vůči některým jejich typům⁵.

Epibatidin je v současnosti podrobován výzkumu²³.

3.3.1.3 Prekurzory tvorby acetylcholinu

Jedná se především o sójový lecitin, který pomalu uvolňuje cholin k syntéze ACh, ale neprochází dostatečně HEB. Lepších výsledků je dosahováno za použití cholin-alfosceratu. Ostatní způsoby, jako ovlivnění cholinergního systému pomocí částečné inhibice GABAergního systému či přímá stimulace muskarinových a nikotinových receptorů jsou zatím ve fázi preklinického či klinického zkoušení^{5,12,15}.

3.3.1.4 Nootropika a další látky

Nadměrná tvorba a nedostatečné odbourávání volných kyslíkových radikálů u demencí a poruchy kognitivních funkcí byly důvodem zavedení nootropik, látek zlepšujících kvantitativní i kvalitativní poruchy vědomí, poruchy paměti a narušené schopnosti učení. V širším slova smyslu jsou do skupiny nootropik řazeny látky, které mají schopnost působit preventivně či přímo bránit rozvoji patologických změn tvořících neurobiologický podklad narušení kognitivních funkcí. Z pohledu klinické praxe jsou nejdůležitějšími zástupci nootropik léčiva s prokázaným účinkem u AD. Mechanismy účinku nootropik jsou komplexní a dosud ne zcela objasněné. Výsledkem jejich působení je efektivnější využívání energie neurony nebo zlepšení průtoku krve mozkiem. Využití energie neurony lze zlepšit ovlivněním metabolismu glukózy, mitochondriálních funkcí, využití kyslíku neuronem či uvolňování a syntézy neurotransmiterů. Zlepšení průtoku krve mozkiem lze dosáhnout inhibicí fosfodiesteras s následným zvýšením koncentrací cyklických nukleotidů, inhibicí aktivace trombocytů či jejich stabilizací či zvýšením deformability erytrocytů. Účinek se dostavuje při dlouhodobém užívání, jednoznačný prospěch nootropik v léčbě AD zatím ale nebyl prokázán^{12,16}.

Piracetam je prospěšný zvláště v počátcích AD. Kromě pozitivního působení na využití energie neuronem, zvýšením tvorby adenosintrifosfátu (ATP), zlepšuje reologické vlastnosti krve, stabilizuje trombocyty, snižuje adhezivitu erytrocytů a zvyšuje cholinergní transmissi a uvolňování dopaminu. Používá se hlavně jako doplněk terapie inhibitory AChE^{12,24,25}.

Pyritinol, derivát pyridoxinu, zvyšuje cholinergní transmissi, zlepšuje reologické vlastnosti krve a zlepšuje utilizaci glukózy v CNS. Klinické zkoušky dokazují vyšší prospěšnost pyritinolu

oproti placebo na zlepšení kognitivních funkcí u pacientů s mírnou až středně těžkou demencí různé etiologie^{12,16,26}.

Ginkgo bilobae extractum, standardizovaný extrakt z listů jinanu dvoulaločného, je komplex látek s vazodilatačními a antioxidačními účinky. Působí proti volným kyslíkovým radikálům a inhibuje ionotropní receptory typu NMDA. Používá se jako doplňková léčba inhibitory AChE a memantinem^{5,12,16}.

Nicergolin slabě ovlivňuje i acetylcholinergní systém a přispívá k mikrocirkulaci krve v mozku, proto se hodí jako doplňková léčba k inhibitorům AChE a memantinu. Jedná se o semisyntetický derivát námelových alkaloidů, který působí antagonisticky na adrenergických α_1 -receptorech (vazodilatační účinek), inhibuje aktivaci trombocytů, inhibuje fosfodiesterasu typu 1 a zlepšuje utilizaci glukózy. Přestože se jedná o derivát námelových alkaloidů, vykazuje daleko lepší snášenlivost než jiné deriváty, například ergotamin či ergotoxin^{13,16,27}.

3.3.1.5 Scavengery volných kyslíkových radikálů

Při AD dochází k nadměrnému uvolňování kyslíkových radikálů a tyto reaktivní formy kyslíku poškozují některé z enzymů a způsobují lipoperoxidaci neuronálních membrán, což vede k zániku neuronů urychlením apoptózy. Scavengery (vychytávače) působí různými mechanismy na snížení množství volných kyslíkových radikálů, studii nebyl prokázán příznivý efekt na rozvoj AD, ale uvažuje se o preventivním působení těchto látek.

Vitamin E, retinol či β -karoten při dlouhodobém podávání vykazují preventivní efekt.

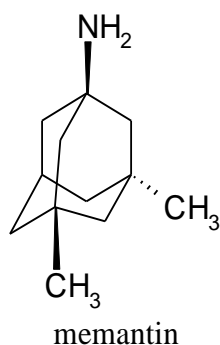
Selen je důležitý jako součást koenzymu přirozeného antioxidačního enzymu glutathionperoxidasy¹².

3.3.1.6 Parciální inhibitory NMDA receptorů

Při AD dochází k nadměrnému uvolňování excitačních aminokyselin glutamátu a aspartátu, jejich působení na NMDA receptory způsobuje otevření iontových kanálů a nadměrný vstup Ca^{2+} do neuronu. Tím způsobená změna vnitřního prostředí pak způsobí neuronální smrt. Narušena je tím dlouhodobá potenciace, jeden ze základních mechanismů učení, která probíhá právě na NMDA

receptorech. Proto se v terapii AD využívá látek inhibujících NMDA receptory. U nás je prozatím používán jediný zástupce, memantin (Ebixa[®]), nekompetitivní antagonist NMDA receptorů.

Snižuje uvolňování glutamátu blokadou NMDA receptorů a navozuje rovnováhu porušené excitačně inhibiční aktivity v CNS. Používán je pro léčbu středně těžké až těžké demence, v monoterapii či kombinaci s inhibitory AChE. Byl prokázán příznivý vliv kombinace memantinu a donepezilu na kognitivní funkce^{12,28,29}.



3.3.1.7 Centrálně působící antiflogistika

V místech amyloidních plaků dochází z důvodů aktivace neurogliových elementů ke sterilnímu zánětu. Gliové buňky uvolňují reaktivní kyslíkové radikály a cytokiny a je aktivován zánětlivý enzym cyklooxygenasa 2 (COX-2). Z důvodů potlačení zánětlivé reakce jsou v současnosti klinicky testována nesteroidní antiflogistika dobře procházející HEB, zejména inhibitory COX-2.

Zkoumány jsou i účinky kyseliny acetylsalicylové, ibuprofenu či nimesulidu, v terapii AD však nejsou tato léčiva zatím používána^{10,30}.

3.3.1.8 Nervové růstové hormony

Při AD se projevuje nedostatek nervových růstových hormonů, látek důležitých pro neuronální plasticitu a reparační činnosti. K podpoře syntézy růstových hormonů je využíván přípravek Cerebrolysin, hydrolyzát vepřových mozků, obsahující krátké peptidy a aminokyseliny^{13,31}.

V současnosti se výzkum zaměřuje na vývoj přípravků působících uvolnění endogenních růstových hormonů ovlivněním tyrosinkinasových receptorů³².

Selegilin *in vitro* způsobuje uvolnění růstových faktorů nebo jako růstový faktor sám působí, *in vivo* však tento efekt nebyl prokázán¹³.

3.3.2 Nekognitivní farmakoterapie

Nekognitivní farmakoterapie se soustředí na léčbu symptomů spojených s onemocněním AD, jde o poruchy spánku, emotivity, chování, depresivní poruchy či stavy úzkosti a neklidu. Pro léčbu poruch spánku jsou lékem volby nebenzodiazepinová hypnotika, například zolpidem. Pro léčbu poruch chování a přidružených delirií využíváme látek ze skupiny neuroleptik. Převažující psychotické příznaky léčíme antipsychotiky 2. generace, risperidonem, quetiapinem a dalšími.

Vzhledem k věku pacientů s AD je třeba podávat nižší dávky než u mladých osob kvůli vyššímu riziku vzniku cévní mozkové příhody. V případě převahy přidružených delirií a stavů neklidu nebo poruch spánku používáme antipsychotika s malým antipsychotickým efektem, avšak dobře působící na výše zmíněné příznaky a dobře snášená. Zástupci jsou butyrofenonové incizivní neuroleptikum melperon (Buronil[®]), selektivní antagonist na dopaminových receptorech tiaprid (Tiapra[®], Tiapridal[®]) a inhibitor zpětného vychytávání serotoninu a serotoninový antagonist trazodon (Trittico AC[®]). Antidepresiva 1. a 2. generace mající anticholinergní účinky a ovlivňující jiné neuromediátorové systémy, než serotonergní a dopaminergní, nejsou v nekognitivní farmakoterapii využívána. Využívána jsou především antidepresiva 3. generace – inhibitory zpětného vychytávání serotoninu (escitalopram, citalopram, paroxetin, fluoxetin, fluvoxamin, sertralin) a 4. generace – inhibitory zpětného vychytávání serotoninu i noradrenalinu (venlafaxin) a další antidepresiva 4. generace (mirtazapin). V praxi je používán též reverzibilní inhibitor monoaminoxidasy A moklobemid^{7,12,16}.

3.3.3 Nové způsoby farmakoterapie

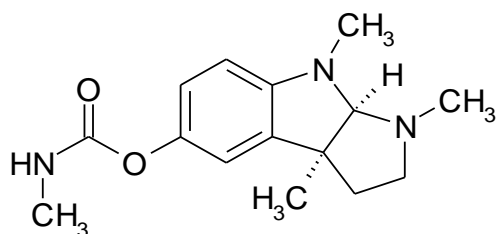
Vzhledem k etiopatogenezi AD je hledán způsob, jak zamezit ukládání β -amyloidu a tvorbě senilních plaků. Ve výzkumu je anti-amyloidní terapie, brzdící jak tvorbu β -peptidu (vznikajícího z APP), tak shlukování a polymeraci těchto peptidů a vzniku amyloidního plaku. Probíhá klinické ověřování inhibitorů β - i γ -sekretas, látky bránící vzniku toxických oligomerů, klinickým

zkoušením prochází i vakcinace β -amyloidem a podávání monoklonálních protilátek proti β -amyloidu. Jiný postup se zaměřuje na blokování degenerace τ -proteinu^{10,12}.

