

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

RIGORÓZNÍ P R Á C E

Biologická aktivita obsahových látek rostlin XIV.;
Vliv alkaloidů z *Chelidonium majus* L. na acetylcholinesterázu

Biological activity of plant metabolites XIV. Influence of alkaloids from
***Chelidonium majus* L. on acetylcholinesterase.**

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

Vedoucí katedry: Prof. RNDr. Luděk Jahodář, Csc.

Hradec Králové, 20. srpna 2007

Dagmar Kubincová

Děkuji panu doc. RNDr. Lubomíru Opletalovi, CSc. za odborné vedení, materiály, cenné rady a připomínky při vypracování mé diplomové práce. Dále děkuji panu Mgr. Danu Junovi, Ph.D. z Univerzity obrany v Brně, fakulty vojenského zdravotnictví v Hradci Králové za provedení testu vlivu mého alkaloidu na aktivitu acetylcholinesterasy a vypracování metodiky tohoto testu. Poděkovat bych také chtěla ostatním pracovníkům katedry farmaceutické botaniky a ekologie za vytvoření příjemného prostředí a vhodných podmínek k práci a jejich pomoc a ochotu při řešení problémů.

OBSAH

1.	ÚVOD	8
2.	CÍL PRÁCE	11
3.	TEORETICKÁ ČÁST	13
3.1.	ALZHEIMEROVA CHOROBA A JEJÍ TERAPIE	15
3.1.1.	Alzheimerova choroba	15
3.1.2.	Terapie AD	17
3.1.2.1.	<i>Inhibitory mozkových choliesteras</i>	17
3.1.2.2.	<i>Antagonisté NMDA- receptorů</i>	20
3.1.3.	Fytoterapie	20
3.1.3.1.	<i>Látky ovlivňující osud ACh a AChE</i>	21
3.1.3.2.	<i>Látky ovlivňující produkci amyloidu</i>	23
3.1.3.3.	<i>Inhibitory ACAT</i>	23
3.1.3.4.	<i>Neuroprotektiva</i>	23
3.1.3.5.	<i>Inhibitory prolylendopeptidasy (PEPI)</i>	23
3.2.	CHELIDONIUM MAJUS L. (VLAŠTOVIČNÍK VĚTŠÍ)	24
3.2.1.	Synonyma	25
3.2.2.	Systematika	25
3.2.3.	Botanický popis	25
3.2.3.1.	<i>Původ</i>	25
3.2.3.2.	<i>Popis rostliny</i>	25
3.2.4.	Ekologie	26
3.2.5.	Celkové rozšíření	26
3.2.6.	Rozšíření v ČR	27
3.3.	DROGY ZÍSKÁVANÉ Z CHELIDONIUM MAJUS L.	27
3.3.1.	Chelidonii radix (kořen vlaštovičníku většého)	27
3.3.2.	Chelidonii herba (nat' vlaštovičníku většého)	27

3.4.	OBSAHOVÉ LÁTKY <i>CHELIDONIUM MAJUS L.</i>	28
3.4.1.	Alkaloidy	28
3.4.1.1.	<i>Alkaloidy podle chemické struktury</i>	28
3.4.1.2.	<i>Alkaloidy kořene (<i>Chelidonii radix</i>)</i>	32
3.4.1.3.	<i>Alkaloidy nati (<i>Chelidonii herba</i>)</i>	32
3.4.1.4.	<i>Alkaloidy plodů (<i>Chelidonii fructus</i>)</i>	33
3.4.1.5.	<i>Alkaloidy semen (<i>Chelidonii semen</i>)</i>	33
3.4.2.	Ostatní obsahové látky	34
3.4.2.1.	<i>Rostlinné kyseliny</i>	34
3.4.2.2.	<i>Minoritní složky</i>	34
3.5.	BIOLOGICKÁ AKTIVITA OBSAHOVÝCH LÁTEK	35
3.5.1.	Inhibice cholinesterasové aktivity	35
3.6.	FARMAKOLOGICKÉ ÚČINKY	37
3.6.1.	Protinádorové a antivirové působení	37
3.6.2.	Hepatotropní a spasmolytické účinky	38
3.6.3.	Ostatní účinky	39
3.6.4.	Biologické účinky hlavních obsahových látek	39
3.6.4.1.	<i>Aktivita látek typu benzofenanthridinu</i>	39
3.6.4.2.	<i>Aktivita látek typu protoberberinu</i>	40
3.6.4.3.	<i>Aktivita látek typu protopinu</i>	41
3.6.4.4.	<i>Aktivita ostatních obsahových látek</i>	41
3.7.	VYUŽITÍ <i>CHELIDONIUM MAJUS L.</i>	42
4.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	43
4.1.	VŠEOBECNÉ POSTUPY	44
4.1.1.	Destilace a odpařování rozpouštědel	44
4.1.2.	Chromatografie	44
4.1.2.1.	<i>Tenkvrstvá chromatografie</i>	44
4.1.2.2.	<i>Sloupcová chromatografie</i>	44

4.2.	POTŘEBY A POMŮCKY	44
4.2.1.	Chemikálie	44
4.2.2.	Rozpouštědla	45
4.2.3.	Činidla	45
4.2.4.	Chromatografické adsorbenty	45
4.2.5.	Chromatografické soustavy	46
4.2.6.	Standardní látky	46
4.2.7.	Přístroje	46
4.3.	IZOLACE ALKOIDŮ	47
4.3.1.	Materiál	47
4.3.2.	Příprava extraktu a jeho čištění	47
4.3.3.	Příprava alkaloidního výtřepku A z primárního extraktu	48
4.3.4.	Čištění surového výtřepku A	48
4.3.5.	Příprava pseudokyanidů	48
4.3.6.	Separace výtřepku A po odstranění benzofenanthridinových basí	49
4.3.7.	Příprava fenolických alkaloidů z výtřepku A	49
4.3.8.	Příprava vyčištěného výtřepku A	49
4.3.9.	Příprava chloridů nerozpustných ve vodě z výtřepku A a alkaloidů z nich	49
4.3.10.	Příprava alkaloidů z chloridů rozpustných v chloroformu (AC)	50
4.3.11.	Příprava alkaloidů z chloridů nerozpustných v chloroformu (AD)	50
4.4.	STANOVENÍ ÚČINKU ALKLOIDU NA ERYTROCYTÁRNÍ AChE (IC₅₀)	55
4.4.1.	Materiál	55
4.4.2.	Podmínky měření	55
4.4.3.	Stanovení hodnot IC ₅₀	55
4.4.4.	Výsledky a jejich matematické zpracování	56

5. DISKUSE	57
6. SOUHRN	62
7. LITERATURA	64
ABSTRAKT	72

Zkratky

AcCoA	Acetylkoenzym A
ACAT	AcetylkoenzymA-cholesterol acyltransferasa
AD	Alzheimerova choroba
ACh	Acetylcholin
AChE	Acetylcholinesterasa
ATP	Adenosintrifosfát
BuChE	Butyrylcholinesterasa
CAT	Cholinacetyltransferasa
CNS	Centrální nervová soustava
COX-2	Cyklooxygenasa-2
CT	Počítačová tomografie
DTNB	5,5'-Ditionbis(2-nitrobenzoová) kyselina
EBM	Medicína založená na důkazech
GIT	Gastrointestinální trakt
HPLC	Vysokokapacitní kapalinová chromatografie
Hup A	Huperzin A
IC ₅₀	Inhibiční koncentrace 50 % enzymu
ICP	Inductively coupled plasma
IgG	Imunoglobulin G
IL-1b	Interleukin-1b
IL-6	Interleukin-6
iNOS	Induktibilní NO- synthasa
KBA	Kvartérní benzo[c]fenanthridinové alkaloidy
LD ₅₀	Letální dávka u 50 % jedinců

5-, 12- LOX	5-, 12- Lipooxygenasa
LPS	Lipopolysacharid
MRI	Magnetická rezonance
MS	Hmotnostní spektrometrie
NGF	Nervový růstový faktor
NMDA-receptor	N-methyl-D-aspártátový receptor
NO	Oxid dusnatý
PAF	Destičkový aktivační faktor
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
PEP	Serinové peptidasy
PET	Pozitronová emisní tomografie
Pro	Protopin
SFE	Superkritická fluidní extrakce
TNF α	Tumor nekrotizující faktor alfa
TRH	Thyreotropin-releasing hormon

1. ÚVOD

V posledních 50ti letech stoupá počet onemocnění, které byly dříve považovány za ojedinělé až vzácné. Za tento trend je ve velké míře odpovědný rozvoj zdravotnictví a vědeckých poznatků na poli výzkumu chorob, jejich podstaty a léčby. Zvyšuje se průměrný věk obyvatelstva, přežívají lidé dříve nevléčitelně nemocní. Tu právě dostávají prostor onemocnění, napadající člověka, který je zmožen vysokým pracovním tempem, neustálým shonem, a stresem, se špatnou životosprávou a často minimálním pohybem. U člověka žijícího v civilizaci se ve větší míře vyskytuje stres, svalové napětí, špatný krevní oběh, nervozita, bolesti hlavy a páteře, špatné trávení a bolesti žaludku, celková únava.

K civilizačním chorobám patří řada zdánlivě nesouvisejících nemocí, jsou to např.: cukrovka, obezita, vysoký krevní tlak, ateroskleróza a jiná kardiovaskulární onemocnění, zhoubné nádorové bujení, některé vývojové vady nervového systému novorozenců, deprese, chronický únavový syndrom, revmatická onemocnění kloubů. V neposlední řadě se k civilizačním chorobám řadí i demence. Nejčastější formou demence je Alzheimerova choroba, která se řadí mezi neurodegenerativní onemocnění.

Neurodegenerativní choroby postihují centrální i periferní nervový systém, přičemž dochází k předčasnému zániku nebo degeneraci nervových buněk. K neurodegenerativním onemocněním se řadí:¹

Parkinsonova nemoc: prevalence Parkinsonovy nemoci se odhaduje asi na 160/100 000 a incidence na 20/100 000 obyvatel. Tyto hodnoty stoupají s věkem, nad 65 let je prevalence už 1 000/100 000 obyvatel. V České republice se odhaduje počet nemocných na 10 000 - 15 000.² Parkinsonova nemoc je způsobena nedostatkem dopaminu, a tedy relativní převahou acetylcholinové stimulace. Charakteristické znaky této nemoci jsou: svalová ztuhlost, zpomalení pohybů a třes, zejména horních končetin. Pacienti při chůzi dělají drobné krůčky a jsou nestabilní v postoji, později hrozí i častější pády. Dále se přidávají i psychické komplikace, jako jsou psychózy, deprese, demence. V současné době je nemoc nevléčitelná, existuje však celá řada léků, které příznivě ovlivňují příznaky onemocnění. Lékem volby je L-DOPA, podává se spolu s inhibitory DOPA-dekarboxylasy v různých kombinacích.

Amyotrofická laterální skleróza (ALS), kde dochází k zániku centrálního i periferního (míšního) motoneuronu, s postupným oslabením svalstva končetin, polykacího reflexu. Čítí i intelekt jsou ale netknuty.

Dyskinetické syndromy jsou poruchy extrapyramidového systému, charakterizované abnormálními pohyby hlavy, končetin a trupu, vymykající se volní kontrole. Hlavní typy představují: Huntingtonova chorea, myoklonus (svalové záškuby), třes (esenciální, při Parkinsonově chorobě), blefarospasmus, torticollis.

Alzheimerova nemoc (AD): Alzheimerova choroba je nejčastěji se vyskytující neurodegenerativní choroba na světě. Patří mezi civilizační onemocnění, více je postiženo obyvatelstvo rozvojových zemí. Je to onemocnění projevující se ztrátou cholinergních neuronu a postupnou degenerací nervových funkcí. Existuje více názorů na to, čím je nemoc způsobena, dle toho se v praxi užívají různé léčebné postupy.

Prvními příznaky Alzheimerovy choroby bývají zpravidla poruchy paměti, řeči, zhoršená orientace v prostoru a čase. Při rozvoji nemoci můžeme u člověka sledovat problémy, které mu nedovolí vykonávat běžné každodenní činnosti. Postižený není schopen číst, psát, počítat, objevují se poruchy chování, bludy a halucinace. Nemoc se postupně zhoršuje až člověk ztratí všechny schopnosti potřebné k soběstačnosti a je plně závislý na okolí.

Předpokládá se, že stěžejní roli při tomto onemocnění hrají cholinesterasy (acetylcholinesterasa a butyrylcholinesterasa), enzymy rozkládající acetylcholin v neuronové štěrbině. Jednou z velmi perspektivních cest léčby je tedy ovlivnění aktivity těchto enzymů ve smyslu jejich inhibice a tím prodloužení životnosti acetylcholinu.

Už v dřívějších dobách empirické terapie přírodními léčivy byly pozorovány účinky rostlinných složek na lidský organismus. V r. 1813 byla skupina látek obsahujících dusíkový atom označena jako alkaloidy. Jejich užití mělo za následek projevy toxicity.³ Využívání přírodních zdrojů, včetně výzkumu účinku léčivých rostlin zaznamenalo v poslední době značný rozvoj. I tyto potenciální nová léčiva (typu alkaloidů) jsou podrobovány širokému preklinickému a klinickému výzkumu. Velmi důležitou roli zde hrají toxikologické testy, které mají za cíl předpovědět terapeutický účinek a toxicitu potenciálního léčiva pro použití u člověka.⁴

Na katedře farmaceutické botaniky a ekologie probíhá výzkum v oblasti přírodních látek. Velká pozornost je věnována izolaci látek potenciálně účinných v inhibici acetylcholinesterasy. Studují se i rostliny z čeledi Papaveraceae, Fumariaceae. Jednou z rostlin z čeledi Papaveraceae o které je známo, že její obsahové látky ovlivňují acetylcholinesterasu, je *Chelidonium majus* L. V další fázi se pracovníci katedry podílejí i na testování inhibičních účinků přírodních látek *in vivo* (na homogenátu z mozkové tkáně) ve spolupráci s fakultou vojenského zdravotnictví v Hradci Králové, Univerzity obrany v Brně.

2. CÍL PRÁCE

Cílem mé diplomové práce bylo společně s ostatními diplomantkami (Šárkou Brožovou, Janou Nagyovou a Evou Vítkovou):

1. provést extrakci 41,8 kg suché nati s kořeny pomocí perkolátoru. Poté tento získaný primární extrakt vyčistit filtrací a následným oddestilováním rozpouštědla na vakuové odparce. Dále bylo nutno připravit sekvenčním postupem výtřepek A (získaný po předchozí alkalizaci primárního extraktu uhličitanem sodným a následným vytřepáním do diethyletheru). Z výtřepku A pak postupně oddělit pseudokyanidy benzofenanthridinových basí, fenolové base, chloridy alkaloidů rozpustných a nerozpustných ve vodě. Z chloridů nerozpustných ve vodě byly připraveny 2 frakce: chloridy rozpustné v chloroformu a chloridy nerozpustné v chloroformu,
2. zpracovat chloridy nerozpustné v chloroformu neutralizací této frakce 25% amoniakem na pH~9, vytřepáním do diethyletheru a následným odpařením organické vrstvy připravit směs protipinových alkaloidů. Pomocí sloupcové chromatografie pak izolovat jeden z alkaloidů v čisté formě a stanovit jeho základní fyzikálně-chemické charakteristiky,
3. podílet se na stanovení aktivity izolovaného alkaloidu vůči erytrocytární acetylcholinesterase *in vitro*.

3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1. ALZHEIMEROVA CHOROBA A JEJÍ TERAPIE

3.1.1. Alzheimerova choroba

Alzheimerova choroba je nejčastější příčinou demence. Je to jedna z nejzávažnějších chorob vůbec, pokud se týká snížení kvality života nemocných i následků, včetně úmrtnosti a ekonomické zátěže.⁵

Alzheimerova choroba je primárně degenerativní onemocnění mozku. Projevuje se především poruchami paměti a intelektu. Představuje asi 50-60 % všech demencí. Začíná nenápadně a zvolna progreduje. Prvními příznaky jsou poruchy učení, paměti, řeči, ztráta schopnosti řešit běžné denní úkoly, zhoršená orientace v čase a prostoru, změny osobnosti, nálady, chování. Stav se postupně zhoršuje, až dochází k naprosté ztrátě soběstačnosti a plné závislosti na okolí.⁶

Alzheimerova choroba vzniká především u lidí staršího věku. Onemocnění začíná mezi 50. - 70. rokem života s nejčastějším začátkem kolem 60 let věku. Do 60 let se v literatuře hovoří o Alzheimerově chorobě, po 60. roce o senilní demenci Alzheimerova typu. Ve skupině 65letých je postiženo zhruba 2-3 % populace, každých 5 let se toto procento zdvojnásobuje. Ve věku 80 let je postižena asi polovina lidí. Onemocnění začíná mezi 50.-70. rokem života - mluvíme o senilní demenci. Existují ale i vzácnější formy s časným začátkem vzniku, např. již kolem 40. - 50. roku, pak se jedná o presenilní demenci Alzheimerova typu. V současné době se odhaduje, že je ve světě kolem 20 miliónů lidí, trpících Alzheimerovou chorobou. V České republice se počet postižených odhaduje na cca 80 000.⁶

Dodnes nejsou přesné příčiny vzniku Alzheimerovy choroby známy. Kromě věku jsou prokázány rizikovými faktory vývoje AD genetická zátěž a nosičství alely ApoE e4. Dále existují faktory, které zvyšují riziko výskytu Alzheimerovy choroby a to: věk, ženské pohlaví, dědičnost, postižení Downovým syndromem, hypertenze, časté pády a údery, pití alkoholu, nízký stupeň dosaženého vzdělání, příjem hliníku. Možnými - diskutovanými - ochrannými faktory jsou příjem nesteroidních antirevmatik, postmenopauzální terapie estrogeny a kouření (jehož rizika pochopitelně znevažují míru ochrany proti AD).

AD se projevuje ve 3 stádiích: 1.stádium je mírná forma (lehká demence) trvající 2-4 roky, pacient často ztrácí věci, zabloudí na známých místech, dochází ke změnám osobnosti, podezíravosti, dezorientaci a obtížnému hledání slov, mohou se projevit i první známky deprese. 2. stádium je forma středně těžká trvající 5-10 let, zhoršují se mentální funkce, dochází k výrazným výpadkům paměti, poruchám chování, nesnášenlivosti, hašteřivosti,

zhoršení řečové schopnosti a halucinacím. Tento stav vyžaduje trvalý dohled. 3. stádium už je těžkou formou, která trvá 1-3 roky, kdy je pacient plně závislý na pečovateli, dochází k rozkladu celé osobnosti, člověk není schopen poznat ani členy rodiny, trpí inkontinencí, poruchami v příjmu potravy, má sklon k podvýživě, infekcím a proleženinám.

Etiologie AD je neznámá. Klinicky se AD diagnostikuje obtížně, na základě sledování kognitivních funkcí a změn v chování. K odlišení od jiných typů demence se začínají používat moderní zobrazovací metody (CT, MR, PET) a sledování biochemických markerů. Histopatologické změny vzniklé v mozku pacientů s AD jsou prokazatelné většinou až *post mortem* a patří k nim:

- extracelulární beta-amyloidní plaky a intraneuronální neurofibrilární uzlíky,
- snížené množství acetylcholinu (ACh) a cholinacetyltransferasy (CAT),
- změny vyvolané nadměrnou tvorbou reaktivních forem kyslíku (ROS) a oxidačním stresem.

Molekulární mechanismy vedoucí k těmto změnám jsou ve velké míře objasněny, ale vzájemné vztahy mezi nimi nikoliv.⁷

U familiárního typu Alzheimerovy choroby (asi 10 % onemocnění) se vyskytuje mutace v genu pro prekurzorový protein beta-amyloidu, a to buď presenilin 1, nebo presenilin 2 (geny na chromozomech 21, 14, popřípadě 1). Mutace vedou k produkci peptidu beta-amyloidu, který se hromadí v mozku ve formě plaků. Kromě nahromaděného beta-amyloidu však uvnitř neuronu vždy nacházíme smotek proteinu tau. Mutace na 21. chromozomu u AD nabádá k úvahám o genetické příbuznosti s Downovým syndromem (trisomie 21. chromozomu). Jde o systémové postižení celého organismu, nikoliv jen mozku. U Alzheimerovy demence se nachází řada abnormit ve stavbě erytrocytů, trombocytů, leukocytů, ale i fibroblastů. Zatím se nepodařilo prokázat žádný externí agens typu toxinu nebo viru, který by Alzheimerovu demenci působil.

Vlivem různých faktorů, jako jsou zánětlivé změny, toxiny, faktory životního prostředí, defektní gen pro amyloidní prekurzorový protein (presenilin 1 a 2) a tím pádem patologické štěpení β -amyloidu na toxické 42-AK. Tyto vlákna se spolu s vlákny Ab-40 a např. i složkou komplementu c1q kupí a agregují v intersticiální tekutině mozku jako difúzní plaky. Na přítomnost těchto plaků reaguje imunitní systém zánětlivou odpovědí- aktivují se mikroglie a astrocyty, což vede ke zvýšenému uvolňování NO, prostaglandinů, excitotoxinů, TNF- α a dalších cytokinů. Probíhající akutní zánětlivá reakce v neuronu může být urychlena i nedostatkem NGF. Vlákna amyloidu navíc reagují s receptory na povrchu buněk. Ty pak ve

zvýšené míře tvoří kyslíkové radikály, které způsobují depolarizaci buněčné membrány a tím zvýšení hladiny Ca^{2+} uvnitř buňky. Zvýšená koncentrace vápníkových iontů spolu s kyslíkovými radikály způsobí oxidativní stres a následně smrt buňky. Zánik neuronu vede ke snížené tvorbě a tím pádem k nedostatku neurotransmiterů v mozku. Při Alzheimerově chorobě se to týká acetylcholinu - v mozku se snižuje koncentrace CAT (enzym potřebný k tvorbě ACh), dále také klesají koncentrace ostatních neurotransmiterů, např. noradrenalinu, somatotropinu, serotoninu, neuropeptidu Y a substance P.⁸

3.1.2. Terapie AD

V současné době ještě není etiologie AD zcela objasněna, proto se v terapii vychází ze známých etiologických řetězců. Nejrozšířenějším typem léčby je farmakoterapie, zaměřená především na zlepšení výkonných a paměťových funkcí. V současné době jsou založeny na důkazech (EBM) dva farmakoterapeutické přístupy:

- užití inhibitorů cholinesteras,
- užití parciálních nekompetitivních inhibitorů NMDA receptorů excitačních aminokyselin.^{3,9}

3.1.2.1. *Inhibitory mozkových cholinesteras*

Užití inhibitorů mozkových cholinesteras je nejčastěji užívaný postup v terapii lehkých a středně závažných forem AD. Tyto látky patří do skupiny kognitiv, protože zlepšují pozornost a paměťové schopnosti především svým cholinomimetickým působením, případně dalšími účinky.¹⁰

U Alzheimerovy nemoci je porušena především presynaptická část neuronu a tím je sníženo uvolnění ACh z těchto zakončení. Pre- i postsynaptické muskarinové i nikotinové receptory zůstávají však relativně dobře zachovány. Uvolnění ACh je usnadňováno stimulací nikotinových presynaptických receptorů.¹¹ Dále je sníženo množství enzymu CAT, syntetizujícího ACh z cholinu a acetyl-koenzymu A.¹²

Acetylcholinesterasy se vyskytují v několika různých formách; v mozku zdravého člověka převládá tetramerní forma G 4, pouze v malém množství se vyskytuje monomerní forma G 1. V mozku člověka s AD roste podíl G 1 a klesá množství G 4.¹³ Navíc v mozku s AD se uplatňuje i další enzym, za normálních podmínek minoritní: butyrylcholinesterasa. Ta je totiž produkována aktivovanými gliemi v oblastech neuritových plaků a podílí se na

odbourávání ACh. V případě mozku s AD se podíl molekul BuChE progresivně zvyšuje, zatímco aktivita (a množství) AChE zůstává nezměněna, resp. se snižuje.^{9,14}