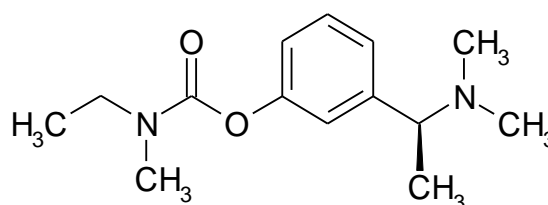
3.3.4 Alkaloidy a jejich deriváty použitelné pro léčbu a prevenci demencí

3.3.4.1 Inhibitory acetylcholinesterasy

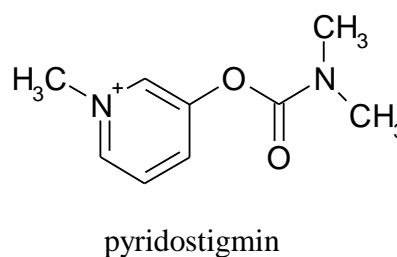
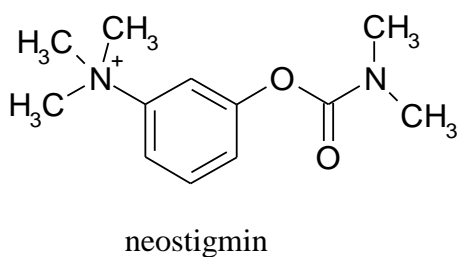
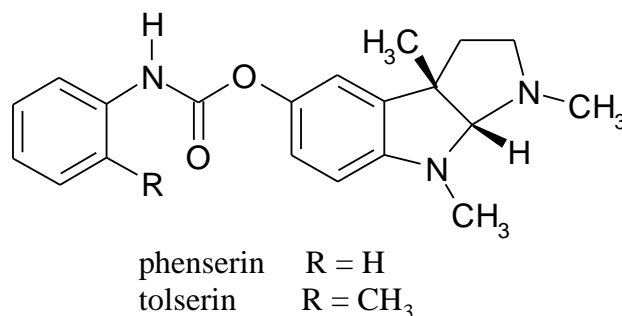
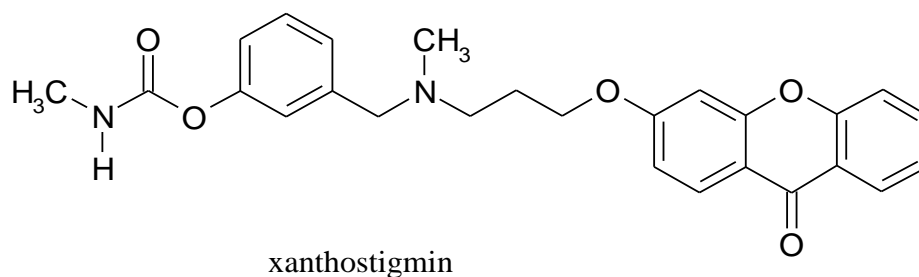
Fysostigmin, alkaloid získaný z *Physostigma venenosum* Balf. (Fabaceae), je krátce působící reverzibilní inhibitor AChE. Zlepšuje kognitivní funkce u pacientů s AD i u zdravých jedinců, má však řadu nežádoucích účinků (nauzea, zvracení, bolesti hlavy). Za účelem zlepšení farmakokinetiky a účinnosti byly připraveny mnohé deriváty, z nichž je terapeuticky nejpoužívanějším rivastigmin (Exelon[®]), reverzibilní inhibitor AChE karbamátového typu, používaný pro léčbu lehké a středně těžké demence u nemocných AD nebo Parkinsonovou chorobou. Vzniklo mnoho pokusů připravit inhibitory AChE na strukturálním základu fysostigminu s farmakokinetikou a účinností rivastigminu, některé z těchto selektivních inhibitorů byly upraveny pro léčbu kognitivních i depresivních symptomů AD najednou. Některá analoga karbamátového derivátu xanthostigminu inhibují acetylcholinesterasou vyvolané shlukování β -amyloidu, fenyلكarbamátový derivát fysostigminu, fenserin, inhibuje současně AChE i APP. Metylací do polohy C-2' fenserinu byl připraven tolserin, derivát s vylepšenou selektivitou pro AChE ve srovnání s BuChE. Mezi další užívané deriváty fysostigminu řadíme neostigmin (Syntostigmin[®]) a pyridostigmin (Mestinon[®])^{33,34,35}.



fysostigmin

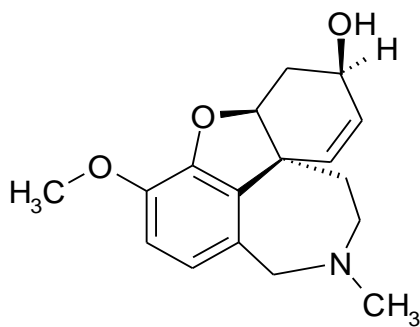


rivastigmin

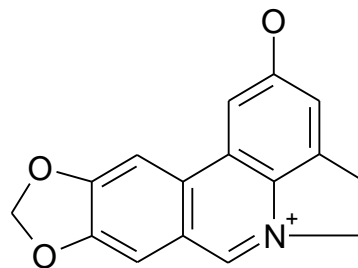


Galanthamin, alkaloid získaný z *Galanthus woronowii*, některých druhů rodu *Narcissus* a dalších zástupců čeledi Amaryllidaceae, je určený k léčbě mírné a středně těžké demence. Jedná se o inhibitor AChE se schopností alosterické modulace nikotinových receptorů mající za následek zvýšené uvolňování ACh. Na jeho základě byla připravena řada derivátů, z nichž několik vykazovalo vyšší inhibiční aktivitu vůči AChE a lepší snášenlivost než galanthamin. AChE inhibují i další alkaloidy čeledi Amaryllidaceae^{19,22,33}.

Ungeremin, izolovaný z *Nerine bowdenii* a druhů rodu *Galanthus* a *Narcissus* vykazuje vyšší inhibiční aktivitu vůči AChE než samotný galanthamin³³.

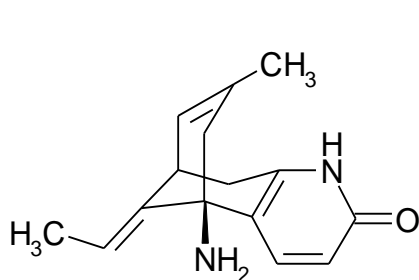


galanthamin

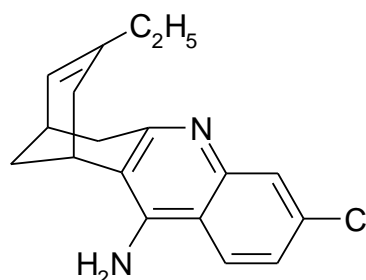


ungeremin

Huperzia serrata (Lycopodiaceae) je zdrojem reversibilního inhibitoru AChE huperzinu A, který v klinických zkouškách prokázal zlepšení kognitivních funkcí u starších pacientů s AD a demencí vaskulárního původu. Huperzin A působí neuroprotektivně, chrání neurony před peroxidací, ukládáním β -amyloidu, působením glutamátu a ischemií způsobenou cytotoxicitou a apoptózou. Je schopen regulovat nervový růstový faktor, ovlivňovat APP a reverzibilně inhibovat NMDA receptory. Huperzin A je silnější inhibitor AChE než huperzin B, vykazuje též vyšší specifitu k AChE. Za účelem optimalizace terapeutického potenciálu huperzinu A byla připravena řada derivátů (huprin X, huprin Y, huprin Z) za použití takrinu a huperzinu A jako strukturálních předloh. Huprin X má vyšší afinitu k AChE než huperzin A, takrin a donepezil^{33,34}.



huperzin A



huprin X

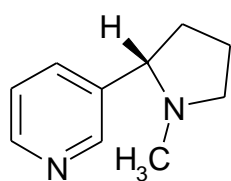
3.3.4.2 Inhibitory β -sekretas

I přes značné množství syntetických alkaloidů schopných inhibovat β -sekretasu lze nalézt několik přirozeně se vyskytujících alkaloidů s touto aktivitou. Zkoumání mořských hub řadících se do čeledi Thorectidae, zvláště pak rodu *Smenospongia*, produkujících indolové alkaloidy, vedlo k objevu diktazolu A, alkaloidu slabě inhibujícího β -sekretasu. Mořská houba *Ianthella basta* (Lanthellidae) obsahuje bastadin 9, alkaloid redukující syntézu APP inhibicí β -sekretasy. Tato látka je součástí rozsáhlejší skupiny metabolitů s řadou biologických účinků³³.

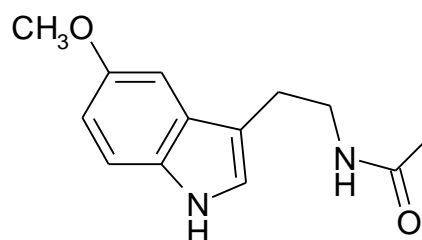
3.3.4.3 Alkaloidy inhibující agregaci β -amyloidu

Nikotin, produkovaný některými zástupci čeledi Solanaceae, *in vitro* ovlivňuje β -amyloidní plaky inhibicí jejich vzniku polymerací, nedokáže však depolymerovat β -amyloidní plak již vzniklý. *In vivo* studie navíc ukazují jako nežádoucí účinek zvýšenou fosforylaci a agregaci τ -proteinu.

Melatonin, produkovaný mnohými organismy, je druhým zástupcem alkaloidů bránících agregaci β -amyloidu. Přerušuje vodíkové vazby mezi aminokyselinami histidinem a asparaginem v molekule β -amyloidu a způsobuje tak vznik náhodných prostorových konformací, které nelze dále upotřebit jako stavební kameny β -amyloidního plaku. Melatonin efektivně prostupuje HEB³³.



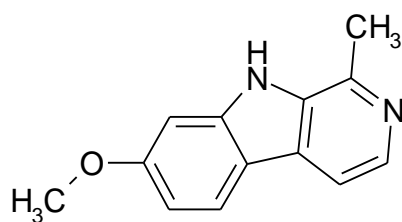
nikotin



melatonin

3.3.4.4 Alkaloidy inhibující fosforylaci τ -proteinu

V semenech rostliny *Peganum nigellastrum* (Zygophyllaceae) se nachází řada β -karbolinový alkaloidů, z nichž harmin, harmalin, harmol a harman vykazují stejnou inhibiční aktivitu vůči AChE jako galanthamin. Harmin a další β -karbolinové alkaloidy též dokáží inhibovat kinasu zodpovědnou za fosforylaci τ -proteinu a příznivě tak ovlivňovat patologické projevy AD^{33,36}.



harmin

3.4 *Papaver somniferum* L. – mák setý



Obr. 1 *Papaver somniferum* L. (Papaveraceae)³⁷

3.4.1 Synonyma

Papaver amplexicaule STOKES, *Papaver nigrum* CRANTZ, *Papaver officinale* GMD, *Papaver opiiferum* FORSK³⁸.

3.4.2 Systematické zařazení

Říše:	Plantae
Oddělení:	Magnoliophyta
Třída:	Magnoliopsida
Řád:	Papaverales
Čeleď:	Papaveraceae (mákovité)
Rod:	<i>Papaver</i>
Druh:	<i>Papaver somniferum</i> L. (mák setý) ³⁹

3.4.3 Botanický popis

Květní vzorec: $\checkmark \oplus K_2 C_2 + 2 A^\infty \underline{G^\infty}$

Mák setý je jednoletá bylina s jednoduchým kořenem a modravě zelenou, lysou, válcovitou, až 150 cm vysokou vzpřímenou lodyhou. Mák setý obsahuje mléčnice a po poranění roní bílý latex. Listy jsou postaveny střídavě, jsou podlouhlého až vejčitého tvaru, většinou řapíkaté. Oboupohlavní květy, dosahující až 10 cm v průměru, jsou před rozkvětem převislé, potom přímé. Korunní plátky jsou čtyřčetné, různě zbarvené (v závislosti na odrůdě), na okrajích zvlňené, kalich je dvoulistý, opadavý. Kvete v průběhu měsíců června až srpna. Plodem je tobolka, dozrávající od července do září, různého tvaru, v době zralosti se otevírá malými otvory mezi paprsky blizny či zůstává uzavřená. Semena mají silně vyvinutý endosperm bohatý na olej a bílkoviny, v závislosti na odrůdě jsou modro-šedé, ale i bílé, černé, hnědé či žluté barvy^{38,39,40}.

3.4.4 Rozšíření a ekologie

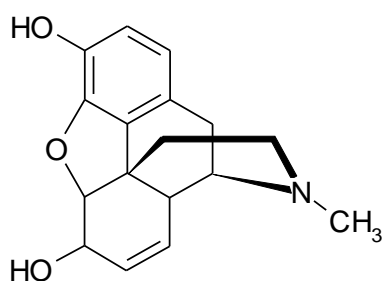
Mák setý lze nalézt jako planou rostlinu v celém Středomoří a oblasti Malé Asie, ve světě se pěstuje v mnoha státech. Největšími pěstiteli máku setého jsou Indie, Makedonie, Pákistán, Turecko a oblast „Zlatého trojúhelníku“ (Barma, Thajsko, Laos), známá nelegální produkcí opia určeného pro výrobu heroinu. Další pěstitelskou lokalitou je oblast „Zlatého pŕlměsíce“

rozkládající se na území Afghánistánu, Íránu a Pákistánu. V České republice se pěstuje na polích (oseťá plocha 30 – 40 tisíc hektarů), ojedinele zplaňuje.