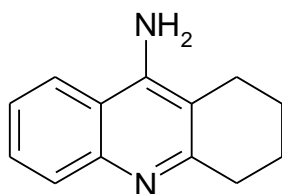
AChE a BuChE jsou odlišeny geneticky, strukturně a také reakční kinetikou. V lidském mozku se BuChE nachází v neuronech, gliových buňkách, stejně tak jako v neuritovém plaku a tangles u pacientů s AD. Zatímco acetylcholinová aktivita snižuje progresivitu AD v mozku nemocných pacientů, BuChE aktivita může zvýšit progresivitu, záleží však na dalších faktorech. Na základě různých modelů (a u pacientů s pokročilou AD) se však zdá, že BuChE může určitou měrou nahradit AChE při hydrolýze mozkového acetylcholinu.¹⁵ BuChE se ukázala novým cílem v terapii AD.¹⁴

Inhibitory acetylcholinesteras jsou chemicky nestejnorodou skupinou. Jednotlivé inhibitory se liší typem inhibice, mírou inhibice, a také tím, zda kromě AChE odbourávají ve větší míře i BuChE. V současnosti je spektrum klinicky použitelných látek relativně úzké.^{16,17,18} Liší se selektivitou inhibice jednotlivých cholinesteras. Např. donepezil a ikopenezil jsou selektivní vůči AChE, takrin a heptylfysostigmin mají vysokou selektivitu k BuChE; všechny 4 sloučeniny zvyšují hladinu ACh v myším mozku. Donepezil a ikopenezil mají výhodnější terapeutický index než neselektivní inhibitory takrin a heptylfysostigmin (z hlediska posouzení centrálních a periferních účinků).¹⁶ Atraktivní skupinou látek se zdají být léčiva s duálním účinkem - inhibitory AChE (např. galanthamin) a serotoninové transportery, např.^{19,20}

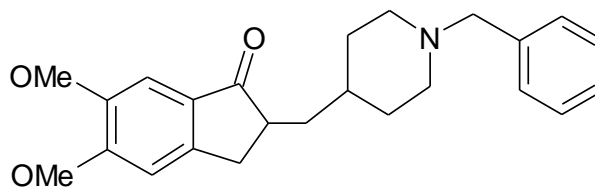
V České republice jsou prakticky používané 3 inhibitory AChE: donepezil, rivastigmin, galanthamin.⁷

Inhibitory AChE se dělí podle typu inhibice:

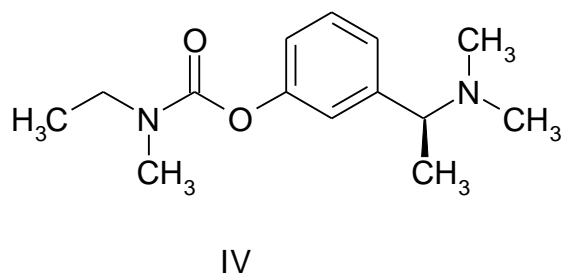
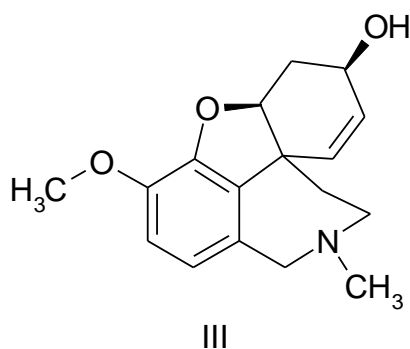
- reverzibilní AChE inhibitory - **takrin** (I) (Cognex[®]), **donepezil** (II) (Aricept[®]), **galanthamin** (III) (Reminyl[®])
- pseudoirreverzibilní AChE inhibitory - **rivastigmin** (IV) (Exelon[®])
- irreverzibilní - metrifonát (dichlorvos), který se v praxi neužívá⁷



I



II



Galanthamin (Reminyl[®]) – je terciární alkaloidní acetylcholinesterasový inhibitor. Je uznáván v mnoha zemích jako prostředek k symptomatické léčbě senilní demence Alzheimerova typu. Získává se z hlíz a cibulí rostlin čeledi Amaryllidaceae a byl dlouho užíván v anestézii ke zrušení neuromuskulární paralýzy vyvolané tubokurarinem²¹. Galanthamin je reverzibilní selektivní kompetitivní inhibitor AChE, v mnohem menší míře inhibuje i činnost BuChE. Navíc stimuluje pre- i postsynaptické nikotinové receptory, nejspíš vazbou na allosterické místo receptoru. Aktivace presynaptických nikotinových receptorů vede ke zvýšenému uvolňování ACh, ale i glutamátu, serotoninu a GABA. Dlouhodobé podávání galanthaminu navozuje zvýšení denzity nikotinových receptorů v určitých oblastech mozku, které se podílejí na paměti a procesu učení²². Do jaké míry je za klinický účinek galanthaminu odpovědný nikotinový efekt není jisté, je nutné provést další výzkumy.²³ V současnosti je hlavní uplatnění galanthaminu v terapii Alzheimerovy choroby (AD). Zlepšuje kognitivní, funkční i behaviorální symptomy této choroby. Výhodou galanthaminu proti ostatním inhibitorům AChE používaných v terapii AD je tedy jednak jeho schopnost interagovat s nikotinovými receptory, a také selektivně inhibovat AChE bez ovlivnění plazmatické butyrylcholinesterasy. Tato selektivita galanthaminu k AChE může snižovat riziko nežádoucích účinků při porovnání galanthaminu s neselektivními inhibitory cholinesteras (např. fysostigmin nebo takrin). Byly vyvinuty i četné analogy galanthaminu, lišící se velikostí inhibiční aktivity vůči AChE.²⁴ Po p.o. podání se galanthamin rychle vstřebává, T_{max} dosahuje za 52 minut, eliminační poločas je 5,7 hod. Účinnost galanthaminu v léčbě AD byla prokázána řadou rozsáhlých klinických zkoušek.²⁵

Rivastigmin (Exelon[®]) – je selektivní pseudoreverzibilní⁷ nekompetitivní inhibitor acetylcholinesterázy II. generace. Podstatně méně blokuje butyrylcholinesterázu. Jeho afinita k BuChE je 10krát nižší než k AChE.²⁶ Rivastigmin je inhibitor AChE a BuChE

karbamátového typu - kovalentní vazbou na cílový enzym vzniká komplex enzym-inhibitor, který je posléze cholinesterasou pomalu rozkládán na dekarbamoylovaný metabolit. Je vysoce specifický k monomerní formě AChE a též allostericky ovlivňuje nikotinové receptory. Rivastigmin rovněž stimuluje aktivitu cholinacetyltransferasy, zvyšující syntézu acetylcholinu. Byl velmi dobře snášen, nejčastějšími nežádoucími účinky byly gastrointestinální obtíže, závratě, cefalgie, únava, somnolence nebo insomnie a agitovanost, ponejvíce v úvodní titrační fázi léčby. Rivastigmin je zatížen minimálním rizikem interakcí s jinými léky. Při těžší intoxikaci je antidotem atropin.

Donepezil (Aricept®) je selektivní, reversibilní inhibitor AChE. Je 1 000krát účinnější inhibitor AChE než inhibitor BuChE (která se vyskytuje hlavně mimo CNS). Klinické studie prokázaly, že podání donepezilu vede k inhibici AChE v erytrocytech o 63,6 % (pro dávku 5 mg) a 77,3 % (pro 10 mg/den). Inhibiční aktivita donepezilu silně koreluje se změnami v ADAS-cog, což je jeden z hodnotících testů AD (měřítko kognitivních funkcí). Aricept způsobil na dávce závislé signifikantní statistické zvýšení procenta nemocných, kteří byli vyhodnoceni jako respondéři na léčbu.²⁵

3.1.2.2. Antagonisté NMDA- receptorů

U AD dochází k nadměrnému uvolnění excitačních aminokyselin a tím k nadměrné excitaci NMDA receptorů (excitotoxicita). Nekompetitivní antagonisté NMDA-glutamátových receptorů potlačují neurotoxicitu excitačních aminokyselin a tím chrání kortikální neurony a neurony v retinálních gangliích. Zatím jedinou klinicky používanou látkou z této skupiny je **memantin** (Ebixa®). Memantin je registrován v některých evropských zemích (v České republice pod názvem Akatinol); např. v Německu je již 10 let registrován pro léčení „syndromu demence“ a je do něj vkládána značná naděje. Kombinace memantin+AChE inhibitory přináší v léčbě významný profit.⁹

3.1.3. Fytoterapie AD

V současné době je ve farmakoterapii AD perspektivní užití některých přírodních látek. Velmi významnou roli hraje studium přírodních látek proto, že struktura těchto poměrně složitých molekul významně modifikuje účinek nejen ve smyslu vlastního efektu, ale především vedlejších účinků. Inhibice AChE byla pozorována např. u obsahových látek z Tea Tree Oil²⁷, steroidních alkaloidů ze *Sarcococca saligna* (Buxaceae)²⁸, α -onocerinu

z *Lycopodium clavatum* (Lycopodiaceae).²⁹ Velmi významné je však studium (resp. použití) alkaloidů především isochinolinového typu vyskytujících se v různých zdrojích: zástupcích čeledi Amaryllidaceae: galanthaminu a jeho současných derivátů^{30,31,32,33} a chinolinové báze z čeledi Lycopodiaceae, jako je huperzin A a jeho deriváty^{34,35,36,37}. U některých přírodních látek byla pozorována spřažená aktivita: inhibují jak AChE tak BuChE.^{28,38} Při syntéze nových léčiv tohoto typu je velmi zásadní stereochemie - terapeuticky významně aktivní jsou pouze některé stereoizomery³⁹ (a tento stav se uplatňuje i z hlediska ovlivnění AChE a BuChE, jak je to vidět např. u stereoizomerů huperzinu A)³⁸. Tento faktor musí být zohledněn, protože jinak dochází v řadě případů k výraznému vzestupu nežádoucích účinků.

3.1.3.1. Látky ovlivňující osud ACh a AChE

- ◆ Stimulátory nikotinových receptorů (nAChRs): **galanthamin**, **arekolin** a některé jeho analogy (provedeny studie *in vitro*)
- ◆ Antagonisté muskarinových M₂ receptorů: **himbacin** (*Galbulimima baccata*, Himantandraceae) je vysoce selektivní inhibitor M₂ receptorů, způsobuje neuronovou excitaci.
- ◆ Látky jiného působení: **N-acetyl-L-karnitin** usnadňuje vstup prekurzoru ACh do neuronu, tím dochází ke zvýšené syntéze ACh. Pozitivně ovlivňuje nervový růstový faktor, působí proti úbytku glukokortikoidních receptorů (způsobeném stářím), zlepšuje pozornost a zvyšuje bdělost. U familiární AD výrazně zpomaluje progresi choroby.
- ◆ Inhibitory AChE:

a) **Galanthamin** (*Galanthus woronovii*, *Narcissus* sp.) je duální inhibitor, přičemž na BuChE má mnohem slabší efekt než na AChE. Je pacienty dobře snášen, vyskytují se určité periferní cholinergní účinky (nauzea, zvracení, průjem). Vykazuje 4x vyšší aktivitu než alkaloidy lykorinového typu a je podstatně účinnější než takrin. Deriváty galanthaminu jsou selektivní inhibitory AChE v centrální nervové soustavě, z čehož plyne i výrazně nižší výskyt některých vedlejších účinků. Mezi deriváty galanthaminu patří: karbamáty 6-demethylgalanthaminu (DMG) - jsou 1000krát účinnější než galanthamin v inhibici AChEI; estery 6-demethylgalanthaminu, které jsou transportní formou léčiva 6-DMG (acetát a oktanoát) vykazují selektivní inhibici AChE v centrální nervové soustavě.⁷

- b) **Huperzin** (Cerebra[®]) (*Huperzia serrata*, Huperziaceae) je dlouhodobě působící inhibitor AChE, vykazuje neuroprotektivní aktivitu a kognitivní efekt. Splňuje ideální kritéria pro symptomatickou léčbu Alzheimerovy nemoci. Byly izolovány 2 optické izomery: (-)-HupA je přibližně 38krát účinnější než (+)-HupA; LD₅₀ je 4,6 mg p. o., 3,0 mg s.c.(myš), aplikace 0,1 mg p. o. (člověk). Vypracována je syntéza racemátu i přírodního (-)-HupA.²⁴
- c) **Dekrusinol** (*Angelica gigas*, Apiaceae) vykazuje vysokou inhibiční aktivitu vůči AChE *in vitro*.²⁴
- d) **Ursolová kyselina** (*Majorana hortensis*, *Rosmarinus officinalis*, *Salvia officinalis*, Lamiaceae) má vysoký inhibiční efekt vůči AChE.²⁴
- e) **Dehydroevodiamin** (*Evodia rutaecarpa*, Rutaceae) inhibuje AChE a má antiamnestický efekt. IC₅₀ je 37,8.10⁻³ M. Je silnější než takrin. Navíc působí ještě zvýšení vasodilatace.^{24,40}
- f) **Saligenamid C** (*Sarcococca saligna*, Buxaceae) výrazněji zasahuje do BuChE aktivity.²⁴
- g) **Zeatin** (*Fiatoua villosa*, Orchideaceae, *Zea mays*, Poaceae) je obsažen v hospodářských rostlinách. Zeatin je přírodní cytokin, široce rozšířen. IC₅₀ je 1,9.10⁻⁴ M. Navíc také inhibuje tvorbu β-amyloidu.²⁴
- h) **(+)-Homomoenjodaramin, moenjodaramin** (*Buxus hyrcana*, Buxaceae).²⁴
- i) **Cykloprotobuxin C, Cyklovirobuxein A, Cykolmikrofilin A** (*Buxus papillosa*, Buxaceae).²⁴
- i) **α-Viniferin** (*Caragana chamiague*, Fabaceae) je inhibitor AChE reversibilní, nekompetitivní a vykazuje specifickou aktivitu.^{24,41}
- j) **α-Onocerin** (*Ononis spinosa*, Fabaceae).²⁴
- k) **Cynatrosidy A, B, C** (*Cynanchum atratum*, Ranunculaceae) vykazují signifikantní nhibici AChE. Patří sem: A-β-D-oleandropyranosid,

B-cymaropyranosyl-digitoxopyranosyl- β -D-oleandropyranosid,
C- cymaropyranosyl-digitoxopyranosyl- α -D-oleandropyranosid.²⁴

3.1.3.2. Látky ovlivňující produkci amyloidu

◆ **Tanshinon I** (*Salvia miltiorrhiza*, Lamiaceae).²⁴

◆ **Zeatin** viz. výše

3.1.3.3. Inhibitory ACAT

ACAT je integrovaný membránový enzym, lokalizovaný v endoplazmatickém retikulu. Katalyzuje vznik esterů z cholesterolu a AcCoA. Inhibice ACAT má za následek pokles hladin LDL-cholesterolu, a tím přímý antiaterogenní účinek⁴². Inhibitor ACAT je:

◆ **Pyripyropen A** (*Aspergillus fumigatus*).²⁴

3.1.3.4. Neuroprotektiva

◆ **Ginkgolid B** (BN-520121, *Ginkgo biloba*, Ginkgoaceae; Ipsen-Beaufour) je antagonist PAF, používaný také k léčbě septického šoku. Chrání neurony při mozkové hypoxii (potřeba nižší tenze kyslíku) a snižuje viskozitu krve. V současnosti je reálná i totální syntéza této molekuly.²⁴

3.1.3.5. Inhibitory prolylendopeptidasy (PEPI)

PEP (serinové peptidasy) jsou široce rozšířeny v různých tkáních, také v lidském mozku, kde hydrolyzují neuropeptidy s obsahem prolinu, které se podílejí na učení a paměťových procesech (vasopresin, substance P, TRH). Zvýšená hladina těchto peptidas je pozorována u neurodegenerativních chorob, jako je výrazná deprese, mánie, demence Alzheimerova typu. PEP jsou patrně odpovědné za metabolismus C-terminální části amyloidního prekurzorového proteinu, zodpovědného za degeneraci neuronů. Dále PEP také navozuje imunoreaktivitu, důsledkem je pak rychlejší stárnutí mozku. Inhibitory PEP mají antiamnestický efekt.

◆ **Fenanthrenové deriváty** (*Salvia deserta*, Lamiaceae).²⁴

Jednou z rostlin, která je v současnosti zkoumána pro své anticholinesterasové účinky je *Chelidonium majus* L. (Papaveraceae).

3.2. *CHELIDONIUM MAJUS* L. (VLAŠTOVIČNÍK VĚTŠÍ)



Obrázek 1: *Chelidonium majus* L.⁴³



Obrázek 2: *Chelidonium majus* L., květ⁴³

3.2.1. Synonyma

Chelidonium grandiflorum DC.; *Chelidonium haematodes* MOENCH;
Chelidonium japonicum THUNB.; *Chelidonium laciniatum* MILL.; *Chelidonium luteum*
GILIB.; *Chelidonium maius* L.; *Chelidonium murale* REN.; *Chelidonium ruderale* SALISB.;
Chelidonium umbelliferum STOCK.⁴⁴

3.2.2. Systematika

Chelidonium majus L. (vlaštovičník větší) je rostlinný druh z čeledi Papaveraceae (makovité).⁴⁵

3.2.3. Botanický popis

3.2.3.1. Původ

Vlaštovičník větší (*Chelidonium majus*) je druh z čeledi makovitých (*Papaveraceae*). Běžně rozšířen po celé Evropě, ve středomoří a v mírných až subarktických oblastech Asie. Zavlečen byl i do Severní Ameriky.⁴⁵

3.2.3.2. Popis rostliny

Je to vytrvalá bylina, 30-110 cm vysoká, s oblými, větvenými, roztroušeně chlupatými lodyhami.^{45,46} Má krátký, rozvětvený oddenek. Celá rostlina je protkána mléčnicemi se žlutým až oranžovým mlékem. Listy střídavé, přizemní i stonkové jednotvaré, dolní řapíkaté, horní přisedlé, přetrhovaně zpeřené.⁴⁵ Lístky vejčité, laločnatě vroubkované, terminální často trojlaločný. Listy na svrchní straně modrozelené, lysé, na spodní straně světlejší, zvláště na žilnatině roztroušeně chlupaté.⁴⁶ Květy stopkaté, v chudém okolíku (2-6 květů). Jsou oboupohlavné, zdánlivě pravidelné, žluté, 1-2 cm v průměru.⁴⁵ Kalich prchavý, korunní lístky 4, celokrajné, tyčinky žluté s kyjovitě ztlustlými nitkami. Plody jsou 3-8 cm dlouhé tobolky, kostrbaté, čárkovité, otvírají se od base k vrcholku dvěma chlopněmi.⁴⁶ Semena až 1,5 mm dlouhá, vejčitá s hřebenitým přívěskem, černá. Kvete v květnu až září.⁴⁵ Jde o jediný druh se 3-4 poddruhy, dle některé starší literatury považovanými za samostatné druhy⁴⁴:

- var. *crenatum* FRIES: korunní lístky vroubkované; blizna dlouhá, otáčivá; u této variety musíme vzít v úvahu křížení mezi var. *maius* a var. *tenuifolium*

- var. *fumariifolium* (DC.) KOCH (syn. *Chelidonium laciniatum* MILL. var. *fumariaefolium* DC.): menšího vzrůstu, listy se zkrácenými řapíky

- var. *maius* listy poměrně pevné, čepele jen málo řezané, vroubkované, matné, všechny směřující dolů, nanejvýš ty nejspodnější postavené. Korunní lístky celokrajné. Podle toho může být *Chelidonium* označeno: - f. *grandiflorum* WEIN; - f. *latipelatum* MOLL.; - f. *loehrianum* (ORTH) MGF. (syn. *Chelidonium majus* L. var. *laciniatum* (MILL.) KOCH f. *serrata* (ORTH) FAST, *Chelidonium majus* L. var. *loehriana* ORTH, *Chelidonium majus* var. *serrata* ORTH); - f. *pleniflorum* CHRISTIANSEN (Syn. *Chelidonium majus* L. var. *pleniflorum* LAW.); - f. *sempiternum* DOMIN. Rozdělení var. *maius* do různých forem přesto zůstává sporné.⁴⁴

- var. *tenuiflorum* LILJ. (syn. *Chelidonium laciniatum* MILL., *Chelidonium majus* L. var. *laciniatum* (MILL.) KOCH, *Chelidonium majus* L. var. *quercifolium* T HUIILL)⁴⁶: rostliny s dřípenými listy a s dřípenými nebo vroubkovanými (vzácně jen špičatými) korunními lístky. U nás je tato varieta doložena pouze z botanických zahrad nebo zplanělá v jejich okolí. Odchytky ve vzrůstu, velikosti květů a odění stopek a kalichů mají nepatrnou taxonomickou hodnotu.⁴⁶

Také existují různé karyotypy: V Evropě a Asii jsou diploidní (mají 12 chromozomů- $2n=12$, ve východní Evropě $2n=10$, v Japonsku $2n=20$). V České republice se volně vyskytují rostliny diploidní ($2n=12$). V Polsku se vyskytuje i tetraploidní šlechtitelská odrůda, kdy $2n=24$. Tato kultura se nazývá *Chelidonium majus* L. cv. „Cynober“.⁴⁴

3.2.4. Ekologie

Vlaštovičnick roste na návsích, v zahradách a rumištích, na okrajích cest, v humózních hájích a sutích. Preferuje mírně zastíněné, vlhké a na dusík bohaté půdy.⁴⁶

3.2.5. Celkové rozšíření

Jižní a střední Evropa, jižní Skandinávie; mírné až subarktické pásmo Asie včetně Japonska a střední Číny. Byl zavlečen také do Severní Ameriky.⁴⁶

3.2.6. Rozšíření v ČR

Výskyt na teplých a vlhkých půdách obecně až roztroušeně, v oreofytiku vzácný. Těžiště výskytu v planárním (nížinný) a kolinním (pahorkatinný vegetační stupeň, 200 - 500 m nad mořem) stupni, vzácně zasahuje až do stupně submontánního (podhorský stupeň)-max. Krkonoše, Obří důl, 850 m.⁴⁶

3.3. DROGY ZÍSKÁVANÉ Z *CHELIDONIUM MAJUS* L.

3.3.1. *Chelidonii radix* (kořen vlašovičnicku většího)

- * Droga se získává sběrem volně rostoucích rostlin nebo sběrem rostlin pěstovaných. V Polsku se pěstují vysoce výnosné sazenice *Chelidonium majus* L. cv. „Cynober“.⁴⁴
- * Morfologická část se užívá sušená.

3.3.2. *Chelidonii herba* (nat' vlašovičnicku většího)

- Droga se získává sběrem volně rostoucích rostlin; v Polsku z pěstované šlechtěné odrůdy „Cynober“ .
- V současnosti se upřednostňuje používání sušené drogy (*Chelidonii herba*). Důležitý je fakt, že obsah alkaloidů může kolísat dle podmínek sušení. Vhodné je krátké zahřátí na 105 °C s následným sušením při pokojové teplotě, či při 60 °C. Zřetelně nižší obsah alkaloidů je získáván, pokud se suší jen při pokojové teplotě, či při 60 °C bez předchozího zahřátí na 105 °C. Základem pro tento poznatek je, že zahřátí přes 100 °C inaktivuje enzymy odbourávající alkaloidy.

Vedle podmínek sušení ovlivňuje obsah a spektrum alkaloidů i původ a vegetační perioda rostliny (nejvyšší obsah alkaloidů v rostlině je v létě, případně na podzim);⁴⁴ podmíněný je i provenienčně a geneticky - tetraploidy mají obsah asi o 50-60 % vyšší.⁴⁷

3.4. OBSAHOVÉ LÁTKY *CHELIDONIUM MAJUS* L.

3.4.1. Alkaloidy

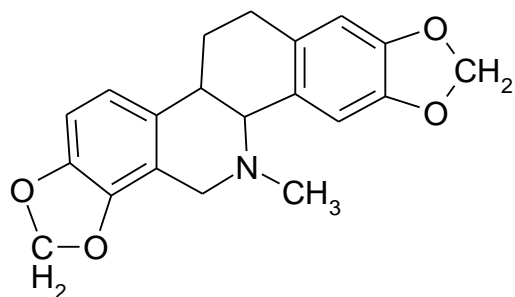
Alkaloidy jsou hlavní obsahové látky vlašovičníku. V rostlině jich bylo popsáno již více než 30. Z tohoto počtu jich 15 poprvé izoloval a převážně i strukturně určil Slavík.⁴⁴

3.4.1.1. Alkaloidy podle chemické struktury

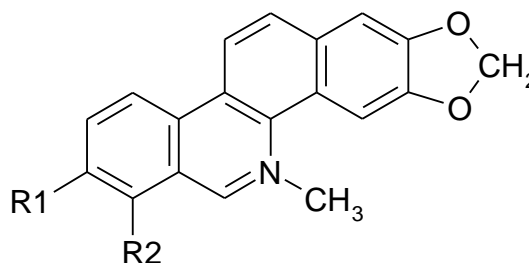
Dosud nalezené alkaloidy se dají rozdělit do následujících skupin podle struktury:⁴⁴

a) Benzofenanthridinový typ (α -nafthofenanthridinový typ): ve struktuře těchto alkaloidů je obsažen tetraisochinolinový kruhový systém (naftalenové jádro s navázanou isochinolinovou strukturou). Tato skupina se dá rozdělit na 2 podskupiny:

- **terciární** alkaloidy - obsahují terciární dusík (např. chelidonin (V), homochelidonin),
- **kvarterní** alkaloidy - obsahují kvarterní dusík s 2 centrálními aromatickými kruhy (např. sanguinarin (VI a) chelerythrin (VI b)).