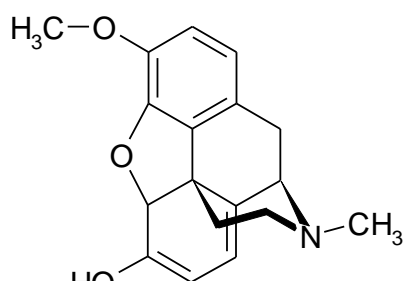
Mák setý vyžaduje propustnou půdu bohatou na živiny, zejména dusíkaté látky. Nesnáší suché sprašovitě půdy, je citlivý na změny povětrnostních vlivů i na odchylky ve výživě a půdních vlastnostech^{38,41}.

3.4.5 Obsahové látky

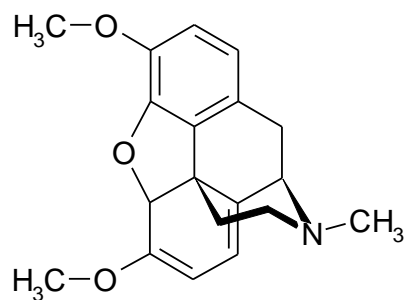
V máku setém lze nalézt rozmanitou směs alkaloidů, ze zástupců alkaloidů fenanthrenového (morfinanového) typu jde o hydrokodein, kodein, morfin, pseudomorfin, thebain; z alkaloidů benzylisochinolinových kodamin, laudanidin, laudanin, laudanosin, paladin, papaveraldin, papaverin; z alkaloidů ftalylisochinolinových gnoskopin, narcein, narkotolin, noskapin, oxynarkotin; z alkaloidů tetrahydroisochinolinových hydrokotarnin; z alkaloidů protopinových kryptopin, protopin; z alkaloidů protoberberinových skoulerin, somniferin; z alkaloidů aporfinových glaudin, isoboldin, korytuberin, magnoflorin, papaverrubin. U lanthopinu a papaveraminu není struktura doposud známa. Květy obsahují kvercetin-3-gentiobiosid a kvercetin-3-glukosid, korunní lístky obsahují mimo jiných alkaloidy neznámého jména $C_{17}H_{19}NO$ a $C_{18}H_{21}NO_3H_2O$. Kořeny obsahují 0,1 až 0,4 % alkaloidů, lodyha 0,1 až 1,0 %, semena 0,005 až 0,04 %. Koncentrace alkaloidů se v různých částech rostliny liší, kolísá i v závislosti na počasí a denní době³⁸.



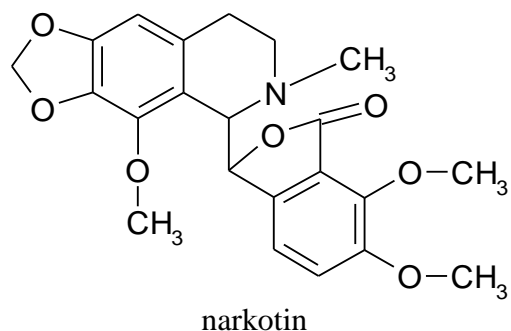
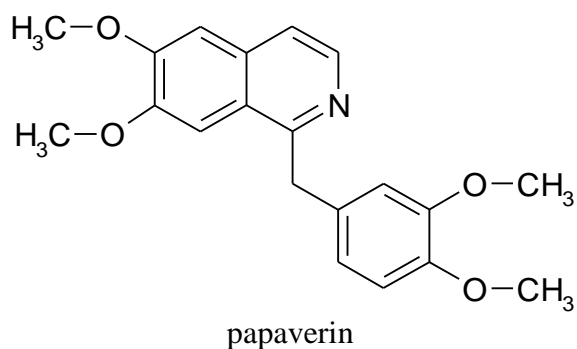
morfin



kodein



thebain



Opium crudum – surové opium

Jedná se o zaschlý bílý latex z naříznutých nezralých plodů máku setého charakteristické vůně a hořké chuti, při vysychání tvrdne a stává se křehkým. Alkaloidy se v latexu nachází ve formě fumarátů, laktátů, mekonátů či sulfátů, tvoří asi 20 – 25 % hmotnosti opia. Přítomno je asi 20 alkaloidů, další vznikají chemickými reakcemi při vysychání latexu. Zastoupen je nejvíce morfin (15 %), dále narkotin (6 %), kodein (2 %), papaverin (2 %), thebain (2 %) a další. Obsah alkaloidů v opiu ovlivňuje použitá odrůda, povětrnostní vlivy či termín sklizně. K velkým ztrátám dochází při vymývání alkaloidních látek deštěm. Nejvhodnější doba pro zisk opia je v ranních hodinách 8 – 10 den po opadu korunních lístků. Průměrný výnos z hektaru se pohybuje mezi 3 – 7 kilogramy, celosvětová legální roční produkce se odhaduje na 2000 tun.

Z nealkaloidních látek v opiu nalézáme gumy, vosky, pryskyřice, tuky, bílkoviny, organické kyseliny, mekonin, mekonosin a další. Obsah vody se pohybuje mezi 5 – 20 %³⁸.

Papaveris fructus immaturus – nezralý plod máku setého

Sběr nezralých plodů probíhá po opadu korunních lístků, před sušením jsou plody rozděleny na dvě části. Obsah morfinu se pohybuje mezi 0,12 až 0,89 %, maximální koncentrace dosahuje 10. – 12. den před dozráním. Obsah dalších alkaloidů se pohybuje mezi 0,035 až 0,23 %. Byla zaznamenána závislost mezi tvarem a barvou tobolky a obsahem morfinu. Na morfin nejbohatší jsou tobolky kulovitěho tvaru, barvy modré a fialové, naopak v tobolkách podlouhlých, bílých, je obsah morfinu nižší³⁸.

Papaveris fructus sine semine – makovina

Drogou jsou zralé, vysušené, semen zbavené makovice. Makovina je vykupována a využívána pro získání alkaloidů pro farmaceutické účely. Průměrný obsah morfinu je 0,89 %, kodeinu 0,12 % a thebainu 0,06 %. Zpracování makoviny je rentabilní při obsahu morfinu 0,3 % a vyšší^{38,42,43}.

Papaveris semen – semena máku setého

Drogou jsou bílá zralá semena, semena jiných barev nejsou vhodná pro farmaceutické použití. Bílá semena obsahují 50 – 55 % olejů, kyselinu linolovou, olejovou, palmitovou a stearovou. Obsah bílkovin je asi 27 %, semena obsahují volné aminokyseliny. Dalšími obsahovými látkami jsou ceramidy, cerebrosidy, fosfatidylcholin, cholin a steroly. Alkaloidů je přítomno nepatrné množství, cca. 0,009 %, zastoupen je kodein, morfin, narkotin, papaverin a další³⁸.

3.4.6 Farmakologické účinky obsažených alkaloidů

Z celé řady alkaloidů získaných z máku setého jich jen pár nachází uplatnění v praxi. Jedná se o alkaloidy v opiu či makovině procentuálně nejvíce zastoupené, kodein, morfin, narkotin, papaverin a thebain. Alkaloidy zastoupené v menšině prozatím nemají praktické využití, jejich farmakologický potenciál je však znám.

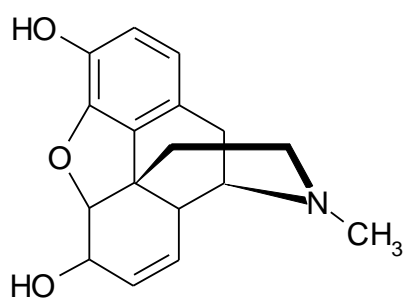
Z historického hlediska bylo k léčebným účelům nejdříve používáno samotné opium, obsahové látky však nebyly známy. Opium se využívalo kvůli schopnosti uvolňovat spasmus a zpomalovat peristaltiku k léčbě střevních kolik a úporných průjmů. Dnes surové opium slouží jako výchozí surovina pro přípravu galenik, nelze jej samostatně vydat. V lékopise lze nalézt články opium práškové standardizované, opiový extrakt suchý standardizovaný a opiová tinktura standardizovaná. Účinky opia určuje především alkaloid zastoupený v největším množství - morfin. Ostatní obsažené alkaloidy pak působí synergicky či antagonisticky^{44,45,46}.

3.4.6.1 Morfin

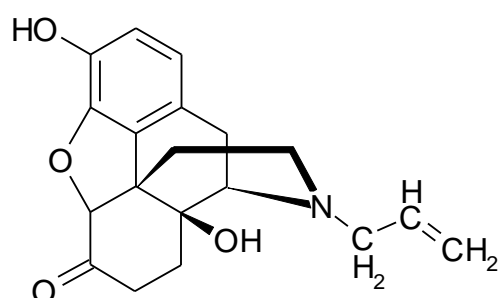
Účinky morfinu, stejně jako jiných opiátů, zprostředkovávají tři základní typy opioidních receptorů, vyskytujících se v CNS i na periférii, např. ve střevě. Jedná se o receptory μ , δ a κ . Hlavní účinek morfinu je analgetický, jeho využití jako analgetika – anodyna je nezastupitelné při nesnesitelných bolestech nereagujících na jiná léčiva, jako bolesti spojené s těžkými úrazy či nádorovým bujením.

Morfin je agonista na všech třech typech opioidních receptorů, mimo účinku analgetického má účinky centrálně tlumivé a antitusické. Terapeutické dávky morfinu vyvolávají sedaci, u některých jedinců však mohou vyvolávat euforii. Působí útlum respiračního centra i centra pro kašel, zvyšuje tonus hladké svaloviny a zpomaluje peristaltiku. Nežádoucím účinkem je pak zácpa a následné bolesti, může docházet k retenci moče zvýšením tonu sfinkterů močového měchýře. Při dávkách toxických jsou nežádoucí účinky vystupňovány, při opakovaném užívání vzniká tolerance a návyk. Abstinenci příznaky se kromě chorobné touhy projevují neklidem, podrážděním, depresí, objevují se průjmy, zvracení a pocení. Jako antidota je využíváno naloxonu, kompetitivního antagonisty opioidních receptorů^{16,38,47}.

Na základě struktury morfinu byla připravena řada semisyntetických i plně syntetických derivátů, žádná z obměn však nevedla k odstranění vzniku tolerance a návyku. Tyto deriváty jsou v současnosti využívány více než samotný morfin^{44,48}.



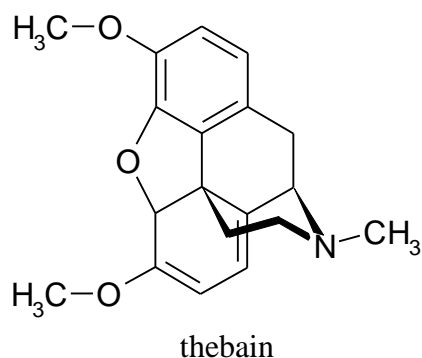
morfin



naloxon

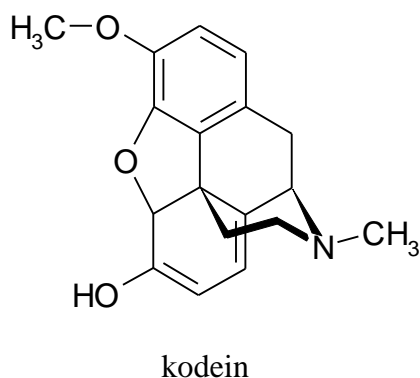
3.4.6.2 Thebain

Nemá tlumivé účinky na CNS, jeho analgetická aktivita je minimální. Způsobuje vznik tetanických křečí, proto není sám o sobě využíván. Slouží jako prekurzor pro přípravu morfinu, kodeinu, oxykodonu či naloxonu^{46,49}.



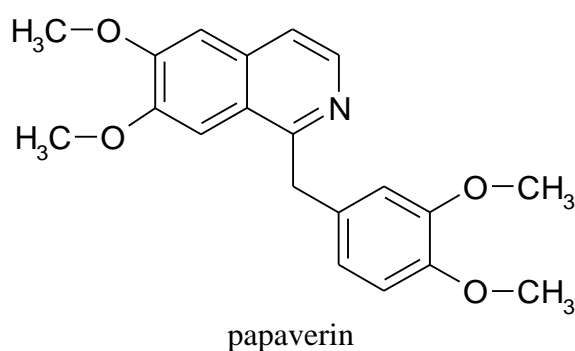
3.4.6.3 Kodein

Analgetické účinky kodeinu jsou proti morfinu výrazně slabší, afinita k opioidním receptorům je nízká a jeho účinky v organismu jsou vyvolány především jeho demethylací na morfin. Hlavním účinkem je schopnost tlumit respirační centrum a centrum kašle, využívá se proto jako antitusikum. Ač jsou jeho analgetické účinky slabší než u morfinu, účinnost běžných analgetik zvyšuje. Jako analgetikum se používá v kombinaci s kyselinou acetylsalicylovou (Alnagon[®]) či paracetamolem (Korylan[®]). I u něj pozorujeme vznik tolerance a návyku. Jako morfin může vyvolat zácpu, účinky jsou ale mnohem slabší^{16,44}.



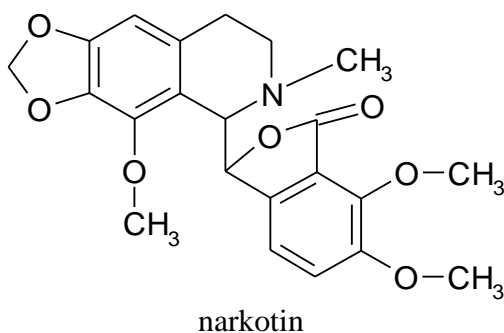
3.4.6.4 Papaverin

Papaverin je zcela odlišný od ostatních alkaloidů, není analgeticky účinný, netlumí dech ani kašel a nevyvolává zácpu. Při dlouhodobém či opakovaném užití nevzniká návyk. Indikace pro užití papaverinu jsou spasmy cév a spasmy ledvin, střev či žlučníku. Ve hladkých svalech vyvolává relaxaci nezávisle na inervaci. Vzniklá systémová vasodilatace přispívá ke snížení krevního tlaku. Spolu s dalšími isochinolinovými alkaloidy působí jako reverzibilní inhibitor AChE. Vzhledem k nerovnoměrnému vstřebávání po perorálním podání se dává přednost parenterálnímu či rektálnímu užití. Syntéza je jednoduchá, proto se v současnosti vyrábí synteticky^{16,44,50}.



3.4.6.5 Narkotin

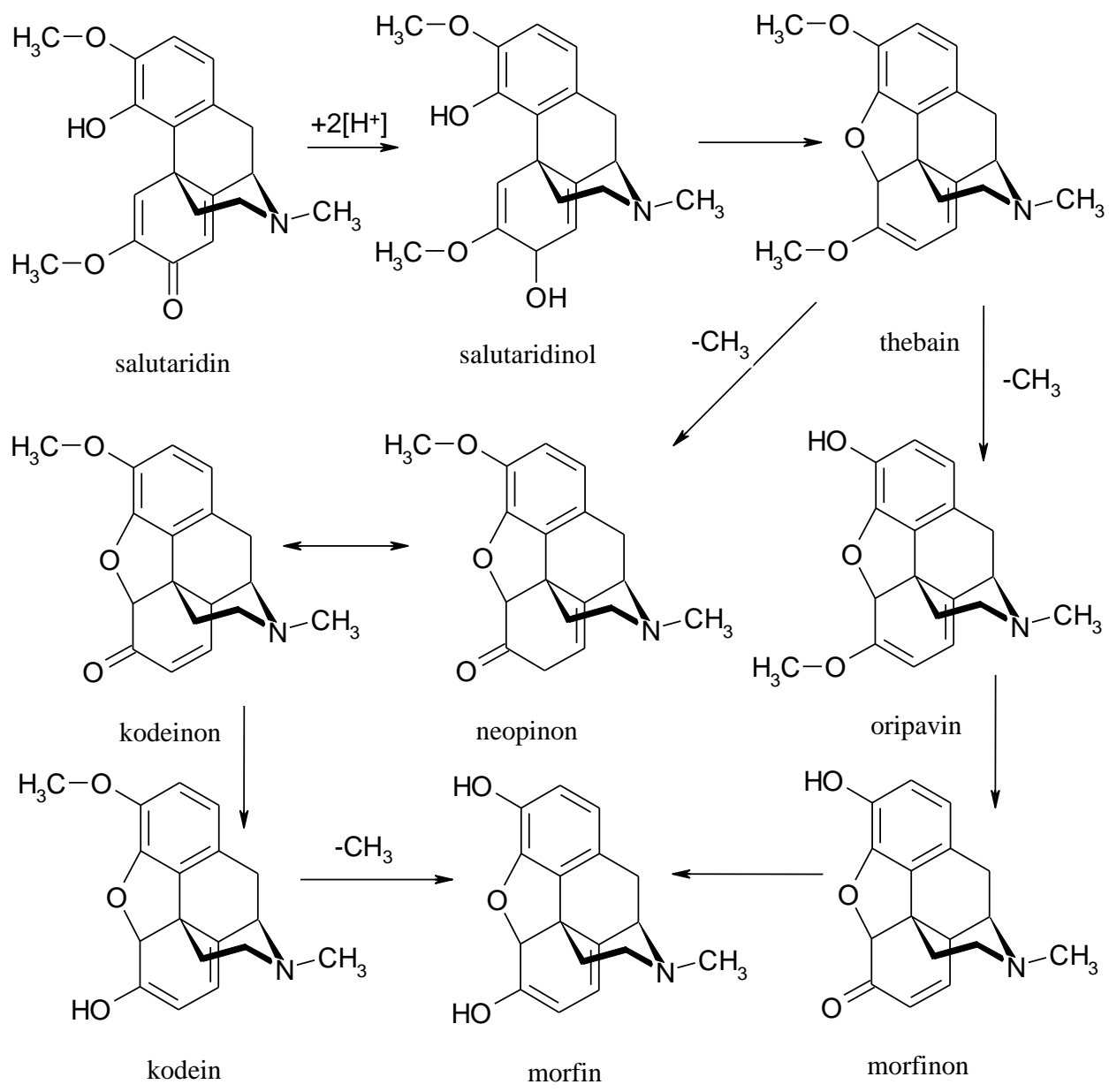
Narkotin má slabší účinky na CNS než morfin, nemá narkotické ani analgetické účinky. Dokáže selektivně tlumit centrum kašle a nesnižovat přitom sekreci průdušek. V některých státech je proto využíván jako antitusikum. V malých dávkách dýchací centrum stimuluje, proto je používán v kombinaci s morfinem kvůli omezení jeho nežádoucích účinků. Vliv na střevní peristaltiku je zanedbatelný. Používá se jako výchozí látka pro výrobu hydrastininu a kotarninu, látek využívaných při děložním krvácení^{46,51}.



3.4.7 Biosyntéza obsažených alkaloidů

Alkaloidy rostlina začíná syntetizovat už druhý až třetí den po vyklíčení. Syntéza probíhá v metabolicky aktivních pletivech nejdříve v kořeni, postupně se pak přesouvá přes listy a stonek až k tobolce. Alkaloidy jsou tvořeny různě v závislosti na vývinu rostliny a denní době. Nejdříve se tvoří spíše vedlejší alkaloidy, morfin se začíná hromadit až po ukončení fáze růžice listů. V období vývoje pupat až do technické zralosti máku se postupně tvoří nejdříve kodein, thebain a narkotin, později morfin, narkotolin a papaverin⁵².

Biosyntéza alkaloidů je u máku druhově specifická, morfin je tvořen pouze u *Papaver somniferum* L. a *Papaver setigerum* DC, thebain lze nalézt i u ostatních druhů. Specifickým prekurzorem syntézy alkaloidů máku setého je aminokyselina tyrosin. Kondenzací derivátů tyrosinu, dopaminu a 4-hydroxyfenylacetaldehydu vzniká (*S*)-norkoklaurin, centrální prekurzor benzylochinolinových alkaloidů. (*S*)-norkoklaurin je enzymaticky přeměněn na (*S*)-retikulin, dále (*R*)-retikulin, který přechází na promorfinanový alkaloid salutaridin. Dalším sledem reakcí vzniká ze salutaridinu thebain, kodein a morfin, jak je uvedeno v následující reakčním schématu⁵³.



4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Obecné metody

4.1.1 Příprava a čištění rozpouštědel

Použitá komerční rozpouštědla byla přečištěna destilací. Hlavní frakce jímána na základě tabelární hodnoty teploty varu, takto bylo přečištěno maximálně 95 % původního objemu rozpouštědla.

4.1.2 Odpařování extraktů a jejich uchovávání

Odpařování chromatografických frakcí probíhalo při teplotě do 40 °C za sníženého tlaku na vakuové odparce. Odparky jednotlivých alkaloidních bazí určené pro stanovení biologické aktivity byly rychle odpařeny v 5 ml injekčních ampulkách na vodní lázni o teplotě nepřesahující 60 °C za použití proudu filtrovaného vzduchu.

4.1.3 Stanovení struktury izolované látky

Ke zjištění hmotnostního spektra (ESI-MS) byl použit přístroj Thermo Finnigan LCQDuo Spektrometr a pro spektra ¹H NMR (500 MHz) a ¹³C NMR (125.7 MHz) přístroj Varian Inova 500 Spektrometr.

4.2 Rostlinný materiál

Materiál pro extrakci byl získán založením rostlinné kultury z komerčního osiva *Papaver somniferum* L. cv. Opál na jaře 2008 v Botanické zahradě léčivých rostlin farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové. Osivo dodala firma LABRIS s.r.o., Dobré 51, 517 93 Dobré. V průběhu měsíců července a srpna 2008 probíhala sklizeň nezralých zelených tobolek, ze kterých byla po rozříznutí vyjmuta nevyvinutá semena. Prázdné tobolky se sušily 2 dny při 50 °C, poté byly zpracovány rozemletím na tříštivém mlýnu na velikost částic do 3 mm. Získáno takto bylo 7,0 kg suchého materiálu hnědo-zelené barvy.

4.3 Příprava extraktů

Základní extrakt:

Celkové množství 7,0 kg suchých rozemletých tobolek bylo po 2 dny při teplotě 25 °C macerováno v 95% etanolu, následně byl materiál perkolován 78 litry etanolu (poměr 1:11,1).

Po odpaření rozpouštědla za snížené teploty proběhla dispergace odparku ve 2 litrech 2% HCl při pH 1 – 2 za použití indikátorového papírku. Po následném zředění destilovanou vodou na 5 litrů byl filtrací získán pěnicí filtrát tmavě hnědé barvy, který byl jako základní extrakt použit pro přípravu následujících výtřepků:

Výtřepek Ac-Et₂O:

Po zalkalizování základního extraktu 900 ml 10% NaOH na pH 9,5 – 10 byl extrakt vytřepán 4× 1,2 litry Et₂O. Po oddělení vrstev byla organická fáze zfiltrována a odpařena. Tento výtřepek je v práci dále zpracováván.

Výtěžek n = 38 g značně viskózního, tmavě hnědého odparku.