V

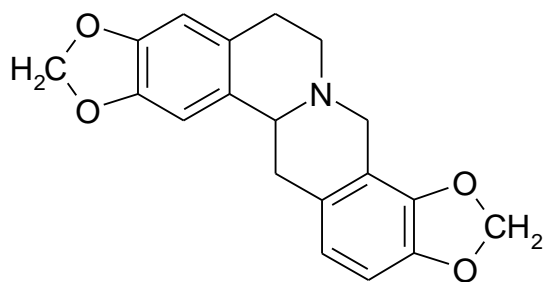


VI a) $R_1 + R_2 = \text{OCH}_2\text{O}$

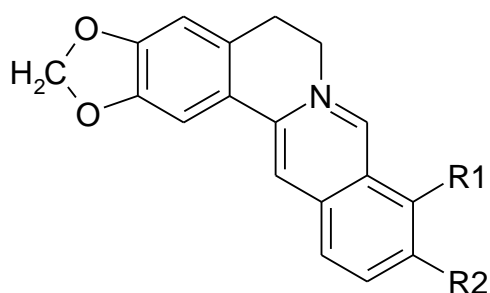
b) $R_1 = R_2 = \text{OCH}_3$

b) Protoberberinový typ: alkaloidy toho typu jsou zde zastoupeny:

- tetrahydroprotoberberiny- jsou to **terciární** alkaloidy (např. stylopin (VII),
- protoberberiny- **kvarterní** alkaloidy (např. berberin(VIII a), koptisin(VIII b)).

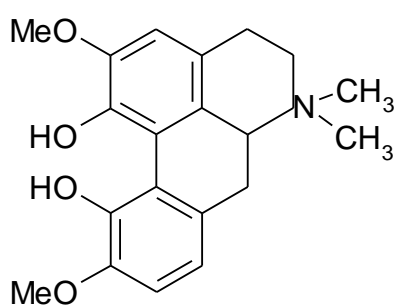


VII



VIII a) $R_1=R_2=OCH_3$
b) $R_1+R_2=OCH_2O$

c) Protopinový typ: sem náleží alkaloid typický pro čeleď Papaveraceae - protopin (IX) a allokryptopin.



IX

d) Ostatní alkaloidy: deriváty benzylisochinolinu – typy, které jsou zde zastoupeny v malém množství: chinolizidin, spartein (v *Chelidonii herba*) a magnoflorin (v *Chelidonii radix*).⁴⁴

Kvartérní benzo[c]fenanthridinové alkaloidy (KBA) tvoří relativně malou skupinu přírodních látek. Tyto isochinolinové deriváty jsou nápadné svými jasnými barvami. KBA

jsou široce rozšířeny, vyskytují se v mnoha druzích čeledí Papaveraceae, Fumariaceae a Rutaceae. Nejhojnějšími zdroji KBA kromě *Chelidonium majus* L. jsou také *Sanguinaria canadensis*, *Dicranostigma lactucoides*, *Macleaya cordata*, *M. microcarpa* a některé druhy *Bocconia* a *Zanthoxylum*. Sanguinarin a chelerythrin, které byly objeveny už v 19. století, jsou 2 nejznámější a lépe dostupné KBA. KBA jsou velmi citlivé k nuklofilním činidlům. V alkalickém prostředí se KBA změní na bimolekulární aminoacetalový derivát propojený můstkem s kyslíkovým atomem.⁴⁸

Výzkumy mléčné šťávy získané z lodyhy *Chelidonium majus* ukázaly, že čerstvá, ještě nezoxidovaná mléčná šťáva obsahuje větší množství dihydrokoptisinu, sanguinarinu, chelerythrinu, berberinu a koptistinu. Pokud necháme mléčnou šťávu stát několik dní na vzduchu nebo provádíme chromatografii bez použití redukčního činidla (jako např. 0,4% roztok merkaptoethanolu), dochází k oxidaci a už nelze prokázat žádný dihydrokoptisin, pouze koptisin. Lze předpokládat, že v čerstvém, neoxidovaném latexu z vlašovičnicku se vyskytují i jiné, lehce oxidovatelné alkaloidy jako např. dihydroberberin. Tyto se ale oxidují stejně jako dihydrokoptisin při zpracovávání rostliny, např. při sušení.⁴⁴

Zajímavé je rozdělení obsahových látek čerstvého vlašovičnickového latexu: všech 5 prozkoumaných alkaloidů (chelerythrin, sanguinarin, berberin, koptistin a dihydrokoptisin) je obsaženo ve vakuolách spolu s chelidonovou kyselinou a enzymy, jako jsou hydrolasy a blíže nespecifikované fenolické sloučeniny. Sanguinarin a chelerythrin mají větší afinitu k obsahu vakuol, proto se z vakuol do mléčné šťávy uvolňují až naposled a při volném stání roztoku pak způsobují rozklad tonoplastu, což je zřejmě základ přesné izolace. V mléčné šťávě je obsažen enzym fenoloxidas. Přítomnost enzymů v rostlině, získávaných společně s aktivními alkaloidy může být odpovědná za „nejisté působení“ preparátu vlašovičnicku, protože právě přítomnost enzymů může vést k přeměnám alkaloidů či vzniku méně účinných látek.^{44,45}

Byly provedeny extrakce alkaloidů *Chelidonium majus* L. různými metodami (tradiční vymačkávání a příprava čaje, mikrovlnná extrakce a SFE). Extrakty byly vodné a propylengykolové. Pro srovnání extrakčních metod byl výtěžek hodnocen podle celkového obsahu alkaloidů zjištěného spektroskopii. Nejvyšší výtěžek alkaloidů byl získán mikrovlnovou extrakcí a klasickou infuzí. Distribuce alkaloidů v rostlině byla zkoumána tenkovrstvou chromatografií s densitometrií. Koncentrace alkaloidů v extraktu je značně rozdílná v závislosti na extrakční metodě. Roztok získaný SFE obsahuje koptisin a chelidonin, ale berberin může být získán pouze mikrovlnnou extrakcí. Extrakt s vysokým obsahem koptisinu můžeme získat jedině SFE následovanou mikrovlnnou extrakcí.⁴⁹

Distribuce alkaloidů v rostlině je nerovnoměrná, mění se v závislosti na vegetační periodě rostliny, klimatických podmínkách, stáří a druhu rostliny. Kromě toho mohou získané hodnoty záviset na metodě izolace a stanovení alkaloidů.^{44,45} V tabulce 1 jsou uvedeny alkaloidy izolované z vlaštovičnicku.

Tabulka 1: Alkaloidy izolované z *Chelidonium majus* L. (Papaveraceae)⁴⁵

Alkaloid	kořen	nadzemní část
<i>Kvarterní benzofenanthridiny</i>		
Sanguinarin	+++	+++
Chelerythrin	+++	+++
Chelirubin	+	+
Chelilutin	+	+
Makarpin	+	+
<i>Terciární benzofenanthridiny</i>		
Chelidonin	+++	+++
Homochelidonin	++	+
Chelimin	+	-
Chelamidin	+	-
Dihydrosanguinarin	+	+
Dihydrochelerythrin	+	+
Dihydrochelirubin	+	-
Dihydrochelilutin	+	-
N-Demethyl-9,10-dihydrooxysanguinarin	+	-
Norchelidonin	+	+
Izochelidonin	-	+
Oxysanguinarin	+	-
<i>Terciární protoberberiny</i>		
Stylopin	++	++ až +++
<i>Kvarterní protoberberiny</i>		
Methylstylopin	+	+
Berberin	++	+++
Koptisin	+++	+++
Korysamin	+	+
<i>Protopiny</i>		
Protopin	++	+
Allokryptopin	++	+
<i>Kvarterní aporfíny</i>		
Magnoflorin	+++	-
Sparteín	?	?

3.4.1.2. Alkaloidy kořene (*Chelidonii radix*)

Nejbohatším orgánem z hlediska obsahu alkaloidů je kořen. Celkový obsah alkaloidů v něm dosahuje 0,8-2 %⁴⁴, a je nejvyšší na konci vegetačního období, zatímco při kvetení rostliny klesá. U víceletých rostlin je obsah alkaloidů v kořeni výrazně vyšší než v prvním roce vegetace.^{44,45}

- ♣ **Hlavní alkaloidy** kořene jsou koptisin (0,15-0,57 %) a chelidonin (0,5-1,02 %) ^{44,45} Dále se zde ve významném množství nachází sanguinarin, chelerythrin, berberin a kvartérního aporfinový alkaloid magnoflorin.⁴⁵
- ♣ Jako **vedlejší alkaloidy** jsou zde přítomny: 6-methoxydihydrochelerythrin, 6-methoxydihydrosanguinarin, dihydrosanguinarin, oxysanguinarin, dihydrochelerythrin, homochelidonin, β-alkokryptopin, chelilutin (tvoří oranžově zbarvené soli), chelirubin (tvoří soli purpurové barvy),⁵⁰ chelamin a korysamin.⁴⁴ Mezi alkaloidy, které jsou v literatuře zmíněny jen zřídka kdy patří chelamin C₂₀H₁₉NO₆ a chelamidin C₂₁H₂₃NO₆. Podle spektrální analýzy jim náleží struktura 10-hydroxychelidoninu a 10-hydroxyhomochelidoninu. Ojedinele byl izolován také alkaloid chelidimerin (meso-forma 1,3-bis-(hydrosanguinarinyl)acetonu).⁵¹ Dále byla zjištěna přítomnost cystein proteinasového inhibitoru chelidocystatinu - ten silně inhiboval aktivitu kathepsinu L, papainu a kathepsinu K.⁵² Z kořene také byly izolovány 2 další aporfinové alkaloidy: korydin a norkorydin. Jejich identifikace byla provedena pomocí IR, UV, 1H-NMR a MS.⁵³

3.4.1.3. Alkaloidy nati (*Chelidonii herba*)

V nadzemní části vlašovičnicku je obsah alkaloidů nižší, dle původu a podmínek sušení kolísá od 0,5 % do 1,5 %. V průběhu vegetačního období dochází k výrazným změnám v zastoupení jednotlivých alkaloidů.⁴⁵ Dle jiné práce se obsah alkaloidů pohybuje v rozmezí 0,01-1 %.⁴⁴ Jde především o benzylochinolinové alkaloidy benzofenanthridinového, protoberberinového a protopinového typu. Jako hlavní alkaloidy nati jsou uváděny: chelidonin, koptisin, stylopin, sanguinarin, chelerythrin, berberin^{42,43} a protopin.⁴⁴ V mnohem menším množství zde bylo nalezeno ještě asi 20 alkaloidů. Ve velmi malém množství (0,3 mg/kg) je v droze přítomen aporfinový alkaloid spartein.⁴⁴

Obsah a poměr alkaloidů v nadzemní části rostliny také kolísá v průběhu roku. Byly sledovány změny v obsahu alkaloidů v nadzemní části rostliny v období duben až říjen pomocí HPLC a bylo zjištěno, že hlavním alkaloidem po celé vegetační období je koptisin.