Výtřepek Ad-CHCl₃:

Po vytřepání Et₂O a oddělení organické fáze byla fáze vodná následně vytřepána 4× 1,2 litry CHCl₃. Oddělení vrstev probíhalo obtížněji než u Et₂O výtřepku. Po odpaření organické fáze došlo k vyloučení práškovité látky bílo-žluté barvy, tato byla v odparku ponechána.

Výtěžek n = 20,5 g nekrystalického odparku světle hnědé barvy s částicemi vyloučené práškovité látky.

Výtřepek Bc-Et₂O:

Po předchozím vytřepání chloroformem (výtřepek Ad) byla vodná fáze zalkalizována 50% NaOH na pH 12,5 – 13. Celkové množství 8,1 litru takto vzniklého roztoku bylo vytřepáno 5× 2 litry Et₂O. Po oddělení vrstev byla organická fáze odpařena.

Výtěžek n = 1,1 g značně viskózního, tmavě hnědého odparku s malým množstvím vyloučených drobných krystalků.

Výtřeppek Bd-CHCl₃:

Malé množství alkalického extraktu po předchozím vytřepávání bylo okyseleno H₂SO₄, poté bylo do vzniklého roztoku přidáno Mayerovo činidlo. Po přidání činidla došlo ke vzniku velice jemného zákalu, proto bylo vytřepání CHCl₃ nahrazeno srážením zbytkových alkaloidů ve formě mayerátu.

Kvartérní jodidy J:

K přípravě kvartérních jodidů při pH 3 nedošlo, kvartérní alkaloidy byly vysráženy přidavkem Mayerova činidla, jak je uvedeno dále.

Kvartérní alkaloidy Q:

U alkalického extraktu vzniklého po oddělení organické fáze Et₂O u výtřepku Bc došlo k neutralizaci 3M H₂SO₄ na pH 3. Vzniklo tak 11,7 litrů roztoku, který během neutralizace z původní hnědé barvy značně zesvětlal. Přidáním 1 litru Mayerova činidla došlo k vysrážení zbytkových alkaloidů, jemná černá sraženina byla po sedimentaci dekantována, zfiltrována za promytí destilovanou vodou v Büchnerově nálevce a vysušena ve vakuu.

Výtěžek n = 3,2 g práškovitého odparku hnědé barvy.

K přípravě základního extraktu a daných výtřepků v rámci diplomové práce nedošlo.

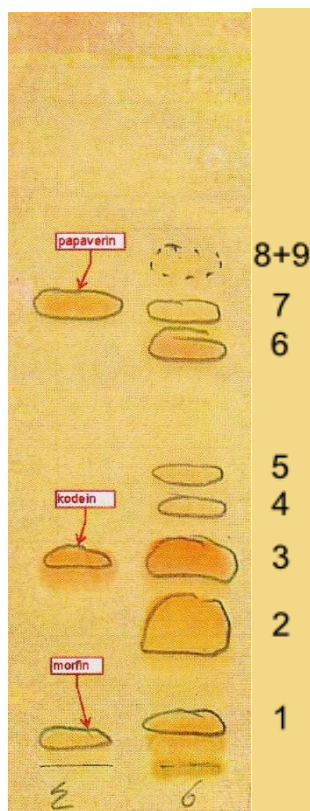
Zpracování výtřepku Ac-Et₂O:

Výtěžek n = 38 g výtřepku Ac-Et₂O byl rozpuštěn v 600 ml 2% HCl o pH 1, poté byl roztok filtrován přes křemelinu a dále vytřepován 3× 200 ml Et₂O. Po oddělení vrstev byla organická fáze odpařena za vzniku 1,85 g značně viskózního odparku tmavě hnědé barvy a současného vyloučení bělavé práškovité látky. Použití Mayerova činidla vykazovalo negativní reakci na přítomnost alkaloidů.

Vodná fáze z předchozího dělení byla dále vytřepána 4× 250 ml CHCl₃, po oddělení vrstev byla organická fáze odpařena za vzniku 2,85 g značně viskózního odparku tmavě hnědé barvy. Použitím Mayerova činidla byla prokázána přítomnost alkaloidů. Tento odparek nebyl nadále zpracováván.

Dále byla vodná fáze přidavkem 10% roztoku Na₂CO₃ zalkalizována a takto vzniklých 980 ml hnědého roztoku s patrným zákalem bylo vytřepáno 5× 300 ml CHCl₃. Odpařením bylo

získáno 22,45 g značně viskózního odparku hnědé barvy s pozitivní reakcí na přítomnost alkaloidů. Po rozpuštění odparku ve 150 ml 2% HCl o pH 1, zředění destilovanou vodou na 450 ml a alkalizaci 10% roztokem NaOH proběhlo vytřepání suspenze 4× 300ml Et₂O. Odpařením organické fáze vzniklo 4,12 g amorfního odparku hnědé barvy. Tento nebyl nadále zpracováván. Vytřepáním vodné fáze 5× 300ml CHCl₃ a následným odpařením organické fáze bylo získáno 12,25 g práškovitého odparku tmavě hnědé barvy s pozitivní reakcí na přítomnost alkaloidů. Odparek byl označen ADd (chloridy alkaloidů nerozpustné v CHCl₃, baze rozpustné v CHCl₃) a obsahuje několik alkaloidů (obr. 2).



Obr. 2: Pilotní TLC výtřepku ADd (vpravo) za užití standardů kodeinu, morfinu a papaverinu (vlevo) (Kieselgel Merck, UV254 nm, toluen+CHCl₃+Et₂NH 45+45+10, komora nasycená, 1× vyvíjeno, detekce UV 254 nm, Dragendorffovo činidlo).

4.4 Tenkovrstvá chromatografie (TLC)

Vyvíjení chromatografických desek probíhalo vzestupně v systému N (normálních) komor. Před použitím byly komory syceny mobilní fází po 1 hodinu.

4.4.1 Adsorbenty

Kieselgel 60 GF₂₅₄ fuer TLC (Merck)

Oxid hlinitý neutrální 0,1 – 0,2 mm (Sigma-Aldrich)

4.4.2 Chromatografické soustavy

S1 Toluén + chloroform + diethylamin 45 : 45 : 10

4.4.3 Detekční činidla

D1 Dragendorffovo činidlo (dle Muniera)

Roztok A byl připraven rozpuštěním 20,0 g kyseliny vinné a 1,7 g zásaditého dusičnanu bismutitého v 80,0 ml destilované vody.

Roztok B byl připraven rozpuštěním 16,0 g jodidu draselného ve 40,0 ml destilované vody.

Zásobní roztok byl připraven smísením roztoků A a B v poměru 1 : 1, lze jej uchovávat při 4 °C po několik měsíců.

Detekční roztok byl připraven smísením 5,0 ml zásobního roztoku s roztokem 10,0 g kyseliny vinné v 50,0 ml vody, lze jej uchovávat při 4 °C po několik měsíců. Tento roztok je využíván k detekci alkaloidů na chromatografických deskách.

D2 Mayerovo činidlo

Směs 1,35 g chloridu rtuťnatého a 5,0 g jodidu draselného bylo rozpuštěno v destilované vodě a doplněno do 100,0 ml. Toto činidlo se díky schopnosti srážet alkaloidy využívá k jejich detekci.

4.5 Chemikálie, rozpouštědla a další potřeby

4.5.1 Pro přípravu extraktů a TLC

Rozpouštědla:

Ethanol č. 95%, denaturovaný methanolem (EtOH)

Diethylether (Et₂O)

Diethylamin (Et₂NH)

Hydroxid sodný 2% (NaOH)

Hydroxid sodný 50% (NaOH)

Chloroform č. (CHCl₃)

Kyselina chlorovodíková 2% (HCl)

Kyselina sírová (H₂SO₄)

Methanol č. (MeOH)

Toluen č. (C₆H₅CH₃)

Hexan č. (C₆H₁₄)

Chemikálie:

Argon

Dragendorffovo činidlo

Křemelina Celite C 535 John's Manville (Sigma-Aldrich)

Oxid hlinitý (Al₂O₃)

4.5.2 Pro stanovení cholinesterasové aktivity (vč. přípravy erythrocytárních pouzder)

Chemikálie:

Acetylthiocholin jodid (Sigma-Aldrich) 10mM roztok

Butyrylthiocholin jodid (Sigma-Aldrich) 10mM roztok

Dimethylsulfoxid p. a. (Sigma-Aldrich)

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

Galanthamin hydrobromid (Changsha Organic Herb Inc., China)

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

Pufry:

- Fosfátový pufr 5mM pH 7,4

Roztok A

10mM roztok NaH_2PO_4 (1 litr roztoku obsahuje 1,20 g NaH_2PO_4).

Roztok B

10mM roztok Na_2HPO_4 (1 litr roztoku obsahuje 1,42 g Na_2HPO_4).

Pufr vzniká smísením 57 ml roztoku A, 283 ml roztoku B a 300 ml destilované vody.

- Fosfátový pufr 5mM pH 7,4 s obsahem 150 mM NaCl
- Fosfátový pufr 100mM pH 7,4

Roztok A

200mM roztok NaH_2PO_4 (1 litr obsahuje 24,0 g NaH_2PO_4).

Roztok B

200mM roztok Na_2HPO_4 (1 litr obsahuje 28,4 g Na_2HPO_4).

Pufr vzniká smísením 57 ml roztoku A, 283 ml roztoku B a 300 ml destilované vody.

Biologický materiál:

Jako zdroj lidské acetylcholinesterasy (HuAChE) byla použita pouzdra lidských erytrocytů, lidská butyrylcholinesterasa (HuBuChE) byla získána z lidské plazmy.

Čerstvá krev pro přípravu erytrocytárních pouzder, odebraná od zdravých dobrovolníků, byla ošetřena přidávkem 1 ml citrátu sodného na 10 ml krve podle upravené metody Stecka a Kanta⁵⁴. Bezprostředně po odběru se krev po 5 ml rozdělí do zkumavek se šroubovatelným uzávěrem a je takto centrifugována při 4000 ot.min⁻¹ po 10 minut na centrifuze Boeco U-32R s rotorem Hettich 1611. Po centrifugaci se odsaje všechna plazma neobsahující

erythrocyty a uchová se do stanovení aktivity BuChE v chladničce při 4 °C (nejdéle 6 hodin). Zbytek plazmy se z erythrocytárního sedimentu odsaje při naklonění zkumavek bezpopelovým filtračním papírem s hlazeným povrchem, jehož špička je sestřižena. Po odsátí plazmy se odečte objem erythrocytární masy, sediment je zředěn 5 mM fosfátovým pufrům pH 7,4 obsahujícím 150 mM chloridu sodného, suspenze rozdělena do zkumavek po 13 ml, dobře promíchána a centrifugována stejným způsobem, jako při oddělování plazmy. Takto se promytí provede celkem 3× a promývací kapalina je dokonale odstraněna. Po tomto promytí je přidáno takové množství 5 mM fosfátového pufru pH 7,4 bez obsahu chloridu sodného, aby poměr erythrocyty : pufr byl 1 : 9. Suspenze je opět homogenizována, přelita do Erlenmayerovy baňky a erythrocyty jsou ponechány spontánně hemolyzovat za míchání teflonovým míchadlem při 300 rpm. Ihned po skončení této řízené hemolýzy se stanovuje aktivita suspenze, případně je u suspenze upravena absorbance na hodnotu 0,08 – 0,15 pomocí 5 mM fosfátového pufru pH 7,4 a takto naředěný hemolyzát je skladován do doby použití při -22 °C. Při stanovení enzymové aktivity musí být hodnota rozdílu absorbance 0,08 – 0,15.

Stanovení cholinesterasové aktivity u plazmy je provedeno stejným způsobem, uchovávána je stejně jako hemolyzát (hodnota rozdílu absorbance musí být 0,15 – 0,20).