Jeho obsah v nadzemní části činil 0,4-0,8 %. Na počátku vegetačního období byl jako druhý hlavní alkaloid nadzemní části stanoven stylopin, zatímco obsah chelidoninu, sanguinarinu a chelerythrinu byl v této době relativně nízký. Po odkvetení rostliny postupně obsah chelidoninu, sanguinarinu a chelerythrinu narůstal a ke konci vegetačního období patřily k hlavním alkaloidům, zatímco obsah stylopinu výrazně poklesl. Rovněž bylo prokázáno, že hlavním alkaloidem nálevu z usušené nadzemní části sbírané v květnu (1 g sušené drogy Chelidonii herba se přelije 0,25 l vařící vody, ponechá se stát 10 minut) je taktéž koptisin (0,1- 0,2 %), zastoupení ostatních alkaloidů je nepatrné (< 0,001 %).⁴⁵

3.4.1.4. Alkaloidy plodů (*Chelidonii fructus*)

Z plodu rostlin *Chelidonium majus* L. byly izolovány 2 protoberberinové alkaloidy a 1 alkaloid benzofenanthridinový. Na základě chemické a spektroskopické analýzy byly identifikovány jako koptisin, berberin a chelidonin.⁵⁴

3.4.1.5. Alkaloidy semen (*Chelidonii semen*)

V semenech převažuje koptisin.

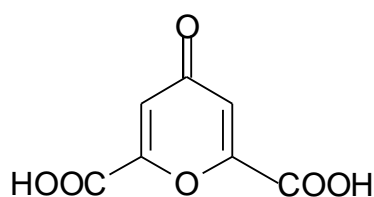
Kořen a nadzemní část rostliny se zásadně liší v obsahu a ve složení alkaloidů, proto byly zkoumány obě části odděleně. Výzkumné práce uvádějí tento postup, který je v obou případech totožný: nejdříve byl okyselený vodný extrakt vytřepáván etherem, aby byly odděleny nebasické nebo velmi slabě bazické látky. Potom byl vodný roztok slabě alkalizován a znovu vytřepáván etherem a byla získána *frakce A* (slabé base). A nakonec silná alkalizace a vytřepávání etherem dala *frakci B* (silné base). Další alkaloidy byly získány po jejich převedení na jodidy extrakcí chloroformem (kyselé jodidy)⁵¹ a alkalizací zbývajících roztoku a vytřepáním chloroformem za vzniku jodidů basických. Kvartérní frakce z kořene obsahovala jako hlavní alkaloid magnoflorin jodid v relativně vysokém množství (0,19 %), přičemž nadzemní část obsahuje znatelně nižší množství kvartérních alkaloidů. Z nati byl izolován (-)- α -stylopin methyljodid a (-)- β -stylopin methyljodid. Oba tyto alkaloidy byly detekovány také v kořeni, ale pouze ve stopovém množství. Z neutrální frakce z kořene byly získány dihydrosanguinarin, dihydrochelerythrin a dihydrochelirubin. Také byla stanovena přítomnost menšího množství dihydrochelilutinu. V nadzemní části byly detekovány pouze stopová množství dihydrosanguinarinu a dihydrochelerythrinu. Nález

dihydrochelirubinu a dihydrochelilutinu v *Chelidonium majus L.* byl vůbec prvním důkazem výskytu těchto dvou látek v přírodě.⁵¹

3.4.2. Ostatní obsahové látky

3.4.2.1. Rostlinné kyseliny

Ve vlašovičnicku byly nalezeny organické kyseliny, především kyselina chelidonová (X), kyselina citronová, jablečná a jantarová.⁴⁴



X

V jedné z novějších prací jsou uvedeny také estery kyseliny kávové: 2-kafeoylglycerová k., 4-kafeoyltrihydroxymáselná kyselina, kyselina kafeoyl-L-jablečná a ester kyseliny kávové a 1,4-laktonu kyseliny threonové^{44,45}. Hydrolýzou vodno-methanolového extraktu se získá 0,4 % kávové kyseliny a asi 0,1 % p-kumarové, ferulové, gentistové a p-hydroxybenzoové kyseliny.⁴⁴ Starší práce uvádí nález kyseliny mravenčí.⁵⁵

Dřívější práce také uvádějí přítomnost alkoholu chelidonolu, β -karotenu, kyseliny askorbové, flavovoidů rutinu a kvercetinu.^{44,55} Ve šťávě z natě se vyskytuje hodně fosforečnanu vápenatého a hořečnato-amonného.⁵⁵ Semena obsahují olej, sestávající hlavně z nenasycených mastných kyselin (86,66-91,45 %), kde hlavní podíl tvoří kyselina linoleová (cca 72 %) a kyselina olejová (cca 16,8 %). Z nasycených mastných kyselin jsou tu kyselina palmitová a stearová.⁵⁶ V semenech se vyskytuje i velmi účinná lipasa. Dále byla v rostlině prokázána proteasa, peroxydasa, glukosa a fruktosa, kaučuk, třísloviny.⁵⁵

3.4.2.2. Minoritní složky

V rostlině byla prokázána přítomnost nesespecifických triterpenoidů, silic, saponinů a kyseliny nikotinové.⁴⁵ Dále se zde nalezneme biogenní aminy: cholin, methylamin, histamin, tyramin.^{44,45} V celé rostlině je obsaženo velké množství pryskyřičnatých látek, z nichž jedna (žlutě zbarvená) je pravděpodobně příčinou toxicity čerstvé rostliny.^{45,55}

Minerální látky

Novější studie prokázaly, že droga *Chelidonii herba* obsahuje 24 prvků: Al, As, B, Ba, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, K, Li, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, P, Pb, S, Ti, V, Zn). Tyto prvky byly zjištěny v čerstvé droze (kořeni i nati), v jejím vodném roztoku a alkalickém extraktu.⁵⁷ Obsah prvků byl zkoumán pomocí ICP (inductively coupled plasma)^{49,57} a emisní spektrometrií. Rozdíly v obsahu prvků v extraktu (kromě Cu, Mn a Na) jsou značné. Bylo zjištěno, že kořeny obsahují celkově vyšší množství minerálních prvků (až na B, Cu, P a S). Ve vodném extraktu je množství minerálů nejčastěji v rozmezí 10-65 %, to platí hlavně pro K (65 %) a P (54 %). Koncentrace roztoku minerálů v případě tinktury klesá se stoupající koncentrací alkaloidů.⁵⁷ Obsah Mg se liší podle části rostliny.⁵⁸ Byly zkoumány vzájemné vztahy mezi obsahem, alkaloidů a minerálními a stopovými prvky v rostlině a došlo se ke zjištění, že zde existuje korelace mezi Mg, Cr, Al, Co a Sr a protoberberinovými alkaloidy, stejně tak byl patrný vztah mezi Mg, Cr, Al a Zn a benzofenanthridinovými alkaloidy.⁵⁹

Lze tedy potvrdit, že jak obsah makroelementů, tak i mikroelementů v extraktu má vliv na jeho terapeutickou hodnotu.⁵⁷

3.5. BIOLOGICKÁ AKTIVITA OBSAHOVÝCH LÁTEK

3.5.1. Inhibice cholinesterasové aktivity

Byly prováděny četné studie ověřující inhibiční vliv některých isochinolinových alkaloidů obsažených ve vlašovičniku a některých jejich derivátů (*Ukrain*, *Sanguirythrin*) na aktivitu cholinesteras v lidském séru. V jedné studii⁶⁰ byly zkoumány účinky *sanguinarinu*, *chelidoninu*, *berberinu* na aktivitu AChE. Na základě kinetických studií bylo odhaleno, že všechna testovaná agens jsou reverzibilní inhibitory AChE, z nichž pouze *chelidonin* náleží k inhibitorům kompetitivního typu. Ostatní alkaloidy vykazovaly inhibici smíšeného typu-kompetitivně-nekompetitivní. Jako nejsilnější inhibitory se ukázaly: *berberin* ($IC_{50} = 0,23$ mM), *sanguinarin* a *Sanguirythrin* ($IC_{50} = 0,29$ mM). Znatelně nižší aktivitu vykazoval *chelidonin* a *Ukrain* ($IC_{50} = 2,0$ mM a 2,5 mM).

Jiné studie se zabývaly srovnáním vlivu těchto alkaloidů na BuChE a AChE. Zkoumány byly protoberberiny, benzofenanthridiny, apomorfínové alkaloidy ve srovnání se 4 modelovými sloučeninami. Sloučeniny vykazovaly rozdílné typy interakcí s BuChE a AChE. Bylo prokázáno, že některé sloučeniny, obsahující kvartérní dusík, fungují jako

inhibitory butyrylcholinesterasy. Jejich účinek na BuChE se liší mírou inhibiční schopnosti vůči BuChE a mechanismem inhibice. Kvartérní benzofenanthridiny (sanguinarin a chelerythrin) a kvartérní protoberberiny (koptisin a protoberberinu) se váží na tzv. γ -anionickou stranu, která je umístěna mimo aktivní centrum enzymu. Aktivní centrum BuChE se skládá, podobně jako u AChE, ze dvou funkčních komponent: esterového a anionického vazebného místa. Zatímco esterové místo je u obou enzymů stejné, anionické místo je odlišné. Anionické místo BuChE je totiž stéricky omezeno - vazba inhibitorů k BuChE je ovlivněna jejich geometrií a velikostí. Při interakci inhibitor-BuChE hraje náboj anionického místa mnohem menší roli, než u AChE. Hlavní síly uplatňující se ve vazbě jsou Van der Waalsovy interakce a hydrofobní interakce. Je tedy zřejmé, že BuChE nemá anionické vazebné místo umístěno v terminální části. Na rozdíl od AChE se u BuChE všechny studované sloučeniny váží na aktivní centrum enzymu. Benzofenanthridinové alkaloidy, stejně jako slabé inhibitory BuChE se váží na anionické centrum. Rozdílná schopnost inhibice může být vysvětlena jejich rozdílnou hydrofobicitou a stereochemií molekuly.⁶¹

Tab. 2 – Inhibice cholinesteras⁶¹

Sloučenina	I ₅₀ (mol/l) BuCHE	I ₅₀ (mol/l) ACHE	% inhibice BuCHE ^b
Berberin	$> 1.0 \times 10^{-4}$	9.8×10^{-7}	25 ^c
Koptisin	$> 1.0 \times 10^{-4}$	5.8×10^{-7}	36 ^c
Sanguinarin	2.4×10^{-5}	3.5×10^{-5}	85
Chelerythrin	1.4×10^{-5}	9.4×10^{-6}	90
N-Methyl- isochinolin	$> 1.0 \times 10^{-4}$	2.5×10^{-5}	21 ^c
Protoberberin	$> 1.0 \times 10^{-4}$	3.4×10^{-5}	28 ^c
N-Methyl- fenanthridin	1.0×10^{-5}	4.8×10^{-6}	95

c.... slabé inhibitory

b.... pro koncentraci inhibitorů 1.0×10^{-4} mol/l

Pozn.: Hodnota I₅₀ byla určena ze závislosti koncentrace alkaloidů vs. procento inhibice.

Všechny inhibitory AChE jsou terciární base. Ukázalo se však, že také kvartérní amoniové baze alkaloidního⁶¹ i nealkaloidního typu⁶² mají aktivitu vůči mozkové AChE a BuChE a mohou přecházet přes hematoencefalickou bariéru (HEB), ačkoliv se to zdá paradoxní.

3.6. FARMAKOLOGICKÉ ÚČINKY *CHELIDONIUM MAJUS L.*

Až do roku 1970 byla zkoumána výlučně čerstvá droga : „*Herba Chelidonii recens* – čerstvá, na začátku doby květu, sbíraná nať s kořeny“. Převládlo mínění, že droga při sušení ztrácí své účinné látky, což se může stát i při nejlepších podmínkách sušení. Většina farmakologických výzkumů byla tudíž provedena s extrakty z čerstvé rostliny, vzácněji pak se sušenou celou rostlinou nebo s výtažky z čerstvé rostliny (čerstvá nať nebo kořen), případně s alkaloidy izolovanými z celé rostliny. Ale stabilita látek obsažených v čerstvé droze také nebyla optimální, proto se často popisoval nejistý účinek získaných preparátů. Výsledky těchto studií jsou proto jen obtížně převeditelné na sušený vzorek drogy. Přestože experimenty neprobíhaly za stejných podmínek, podařilo se objasnit, v čem spočívá základní působení drogy.⁴⁴

3.6.1. Protinádorové a antivirové působení

Klinické použití vlaštovičnicku při léčbě nádorů se datuje již od minulého století, kdy Botkin popsal dva případy karcinomu léčené extrakty z vlaštovičnicku. Další klinické údaje z tohoto období popisují užití chelidoninsulfátu při rakovině žaludku, extraktu z vlaštovičnicku při karcinomu prsu a dalších orgánů. Dále má droga dlouhou historii při léčbě bradavic, papilomů a kondylomat. Později při testování rostlinných extraktů na antitumorovou aktivitu byl pozorován inhibiční účinek extraktů z vlaštovičnicku na sarkom 180 a Ehrlichův myší sarkom.^{44,45} Při intenzivním výzkumu antitumorové aktivity v šedesátých letech byly popsány inhibiční účinky extraktů z vlaštovičnicku na některé typy nádorů, současně však byla prokázána výrazná cytotoxicita alkaloidů sanguinarinu, chelerythrinu, chelidimerinu, chelidoninu, protopinu a koptisinu. V roce 1968 bylo v experimentech s tkáňovými kulturami zjištěno, že extrakty z rostliny vykazují slabou aktivitu proti viru Herpes simplex. Rovněž v pozdější práci byl potvrzen inhibiční efekt extraktu na virus Herpes simplex a některé adenoviry *in vitro*. Nejsilnější inhibiční účinek však vykazovala frakce neobsahující žádný z typických alkaloidů tohoto druhu. Aktivní složka extraktu zatím nebyla definována.⁴⁵

V současné době opět roste zájem o využití vlaštovičnicku při terapii karcinomů, a to především v souvislosti s přípravkem **Ukrain**. Ten byl vyvinut a patentován rakouskými autory. Ukrain obsahuje alkaloidy z *Chelidonium majus L.* konjugované s kyselinou thiofosforečnou a vyznačuje se silnou imunomodulační aktivitou.⁶³ Působí zvýšení počtů T-

lymfocytů a normalizaci poměrů T-helpers/T-supresorových buněk, a snížení hodnot IgG. Přípravek byl aplikován pacientům s různými typy karcinomů i pacientům s recidivujícím bronchopulmonárním onemocněním.^{45,63} Byl pacienty dobře snášen a vedl k obnovení buněčné imunity, provázené zlepšením stavů pacientů a v několika případech i regresí tumoru. V *in vivo* studiích na myších tumorech se potvrdilo, že i.v. podání Ukrainu snižuje rychlost růstu tumoru. V pokusech *in vitro* bylo doloženo, že preparát obnovuje schopnost makrofágu lyticky štěpit tumorové buňky pomocí stimulace LPS (lipopolysacharid, endotoxin). Tato obnovená aktivita je nezávislá na TNF- α . Ukrain tedy aktivuje alternativní cytolytický mechanismus u makrofágů. Bylo také zjištěno, že suma alkaloidů z *Chelidonium majus*, Ukrain a amitozin (strukturní a funkční analog Ukrainu) vykazují antivirovou aktivitu proti chřipkovému viru A /H3 N2.⁶⁴ Studiu dalších vlastností je i nadále věnována značná pozornost.⁴⁵

3.6.2. Hepatotropní a spasmolytické účinky

Zcela odlišnou oblastí indikace vlaštovičnicku je jeho tradiční použití při onemocněních žlučových cest a jater. Droga je v současných přehledech fytotherapie doporučována jako spasmolytikum a cholagogum, názory na její účinnost jsou však nejednoznačné. Údaje o pozitivních účincích drogy na sekreci žluči, aktivitu α -amylasy i spasmy hladké svaloviny pochází vesměs ze starších prací.⁶⁵ Významné zvýšení sekrece bilirubinu, cholesterolu a zvýšení aktivity pankreatických enzymů lipasy a α -amylasy po aplikaci 100 mg suchého extraktu je uvedeno zase v jiné práci.⁶⁶ Příznivé účinky preparátu **Panchelidon** obsahujícího extrakt z čerstvých rostlin s obsahem 20 % alkaloidů při léčbě chronické cholangitidy, cholelithiasy a dyskinesí popsal v roce 1977 Neumann-Mangoldt. Preparát vykazoval spasmolytický a středně analgetický účinek, výrazně omezoval diarrhoeu, vyvolanou léčbou antibiotiky.⁴⁵ Zpomalení střevní pasáže je způsobeno centrálním sympatomimetickým působením alkaloidů vlaštovičnicku.⁴⁴ Weiss hodnotí účinky vlaštovičnicku jako nekonstantní. S odvoláním na vlastní zkušenost uvádí, že účinnost drogy klesá delším uchováváním a je tedy nutné užívat extrakty vždy z čerstvé drogy. (Naproti tomu dle poznatků E. Táborské a jejích kolegů se obsah alkaloidů v usušené droze uchováváním nemění, stejně jako se nemění alkaloidní složení tinktury uchovávané několik měsíců v chladu)⁴⁵. I při podávání čerstvé šťávy však pozoroval, že zatímco v první polovině roku byl efekt jeho působení zřetelný a pacientům přinášel úlevu, po uplynutí této doby začal

slábnout, až prakticky v krátké době vymizel. Je pravděpodobné, že uvedené poznatky souvisejí s nestandardním složením drogy.⁴⁵

Ve 30-tých letech 20. století byla prováděna řada klinických studií, hlavně na pacientech s chorobami žaludku, střeva a jater. Pacienti byli léčeni preparáty z čerstvé rostliny (vylišované šťávy nebo celá rostlina rozetřena s mléčným cukrem) p.o.. Bylo pozorováno snížení bolesti a vymizení křečí (zlepšení subjektivních obtíží). Na podkladě těchto preklinických a klinických výzkumů (převážně na celé rostlině nebo na celkových alkaloidech → výsledky nejsou převoditelné na účinek sušené drogy) bylo vlašovičnicku přiřazeno spasmolytické působení na GIT a žlučové cesty. Toto působení bylo přičítáno chelidoninu. Také v monografii *Chelidonii herba* se udává: „Dostatečně jisté je papaverinu podobné, lehce spasmolytické působení na horní část GIT“. K otázce zda má vlašovičnick cholagogní působení či zda se jedná jen o efekt cholaretický nebo cholekinetický neexistují žádné dostačující důkazy. Podle klinických studií mají mít preparáty celé čerstvé rostliny podávané p. o. u pacientů s cholestasou cholagogní působení.⁴⁴

Větší uplatnění mezi galeniky používanými v současnosti v západoevropských zemích nacházejí směsné extrakty, obsahující vedle vlašovičnicku výtažky dalších drog. Např. preparát **Chelidonium-Strath** (Strath-Labor) obsahuje směs extraktů z *Chelidonii herba*, *Agrimoniae herba*, *Salviae folium* a *Hyperici herba*, přípravek **Hepatofalk** Planta (Falk) je směsí extraktů ze *Silybum marianum*, *Chelidonium majus* a *Curcuma xanthorrhiza*. Preparát obdobného složení **Aristochol** (Steiber and Co.) byl hodnocen Baumanem, který uvádí, že přípravek zvyšuje choleresi, sekreci lipasy a amylasy. Pozitivní účinky preparátu **Hepaticum-Medice** (Medice) na metabolismus žlučových kyselin popsal Matzekis.⁴⁵

3.6.3. Ostatní užití

Přípravky obsahující alkaloidy z *Chelidonium majus* L. vykazují slibné účinky v prevenci a léčbě periodontálních a dásňových chorob.⁶⁷

3.6.4. Biologické účinky hlavních obsahových látek

3.6.4.1. Aktivita látek typu benzofenanthridinu

- Jeden z hlavních alkaloidů vlašovičnicku je **chelidonin**. Má významné spasmolytické účinky především na svalstvo gastrointestinálního traktu, bronchů, dělohy, uretry a cév. Jeho spasmolytický účinek je poloviční oproti účinkům

papaverinu. Chelidonin působí přes *nervus vagus* – zpomaluje aktivitu srdce a snižuje tak krevní tlak. Snižuje spontánní motorickou aktivitu a tělesnou teplotu, potencuje účinek hypnotik. Má cholagogní účinek a ve žlučových cestách působí antisepticky. Chelidonin vykazuje stejně jako chelerythrin a sanguinarin antimitotické účinky - inhibuje polymeraci tubulinu.⁴⁵ Experimenty na myších odhalily, že chelidonin průkazně zvyšuje ochranný účinek antiepiletik (fenobabritalu a difenylhydantoinu) na mozkové buňky.⁶⁸

- **Sanguinarin** a **chelerythrin** jsou již dlouhou dobu známé a v praxi užívané alkaloidy. Byly izolovány i z jiných rostlinných druhů, kořen vlašovičnicku patří k jejich nejvýznamnějším zdrojům. Mají protizánětlivý a antimikrobiální účinek; v Rusku se vyrábí preparát Sangviritrin (obsahuje směs sanguinarinu a chelerythrinu), v USA přípravky ústní hygieny s obsahem benzofenanthridinů). Sanguinarin a chelerythrin vykazují inhibiční účinky na celou řadu enzymů, např. na cholinesterasy, alaninaminotransferasu, Na^+/K^+ -ATPasu, Ca^{2+} -ATPasu. Oba alkaloidy rozpojují respiraci a oxidační fosforylaci, vmezeřují se do dvouspirálové nativní DNA (interkalace) a tak zabraňují syntéze RNA a inhibují enzymovou hydrolýzu DNA. Nedávno byla popsána inhibice proteinkinasy C chelerythrinem. Většina těchto inhibičních účinků je připisována interakci benzofenanthridinů s SH-skupinami enzymů. Oba alkaloidy mohou reagovat v závislosti na pH buď ve formě kvartérního kationtu, nebo terciární base. Sanguinarin rovněž zvyšuje vodivost lipidové dvouvrstvy. Chelerythrin, sanguinarin a chelidonin mají též prokazatelné antimitotické účinky. Zdá se, že mechanismus jejich působení je inhibice polymerace tubulinu. Lze předpokládat, že antimikrobiální i cytostatická aktivita těchto alkaloidů je podmíněna výše uvedenými účinky na řadu klíčových enzymů buněčného metabolismu.⁴⁵

3.6.4.2. Aktivita látek typu protoberberinu

- Jedním z hlavních alkaloidů v rostlině je **koptisin**, o jeho účincích je známo jen velmi málo. Ze starších prací pocházejí údaje o jeho cytotoxickém působení. Jsou popsány jeho antimikrobiální a protizánětlivé účinky. Podobně jako berberin inhiboval v dávkách 195 mg/kg/den srážení trombocytů u krys. Má též spasmolytickou a uterotonickou aktivitu. Dále vykazuje také antiproliferativní účinky

– selektivně inhibuje proliferaci buněk hladkých svalů v cévách a ve srovnání s berberinem je potřeba nižší koncentrace k dosažení stejného účinku.⁶⁹ Strukturně se koptisin jen málo liší od berberinu, proto lze očekávat, že koptisin vykazuje i řadu dalších efektů analogických berberinu.⁴⁵

- Řada významných fyziologických účinků byla popsána u **berberinu**. Jedním ze zdrojů tohoto alkaloidu je právě *Chelidonium majus* L. Berberin má některé účinky podobné jako chelidonin. V Evropě a na východě je tradičně užíván proti průjmu, žloutence a chronické dysenterii. Stimuluje sekreci žluče, snižuje krevní tlak (vasodilatací) a působí sedativně. V *in vitro* pokusech bylo popsáno, že působí jako antagonist α -2-adrenoreceptorů lidských krevních destiček. Působí inhibičně na některé enzymy a má antibakterální účinky. Řada prací se zabývá účinkem berberinu na srdeční aktivitu. V pokusech na zvířatech byly zjištěny jeho pozitivní inotropní a dromotropní a negativní chronotropní efekty.⁴⁵
- **Stylopin** je hlavní složkou listu vlašovičníku. Ten byl užíván k odstraňování bradavic, papilomů, kondylomat, a v orientálních zemích i k léčení jaterních onemocnění. Sám o sobě nemá cytotoxické účinky. Stylopin potlačuje vznik NO a PGE₂ v makrofázích tím, že inhibuje expresi iNOS a COX-2. Dále také redukuje produkci TNF- α a interleukinů – IL-1b a IL-6. Tyto biologické aktivity mohou mít podíl na protizánětlivé aktivitě celé rostliny *Chelidonium majus* L.⁷⁰

3.6.4.3. Aktivita alkaloidů typu protopinového

U **protopinu** byl odhalen inhibiční vliv na AChE (selektivní, reverzibilní a kompetitivní) a též antiamnestický efekt.⁷¹ Protopin se vyskytuje hlavně v rostlinách čeledi Papaveraceae, Fumariaceae, Berberidaceae, Ranunculaceae a Rutaceae.