4.5.3 Pro stanovení antioxidační aktivity

Chemikálie:

2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl radikál, 0,2mM roztok v 50% EtOH (w/w) (Sigma-Aldrich)

Dimethylsulfoxid p. a. (Sigma-Aldrich)

Kvercetin č. (Sigma-Aldrich)

Kyselina askorbová č. (Sigma-Aldrich)

Trolox č. (Sigma-Aldrich)

4.6 Izolace a stanovení struktury izolovaných látek

4.6.1 Dělení výtřepku ADd za použití TLC

Tabulka č. 1: Dělení výtřepku ADd za použití TLC

Hmotnost odparku	12,25 g
Chromatografické desky	Kieselgel 60 GF ₂₅₄ fuer TLC (Merck), 15 x 15 cm, 6,5 g
Chromatografická	Chloroform + toluen + diethylamin 45 : 45 : 10
Počet vyvíjených desek	210
Vyvíjení / komora	Vyvíjeno 2×, komora nasycená
Detekce	UV 254 nm

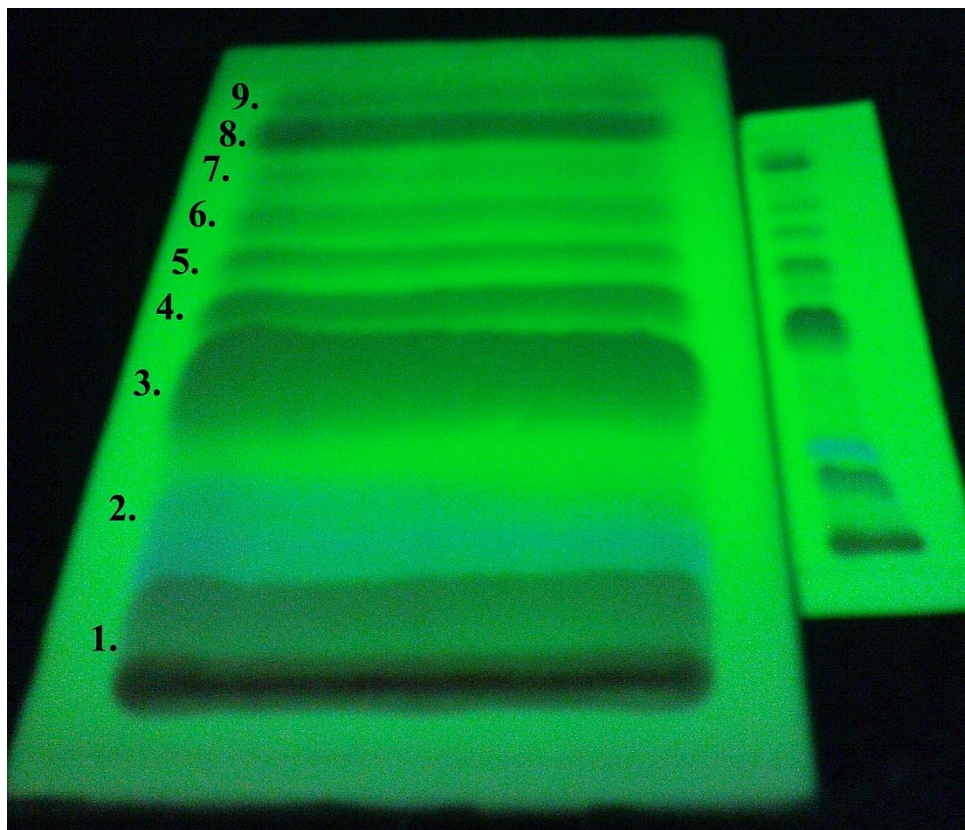
Odparek označený ADd (chloridy alkaloidů nerozpustné v CHCl₃, baze rozpustné v CHCl₃) rozpuštěn v celkem 88 ml směsi chloroform + EtOH 1 : 1 a nanesen v 13 cm pruzích na jednotlivé chromatografické desky za použití průtokové kapiláry.

Po dvojnásobném vyvinutí a vysušení chromatografických desek byly jednotlivé zóny pod UV lampou označeny a poté separovány. Adsorbent ze shodných zón jednotlivých desek byl spojen. Po smísení s křemelinou (objem křemeliny zhruba poloviční k objemu adsorbentu) byl vsypán do skleněné trubice a eluován směsí CHCl₃ + EtOH 1 : 1 v množství postačujícím pro vymytí látek z adsorbentu. Retenční faktory a výtěžky odparků eluátů jednotlivých zón shrnuje tabulka výsledků preparativní chromatografie.

Tabulka č. 2: Výsledky preparativní chromatografie

Zóna č.	1	2	3	4	5	6	7	8	9
R _f	0,12	0,22	0,43	0,50	0,58	0,65	0,72	0,82	0,88
Výtěžek (g)	1,32	0,28	2,74	0,62	0,35	0,19	0,62*		

* vzhledem k obtížnému dělení zón 7 – 9 byly tyto spojeny



Obr. 3: Preparativní TLC výtřepku ADd, detekce UV 254 nm

4.6.2 Zpracování zóny č. 3

2,74 g odparku tmavě hnědé barvy s vyloučenou práškovitou látkou okrové barvy bylo po rozpuštění ve 100 ml 2% HCl vytřepáno 3× 30 ml Et₂O, organická fáze byla po oddělení odstraněna a dále nepoužita. Kyselý roztok byl alkalizován 10% roztokem Na₂CO₃ na pH 9,5 a suspenze vytřepána 3× 60 ml Et₂O. Organická fáze dále vytřepána 3× 50 ml HCl, tato kyselá fáze opět alkalizována 10% roztokem Na₂CO₃ na pH 9,5 a vytřepána 3× 60 ml Et₂O. Organická fáze byla dále vysušena bezvodým Na₂SO₄ a odpařena, odparek rozpuštěn ve 30 ml CHCl₃, vzniklý roztok zfiltrován přes sloupec neutrálního oxidu hlinitého (zrnitost 0,1 – 0,2 mm, 5 g; průměr 8 mm, výška 45 mm) a sloupec promyt 50 ml CHCl₃. Po odpaření rozpouštědla bylo 1,42 g odparku s drobnými krystaly okrové barvy rekrystalizováno ze směsi 95% EtOH + hexan.

Vysušením bylo získáno 1,11 g drobně krystalické látky okrové barvy, po vysušení v Abderhaldenově sušícím zařízení t. t. 156 – 158 °C, která byla označena JD-1.

4.7 Stanovení cholinesterasové inhibiční aktivity (IC₅₀)

Stanovení cholinesterasové inhibiční aktivity IC₅₀ probíhalo Ellmanovou spektrofotometrickou metodou využívající 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoovou kyselinu (DTNB)⁵⁵. Estery thiocholinu, použité jako substráty, jsou cholinesterasami štěpeny na thiocholin a příslušnou kyselinu. SH- skupina thiocholinu je po vazbě s DTNB za vzniku žlutého produktu stanovována spektrofotometricky při $\lambda = 436$ nm (AChE) nebo $\lambda = 412$ nm.

Sledován je nárůst absorbance za 1 minutu. Výpočet hodnot IC₅₀ je prováděn z naměřených hodnot poklesu aktivity acetylcholinesterasy nebo butyrylcholinesterasy nelineární regresí programem GraphPad Prism (verze 3.02 pro Windows; výrobce Graph PaD Software, San Diego, CA, USA). Výsledky jsou následně porovnány s hodnotami IC₅₀ známých inhibitorů cholinesteras: galanthaminem a huperzinem A. K výpočtu procent inhibice (% I) je použit vzorec $\% I = 100 - (\Delta A_{BL} / \Delta A_{SA}) \times 100$, kde ΔA_{BL} značí nárůst absorbance slepého vzorku za 1 minutu a ΔA_{SA} nárůst absorbance měřeného vzorku za 1 minutu.

V případě slepého vzorku je do jamek mikrotitračních destiček napipetováno 8,3 μ l plazmy či hemolyzátu, přidáno 283 μ l 5 mM DTNB, 8,3 μ l DMSO a směs je poté po 2 minutovém promíchání inkubována v komoře readeru při 37 °C po dobu 5 minut. Po inkubaci je přidáno 33,3 μ l roztoku substrátu (acetylthiocholinjodidu či butyrylthiocholinjodidu) a při příslušné vlnové délce ($\lambda = 436$ nm pro AChE a $\lambda = 412$ nm pro BuChE) změřena absorbance.

V případě měřených vzorků (extraktů) je použito stejného objemu činidel a roztoku substrátu. Místo přídatku samotného DMSO je použito roztoků měřené látky o různých koncentracích (40,0; 10,0; 4,0; 1,0; 0,4 mM) v DMSO (případně v řadě koncentrací ještě nižších) nebo roztoků extraktů o různých koncentracích (20,0; 10,0; 2,0; 1,0; 0,2 mg.ml⁻¹ či nižších). Měření je prováděno při 37 °C, vlnové délce $\lambda = 436$ nm v kinetickém módu po dobu 1 minuty (celkem 7 měření). Hodnota IC₅₀ je vypočtena programem GraphPad Prism, určena je 50% inhibiční koncentrace. Cholinesterasová inhibiční aktivita se porovnává s referenčními látkami (galanthaminem a huperzinem A).

Tabulka č. 3: Cholinesterasová a antioxidační aktivita standardních látek

Látka	HuAChE (IC ₅₀)	HuBuChE (IC ₅₀)
Galanthamin	1,710 ± 0,065 μM	42,30 ± 1,30 μM
Huperzin A	0,033 ± 0,001 μM	>1000 μM

4.8 Stanovení antioxidační aktivity (DPPH test)

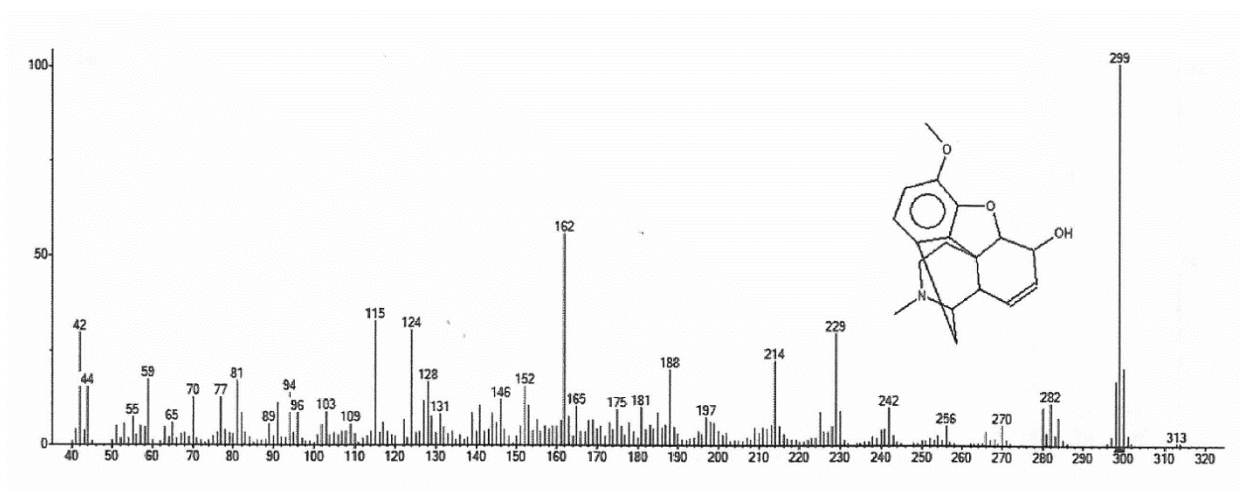
Ke stanovení antioxidační aktivity (EC₅₀) *in vitro* byl použit DPPH test. Využíváno je reakce měřených vzorků s 2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl radikálem, který má fialové zbarvení. Reakci poskytují látky fungující jako donory vodíku. Redukovaná forma 2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl radikálu má žluté zbarvení, dochází proto k odbarvení původně fialového roztoku. Míra poklesu absorbance je měřena spektrofotometricky při $\lambda = 525$ nm.

Dle rozpustnosti extraktů v DMSO či EtOH jsou připraveny roztoky v koncentracích 2,0; 1,0; 0,5; 0,2 mg.ml⁻¹. Dle schématu se poté do mikrotitrační destičky pipetuje 100 μl jednotlivých roztoků a 100 μl 0,2 mM roztoku DPPH. Po 40 minutách od smísení roztoků je měřena absorbance při $\lambda = 525$ nm. Výpočet procent inhibice je proveden dle vzorce $\% Q = (1 - A_x / A_0) \times 100$, kde A₀ značí průměrnou absorbanci naměřenou u slepého vzorku a A_x značí absorbanci naměřenou po přidavku roztoku antioxidantu, od které je odečtena absorbance samotného roztoku vzorku. Výpočet hodnoty EC₅₀ je proveden programem GraphPad Prism, určena je 50% účinná koncentrace antioxidační aktivity.

5. VÝSLEDKY

5.1 Stanovení struktury JD-1

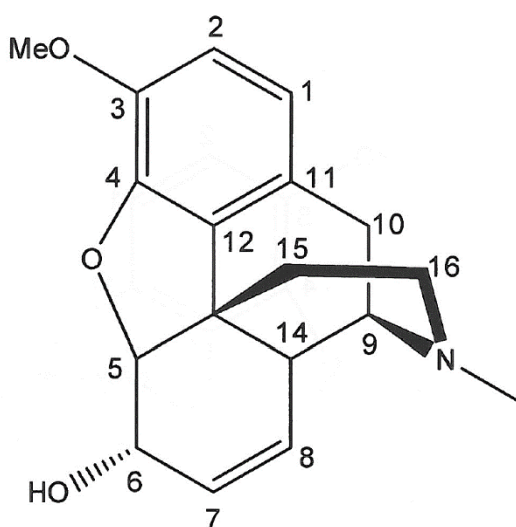
Na základě zhodnocení spektrálních výsledků a jejich porovnání s literárními údaji je možné konstatovat, že látka JD-1 je kodein.



Obr. 4: MS studie kodeinu

EI-MS m/z : 299 [M^+] (100); 298 (20); 282 (10); 242 (10); 229 (30); 214 (25); 188 (22); 162 (60); 124 (30); 115 (32)

5.2 NMR studie kodeinu



Obr. 5: NMR studie kodeinu

^1H NMR (CDCl_3 , 25 °C)

1.82 (1H, H-15eq.); 2.88-2.95 (2H, H-15ax.; H-10qe(α)); 3.14 (1H, H-10qe(β));
3.19 (1H, H-16eq); 3.27 (1H, H-16ax); 3.39 (3H, -NCH₃); 3.75(1H, H-9); 3.86 (3H, 3-OCH₃);
4.29 (1H, H-6); 4.32 (1H, H-14); 5.01 (1H, H-5); 5.23 (1H, H-8); 5.78 (1H, H-7); 6.60 (1H, H-1);
6.72 (1H, H-2).

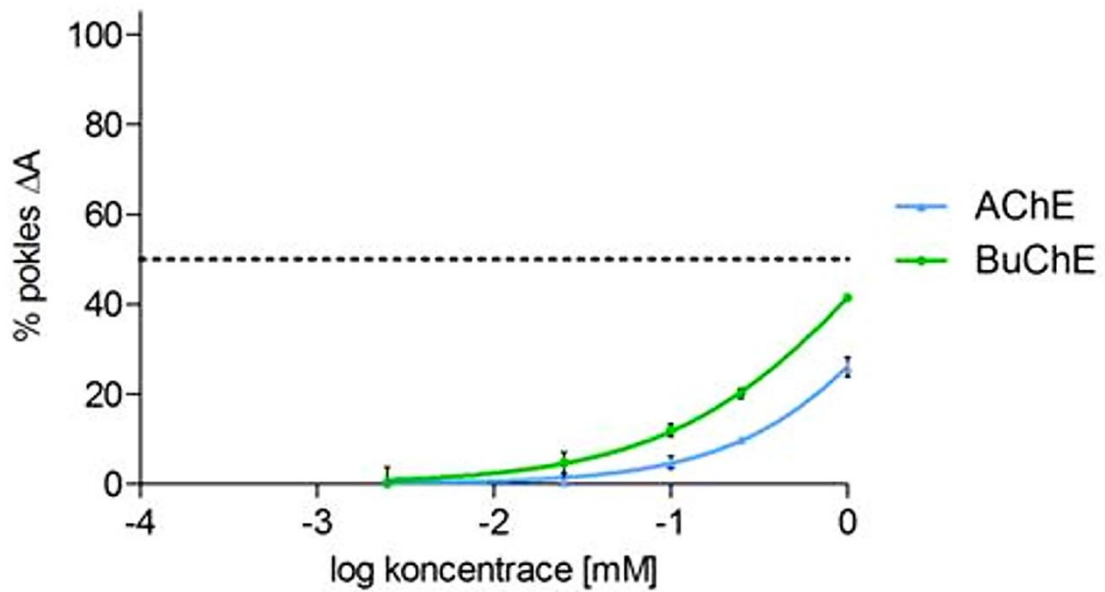
^{13}C NMR (CDCl_3 , 25 °C)

26.1 C-10; 31.0 C-15; 33.3 C-14; 41.2 C-13; 56.3 3-OCH₃; 58.6 -NCH₃; 59.8 C-16; 66.0 C-6;
74.9 C-9; 90.8 C-5; 113.8 C-2; 119.9 C-1; 122.2 C-11; 126.1 C-8; 129.8 C-12; 134.3 C-7; 143.1
C-3.

5.3 Výsledky cholinesterasové inhibiční aktivity

Tabulka č. 4: inhibiční aktivita kodeinu vůči AChE a BuChE

	IC ₅₀ (μM)	
	AChE	BuChE
Kodein	>1000 (3320)	>1000 (1618)
Galanthamin	6,9 \pm 0,3	156 \pm 6,9
Huperzin A	0,25 \pm 0,01	>1000



Obr. 6: Graf inhibiční aktivity kodeinu vůči AChE a BuChE v závislosti na koncentraci

5.4 Výsledky antioxidační aktivity

Hodnoty EC_{50} DPPH testu pro kodein: látka má aktivitu vyšší než 500 μ M.

Tabulka č. 5: Antioxidační aktivita kodeinu

	EC ₅₀ (μ M)
	AChE
Kodein	>500
Kvercetrin	25,3 \pm 1,2
Trolox	27,8 \pm 0,8

6. DISKUZE

V rámci diplomové práce jsem se zabýval izolací neznámé látky JD-1 ze sumárního extraktu zralých, suchých, semen zbavených tobolek máku setého (*Papaver somniferum* L.). K izolaci jsme použili metody obvyklé pro tento typ sloučenin. Po izolaci byly u látky stanoveny základní fyzikálně-chemické charakteristiky a látka byla na základě MS a NMR spekter identifikována jako kodein. Kodein je isochinolinový alkaloid morfinanového typu a jeho výskyt v máku setém je dobře popsán. Kodein je v současnosti intenzivně využíván ve farmakoterapii kašle, využití nalézá též díky jeho analgetickým a protiprůjmovým účinkům¹⁶.

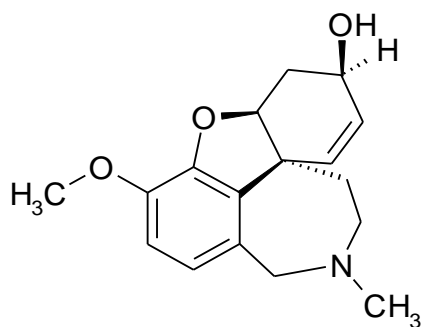
U řady isochinolinových alkaloidů byly zjištěny významné biologické účinky, proto se tato práce zabývá výzkumem farmakologické aktivity izolované látky, konkrétně její inhibiční aktivity vůči lidským cholinesterasám a aktivity antioxidantní. Pokud by látka aktivitu vykazovala, mohla by se stát strukturní předlohou pro vývoj nových účinných léčiv použitelných v terapii neurodegenerativních onemocnění, jako je AD. U čeledi Papaveraceae byl již na Katedře farmaceutické botaniky a ekologie zjištěn obsah isochinolinových alkaloidů se schopností inhibovat lidské cholinesterasy, významným z nich je chelidonin (*Chelidonium majus* L.) schopný AChE a BuChE účinně inhibovat⁵⁶. Z hlediska obsahu isochinolinových alkaloidů byl na katedře výzkumu podroben i mák setý.

Hypotetické ideální léčivo by mělo být schopné působit v místě potřeby (schopnost procházet HEB) bez nežádoucích periferních účinků (bolest hlavy, nauzea, zvýšené pocení, atd.) a zasáhnout více patofyziologických procesů najednou. Na základě medicíny založené na důkazech jsou terapeuticky významné pouze dvě skupiny látek použitelných v terapii AD: kognitiva a inhibitory NMDA. Právě na kognitiva, konkrétně inhibitory cholinesteras, a jejich aktivitu je zaměřena experimentální část této práce. Jako nejvhodnější se jeví inhibice cholinesteras spolu s ovlivněním sekrece neuromediátorů tak, aby nedocházelo k tvorbě plaku a zůstala zajištěna normální mozková činnost. Perspektivními se z hlediska těchto požadavků stále více stávají látky přírodního původu.

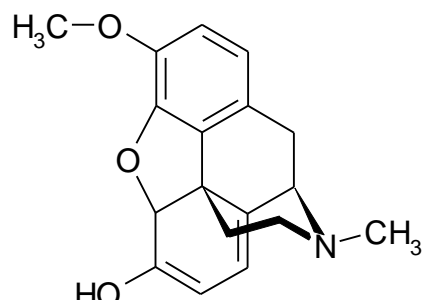
Na základě námi změřených hodnot inhibiční aktivity vůči AChE a BuChE v porovnání se standardy kodein tuto aktivitu nevykazuje. Podobné výsledky byly zjištěny i u dalších alkaloidů máku setého, morfin⁵⁷ a narkotin⁵⁸ inhibiční aktivitu vůči cholinesterasám nevykazuje, thebain⁵⁹ je jejich slabým inhibitorem.

Antioxidační aktivitu jsme u kodeinu stanovili jako slabou (při použití DPPH testu větší než 500 μM), na základě námi změřených hodnot není předpoklad využití kodeinu jako látky schopné redukovat množství volných radikálů či jinak omezovat účinky oxidačního stresu na mozek.

Kodein by se však v terapii neurodegenerativních onemocnění mohl uplatnit jiným způsobem. Díky strukturální podobnosti s v praxi užívaným galanthaminem, dokáže kodein působit jako nekompetitivní agonista nikotinových receptorů. To díky interakci s vazebným místem na α -podjednotce nikotinového receptoru, které je necitlivé vůči endogennímu acetylcholinu a jeho kompetitivním agonistům či antagonistům. Kodein se tak spolu s galanthaminem a fysostigminem může stát potenciální předlohou léčiv selektivně ovlivňujících nikotinové receptory nezávisle na tvorbě či degradaci acetylcholinu. Předpokladem je použití těchto látek v kombinaci s inhibitory cholinesteras, kdy bude využita schopnost zvyšovat citlivost nikotinových receptorů pro endogenní acetylcholin^{60,61,62}.



galanthamin



kodein

Důležitým je v terapii AD fakt, že doposud byla léčba inhibitory cholinesteras zaměřena na selektivní inhibici AChE, nicméně nové důkazy ukazují, že BuChE hraje v rozvoji AD mnohem důležitější roli, než se dosud předpokládalo. Za fyziologických podmínek v mozku převládá (95 %) degradace acetylcholinu pomocí AChE, u pacientů s AD však může klesnout (až na 15 %),

organismus pokles koncentrací AChE kompenzuje zvýšením množství BuChE (až o 20 %), proto se inhibice BuChE stává významným terapeutickým cílem v terapii AD. Z tohoto hlediska byly výzkumu podrobeny acyklické opioidy a z výsledků měření jasně vyplývá, že by se tyto látky mohly v budoucnu stát strukturálními předlohami selektivních inhibitorů BuChE. Tyto látky a řada dalších opioidů, včetně izolovaného kodeinu, dokáží též díky alosterické modulaci nikotinového receptoru pozitivně ovlivňovat citlivost receptoru na acetylcholin. Stávají se tak pro výzkum látek přírodního původu potenciálně upotřebitelných v terapii AD velice důležitými⁶².

Závěrem je třeba říci, že stanovené cíle byly v rámci diplomové práce splněny a ačkoli kodein inhibiční aktivitu vůči lidským cholinesterasám nevykazuje a antioxidační aktivitu vykazuje slabou, je z hlediska jeho schopnosti zvyšovat citlivost nikotinových receptorů na ACh perspektivní strukturální předlohou pro nová léčiva.

7. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AcCoA	Acetylkoenzym A
ACh	Acetylcholin
AChE	Acetylcholinesterasa
AD	Alzheimerova choroba
ApoE-e4	Apolipoprotein E-e4
APP	Amyloidový prekurzorový protein
ATP	Adenosintrifosfát
BuChE	Butyrylcholinesterasa
CAT	Cholinacetyltransferasa
CNS	Centrální nervová soustava
COX-2	Cyklooxygenasa 2
DPPH	Difenylpikrylhydrazyl radikál
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTNB	5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina
GABA	γ -aminomáselná kyselina
HEB	Hematoencefalická bariéra
HuAChE	Lidská acetylcholinesterasa
HuBuChE	Lidská butyrylcholinesterasa
NMDA	N-methyl-D-aspartát
TLC	Tenkovrstvá chromatografie

8. LITERATURA

- ¹ Dušek, K.; Večeřová-Procházková, A.: *Diagnostika a terapie duševních poruch*. Grada, Praha 2010. ISBN 978-80-247-1620-6.
- ² Mačák, J.; Mačáková, J.: *Patologie*. Grada, Praha 2004. ISBN 80-247-0785-3.
- ³ Jiráček, R.; Holmerová, I.; Borzová, C.: *Demence a jiné poruchy paměti: komunikace a každodenní péče*. Grada, Praha 2010. ISBN 978-802-4724-546.
- ⁴ Růžička, E.; Jiráček, R.: *Alzheimerova nemoc a jiné demence*. Česká lékařská společnost J. E. Purkyně, Praha 2001.
- ⁵ Fišar, Z.: *Vybrané kapitoly z biologické psychiatrie*. Grada, 2., přeprac. a dopl. vyd., Praha 2009. ISBN 978-802-4727-370.
- ⁶ Brunovský, M.: *Objektivizace diagnostiky a změn vigility u demencí*. Galén, Praha 2003. ISBN 80-726-2236-6.
- ⁷ Koukolík, F.; Jiráček, R.: *Alzheimerova nemoc a další demence*. Grada, Praha 1998. ISBN 80-716-9615-3.
- ⁸ Koukolík, F.; Jiráček, R.: *Diagnostika a léčení syndromu demence*. Grada, Praha 1999. ISBN 80-716-9716-8.
- ⁹ Jiráček, R.; Koukolík, F.: *Demence: neurobiologie, klinický obraz, terapie*. Galén, Praha 2004. ISBN 80-726-2268-4.
- ¹⁰ Jiráček, R.: *Farmakoterapie* 1(6), 604-609 (2005).
- ¹¹ Greig, N. H.; Lahiri, D. K.; Sambamurti, K.: *International Psychogeriatrics* 14(S1), 77-91 (1999).
- ¹² Jiráček, R.: *Praktické lékařství* 5(4), 176-178 (2009).
- ¹³ Jiráček, R.: *Neurologie pro praxi* 3(2), 101-105 (2002).
- ¹⁴ Greig, N. H.; Utsuki, T.; Ingram, D. K.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102(47), 17213-17218 (2005).

- ¹⁵ Lincová, D.: *Základní a aplikovaná farmakologie*. Galén, Praha 2002,
ISBN 80-246-0538-4.
- ¹⁶ Suchopár, J.: *Remedia compendium*. Panax, čtvrté vyd., Praha 2002.
ISBN 978-809-0280-649.
- ¹⁷ Standridge, J. B.: *Clin. Ther.* 26(5), 615-630 (2004).
- ¹⁸ Patočka, J.: *Psychiatrie* 3(1), 23-24 (1999).
- ¹⁹ Martin, J.; Kršková, Z.; Dušek, J.: *Praktické lékárenství* 7(1), 39-41 (2011).
- ²⁰ Wang, R.; Yan, H.; Tang, X.: *Acta Pharmacol. Sin.* 27(1), 1-26 (2006).
- ²¹ Kozikowski, A. P.; Campiani, G.; Sun, L., et. al.: *J. Am. Chem. Soc.* 118(46),
11357-11362 (1996).
- ²² Švestka, J.: *Psychiatrie* 5(4), 265-274 (2011).
- ²³ Benešová, O.: *Psychiatrie* 7(1), 31-37 (2003).
- ²⁴ Müller-Spahn, F.; Sollberger, D.; Wollmer, A. M.: *Ther. Umsch.* 66(6), 432-440 (2009).
- ²⁵ Stockburger, C.; Kurz, CH.; Koch, A. K.: *Biochem. Soc. Trans.* 41(5), 1331-1334 (2013).
- ²⁶ Fishof, P. K.; Saletu, B.; Rüther, E.: *Neuropsychobiology* 26(1-2), 65-70 (1992).
- ²⁷ Fioravanti, M.; Nakashima, T.; Xu, J., et. al.: *BMJ Open* 7, e005090 (2014),
DOI: 10.1136/bmjopen 2014-005090.
- ²⁸ Araki, T.; Wake, R.; Miyaoka, T., et. al.: *International Journal of Geriatric Psychiatry*
29(9), 881-889 (2014).
- ²⁹ Geerts, H.: *The Journal of Clinical Pharmacology* 46(S1), 8-16 (2006).
- ³⁰ Levi, M.; Brimble, M.: *Curr. Med. Chem.* 11(18), 2383-2397 (2004).
- ³¹ Rüther, E.; Ritter, R.; Apecechea, M., et. al.: *Pharmacopsychiatry* 27(1), 32-40 (1994).
- ³² Yamada, K.; Nitta, A.; Hasegawa, T., et. al.: *Behav. Brain Res.* 83(1-2), 117-122 (1997).
- ³³ Williams, P.; Sorribas, A.; Howes, M. R.: *Nat. Prod. Rep.* 28(1), 48-77 (2010).
- ³⁴ Howes, M. R.; Perry, E.: *Drugs* 28(6), 439-468 (2011).

- ³⁵ Mehta, M.; Adem, A.; Sabbagh, M.: *Int. J. Alzheimer's Dis.* 2012(1), 1-8 (2012).
- ³⁶ Frost, D.; Meechooet, B.; Wang, T.: *PLoS ONE* 6(5), e19264 (2011),
DOI: 10.1371/journal.pone.0019264.
- ³⁷ http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Papaver_somniferum_FotoTakkk_Hungary.jpg
vloženo 20.8.2014.
- ³⁸ Blaschek, W.: *HagerROM 2004 Hagers Handbuch der Drogen und Arzneistoffe*.
Springer, Berlin 2004. ISBN 35-402-1468-2.
- ³⁹ Jahodář, L. *Farmakobotanika: semenné rostliny*. Karolinum, Praha 2006.
ISBN 80-246-1225-9.
- ⁴⁰ Korbelář, J.; Endris, Z.; Krejča, J.: *Naše rostliny v lékařství*. Avicenum, 5., přeprac. vyd.,
Praha 1981. ISBN 73521-08/31; 08-092-81.
- ⁴¹ Hosnedl, V.; Mečiar, L.; Vašák, J.: *Rostlinná výroba*. Česká zemědělská univerzita,
Praha 1998. ISBN 80-213-0153-8.
- ⁴² Baranyk, P.: *Olejniny*. Profi Press, Praha 2010. ISBN 978-80-86726-38-0.
- ⁴³ Zehnálek, P.; Holubář, J.: *Přehledy odrůd hořčice bílé, hořčice sareptské, máku setého,
lnu olejného a kmínu kořeného*. ÚKZÚZ, Brno 2010. ISBN 978-80-7401-023-1.
- ⁴⁴ Jaroš, Z.: *Léčivé látky z rostlin*. Dona, České Budějovice 1992. ISBN 80-854-6304-0.
- ⁴⁵ *Český lékopis 2009*. Grada Publishing, Praha 2009. ISBN 978-802-4729-947.
- ⁴⁶ Mika, K.: *Fytoterapia pre lekárov*. Osveta, 2., dopl. vyd., Martin 1991.
ISBN 80-217-0349-0.
- ⁴⁷ Lüllmann, H.; Mohr, K.; Wehling, M.: *Farmakologie a toxikologie*. Grada, 2. vyd.,
Praha (2004). ISBN 80-247-0836-1.
- ⁴⁸ Hampl, F.; Rádl, S.; Paleček, J.: *Farmakochemie*. VŠCHT, 2. rozš. vyd., Praha (2007).
ISBN 978-80-7080-639-5.

- ⁴⁹ Fendrich, Z.: *Farmakologie pro farmaceuty III*. Karolinum, Praha 2007.
ISBN 978-80-246-1419-9.
- ⁵⁰ Doležal, M.: *Farmaceutická chemie léčiv působících na autonomní nervový systém*.
Univerzita Karlova, Praha 2009. ISBN 978-802-4616-339.
- ⁵¹ Prokeš, J.: *Základy toxikologie: obecná toxikologie a ekotoxikologie*. Galén, Praha 2005.
ISBN 80-726-2301-X.
- ⁵² Vašák, J.: *Mák*. Powerprint, Praha 2010. ISBN 978-809-0401-181.
- ⁵³ Stránská, I.; Skalický, M.; Novák J., aj.: *Ind. Crops Prod.* 41(4), 120-126 (2013).
- ⁵⁴ Steck, T. L.; Kant, J. A., v knize: *Methods in Enzymology* (Fleischer, S.; Packer, L., ed.),
sv. 37, kap. 16. Elsevier, Amsterdam 1974. ISBN: 978-0-12-181894-4.
- ⁵⁵ Ellman, G. L.; Courtney, K. D.; Andres, V.: *Biochem. Pharmacol.* 7(2), 88-95 (1961).
- ⁵⁶ Cahlíková, L.; Opletal, L.; Kurfürst, M., aj.: *Nat. Prod. Commun.* 5(11), 1751-1754
(2010).
- ⁵⁷ Rýdl, J.: Diplomová práce. Univerzita Karlova, Praha 2012.
- ⁵⁸ Rosiková, T.: Diplomová práce. Univerzita Karlova, Praha 2010.
- ⁵⁹ Filáková, I.: Diplomová práce. Univerzita Karlova, Praha 2010.
- ⁶⁰ Maelicke, A.; Schrattenholz, A.; Storch, A., et. al.: *J. Recept. Signal Transduction Res.*
15(1-4) 333-353 (1995).
- ⁶¹ Maelicke, A.; Albuquerque, E. X.: *Eur. J. Pharmacol.* 393(1-3) 165-170 (2000).
- ⁶² Motel, W. C.; Coop, A.; Cunningham, Ch. W.: *Mini-Rev. Med. Chem.* 13(3) 456-466
(2013).