3.6.4.4. Aktivita ostatních obsahových látek

Rovněž některé z nealkaloidních látek prokázaných v *Chelidonium majus* L. mají výrazné fyziologické účinky. Kyselina kávová i její estery mají spasmolytickou, cholagogní a antibakteriální aktivitu. Nebylo dosud zkoumáno, do jaké míry se na terapeutických efektech vlašovičníku mohou podílet tyto látky.⁴⁵

3.7. VYUŽITÍ *CHELIDONIUM MAJUS* L.

Využití rostliny má bohatou historii v lidovém léčitelství. Není téměř choroby, proti které vlaštovičník v průběhu staletí nebyl použit. Léčivá moc jí byla prisuzována již v době starověku a od té doby byla v léčitelství hojně používána. Byla doporučována proti chorobám jater, zimnici a vodnatelnosti, na zlepšení zraku, k odstranění bradavic a léčbě tumorů.

V novější době je vlaštovičník užíván ve fytoterapii jako droga s účinkem spasmolytickým, analgetickým, cholagogním, popř. jako dermatologikum, antihistaminikum a antiseptikum. *Chelidonii herba* i *Chelidonii radix* jsou popsány v řadě lékopisů. Na přípravu odvaru se doporučuje použít 0,5-1,0 g drogy z natě nebo 0,5 g drogy z kořene. *Tinctura chelidonii* s obsahem alkaloidů 4-5 % se podává jako spasmolytikum v průměrných dávkách 1 g denně.

Extrakty z vlaštovičníku jsou součástí řady galeník, produkovaných zejména v západní Evropě. Jsou indikovány při hepatopatiích, poruchách funkce žlučníku a po jeho operacích. V Číně se extrakty z *Chelidonium majus* L. užívají při léčbě chronické bronchitidy, dávivého kašle a jako analgetikum. Vlaštovičník je součástí řady homeopatik. V lidovém léčitelství se stále traduje, použití rostliny, zejména čerstvé šťávy, jako prostředku k odstranění bradavic.⁴⁵

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST A VÝSLEDKY

4.1. VŠEOBECNÉ POSTUPY

4.1.1. Destilace a odpařování rozpouštědel

Rozpouštědla byla před použitím destilována; nejprve byl zachycen předeček (asi 5 %; většinou s vodným azeotropem), poté bylo vydestilováno zbylých cca 90 % rozpouštědla. Rozpouštědla byla uchovávána v hnědých nádobách. Odpařování chromatografických frakcí bylo prováděno na vakuové odparce při 40°C za sníženého tlaku.

4.1.2. Chromatografie

4.1.2.1. Tenkovrstvá chromatografie

Chromatografie na tenké vrstvě byla použita v systému N (normálních) komor. Komory byly použity nasycené mobilní fází. V případě užití malých komor (válcových) trvalo sycení asi 30 minut. U klasických komor pak asi hodinu. Chromatografie byla prováděna vzestupně.

4.1.2.2. Sloupcová chromatografie

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

4.2. POTŘEBY A POMŮCKY

4.2.1 Chemikálie

Kyselina sírová 96% p. a.

Vodný roztok chlorovodíku 36% p. a.

Kyselina octová 99%, p. a.

Dusičnan bismutitý zásaditý, č.

Kyselina vinná č.

Jodid draselný p. a.

Acetylthiocholinjodid, $\geq 99,0\%$ (Fluka, Sigma-Aldrich, Praha, ČR)

DTNB, $\geq 98\%$ (Sigma-Aldrich, Praha, ČR); 5,5'-dithionbis(2-nitrobenzoová) kyselina

Dihydrát dihydrogenfosforečnanu sodného, p.a. (Lachema, Brno, ČR)
Dodekahydrát hydrogenfosforečnanu disodného, p.a. (Lachema, Brno, ČR)
Ethanol (Fluka, Sigma-Aldrich, Praha, ČR)
Plastové kyvety DISPOLABKARTELL 1937 PS MICROCUVETTES

4.2.2 Rozpouštědla

Cyklohexan č.
Diethylether č. bez stabilizátoru
Ethanol 95% denaturovaný methanolem, č.
Chloroform č.
Methanol č.
Diethylamin č.
Toluen č.

4.2.3 Činidla

*Dragendorffovo činidlo podle Muniéra.*⁷²

Je určeno pro alkaloidy a ostatní sloučeniny obsahující dusík.

Příprava *roztoku A*: 1,7 g zásaditého dusičnanu bismutitého a 20,0 g kyseliny vinné se rozpustí v 80,0 ml vody.

Příprava *roztoku B*: 16,0 g jodidu draselného se rozpustí ve 40,0 ml vody

Příprava *zásobní roztoku*: připraví se směs roztoků A a B v poměru 1:1. Ta může být uložena několik měsíců v lednici

Příprava *činidla ve spreji*: k roztoku 5,0 ml kyseliny vinné rozpuštěné v 50,0 ml vody se přidá 5,0 ml zásobního roztoku.

(R. Munier: Bull. Soc. Chim. Biol. 35, s. 1225; 1953)

4.2.4 Chromatografické adsorbenty

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

Komerční adsorbent se suspenduje v 3násobném množství vody, po změření výluhu se suspenze zneutralizuje octovou kyselinou na pH ~5, povaří, odsaje ostře na nuči, a suspenduje několikrát v potřebném množství horké destilované vody (80 °C) a promyje, až je

pH promývací vody patkicky neutrální. Po odsátí a několikadenním vysušení na bezprašném místě se aktivuje 12 hodin při 200 °C, po zchladnutí v uzavřené nádobě se deaktivuje přidávkem 6 % vody, dobře promíchá a ponechá min. 24 hodin ekvilibrovat.

Oxid hlinitý kyselý 0,1-0,2 mm

Byl připraven modifikací popsané metody⁷³ z oxidu hlinitého neutrálního (Reanal): 1000 g adsorbentu bylo rozmícháno s 2 litry vodného roztoku chlorovodíku, 12 hodin mícháno vrtulovou míchačkou po dalších 12 hodinách (za občasného promíchání) byla suspenze ostře odfiltrována přes fritu a ponechána sušit na vzduchu za nepřístupu prachu po dobu 3 dnů za občasného míchání ve vrstvě nepřevyšující 2 cm. Po této době byl adsorbent aktivován 12 hod. při 200 °C v sušárně. Kyselost takto připraveného adsorbentu byla sledována titračně ve vodné suspenzi a pohybovala se v rozmezí 3,4-3,8 ml 0,1 M NaOH/10,0 g adsorbentu.

Silufol[®] UV 254, Kavalier Votice, 15x15 cm

Kieselgel F₂₅₄, Merck, 5x10 cm

4.2.5. Chromatografické soustavy

S1 Cyklohexan-diethylamin 9:1

4.2.6. Standardní látky

Protopin (Sigma-Aldrich)

Allokryptopin (Sigma-Aldrich)

4.2.7. Přístroje

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

pH metr Φ 72 METER (Beckmann, USA)

UV-spektrofotometr UVIKON 942 (Kontron instruments, Švýcarsko)

4.3. IZOLACE ALKALOIDŮ

4.3.1. Materiál

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

Makroskopická, mikroskopická a chemická identifikace byla provedena L. Opletalem.

Metodou podle Českého lékopisu 2005 Doplněk 2006⁷⁴ bylo stanoveno:

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

4.3.2. Příprava extraktu a jeho čištění

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

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

4.3.3. Příprava alkaloidního výtřepku A z primárního extraktu

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

4.3.4. Čištění surového výtřepku A

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

4.3.5. Příprava pseudokyanidů

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

15,7 g pseudokyanidů bylo zpracováno metodou podle Gadamera (ethanol + chloroform + 36% HCl = 1:2:1) resp. suspendováno ve směsi 125 ml 95% EtOH a 250 ml chloroformu, bylo přidáno 125 ml 36% HCl a proveden var pod zpětným chladičem po dobu 1 hodiny. Potom byl roztok na vakuové odparce odpařek do malého zbytku, zředěn 100 ml vody a zalkalizován 10% roztokem uhličitanu sodného na pH 9; fialová suspenze byla vytřepána 5x 200 ml diethyletheru. Spojené diethyletherové výtřepky byly vytřepány 5x 100

ml 1M kyseliny sírové, kyselý roztok zalkalizován roztokem 10% uhličitanu sodného, suspenze vytřepána 5x 150 ml diethyletheru; uvedený postup byl opakován ještě jednou, aby došlo k vyčištění alkaloidní směsi. Byl získán světle hnědý, nekrystalický odparek (6,01 g).

4.3.6. Separace výtřepku A po odstranění benzofenanthridinových basí

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

4.3.7. Příprava fenolických alkaloidů z výtřepku A

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

4.3.8. Příprava vyčištěného výtřepku A

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

4.3.9. Příprava chloridů nerozpustných ve vodě z výtřepku A a alkaloidů z nich

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

4.3.10. Příprava alkaloidů z chloridů rozpustných v chloroformu (AC)

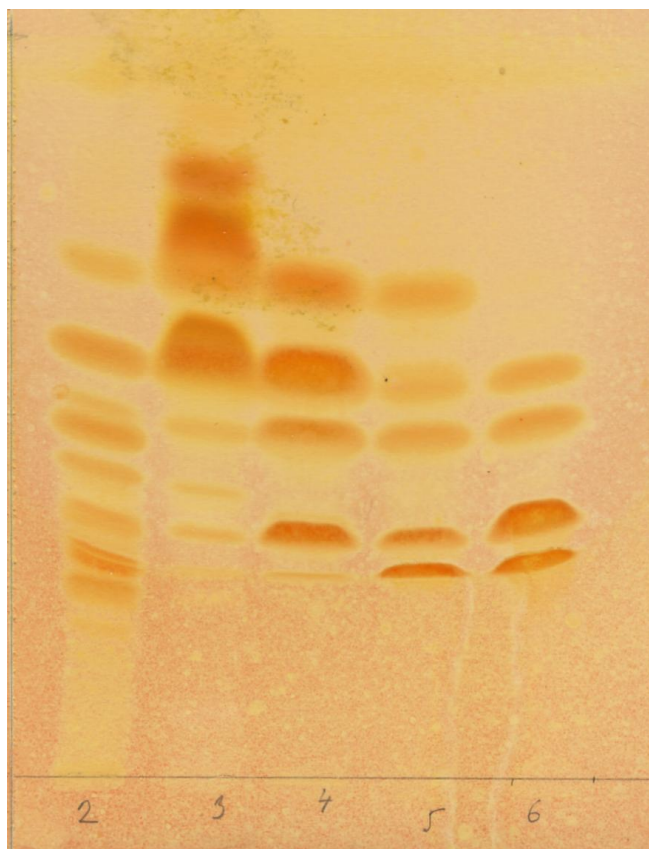
800 ml oranžového filtrátu po oddělení nerozpustných chloridů bylo vytřepáno 6x 250 ml chloroformu, chloroform odpařen, zbytek rozpuštěn ve 130 ml 0,3 M kyseliny sírové, roztok zředěn vodou na 800 ml, alkalizován 25% amoniakem na pH 9 a vytřepán 5x 600 ml diethyletheru za vzniku pevného, světle hnědého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

4.3.11. Příprava alkaloidů z chloridů nerozpustných v chloroformu (AD)

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

Tabulka 3: Výsledky přípravy výtřepků s terciárními a kvartérními bazemi z nati s kořeny

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



Obrázek 3 Kontrolní TLC jednotlivých typů výtřepků z nati s kořeny vlaštovičníku (Kieselgel F₂₅₄, S1, komora nasycená, vyvíjení 1x detekce Dragendorffovo činidlo; popis viz tabulka 2)

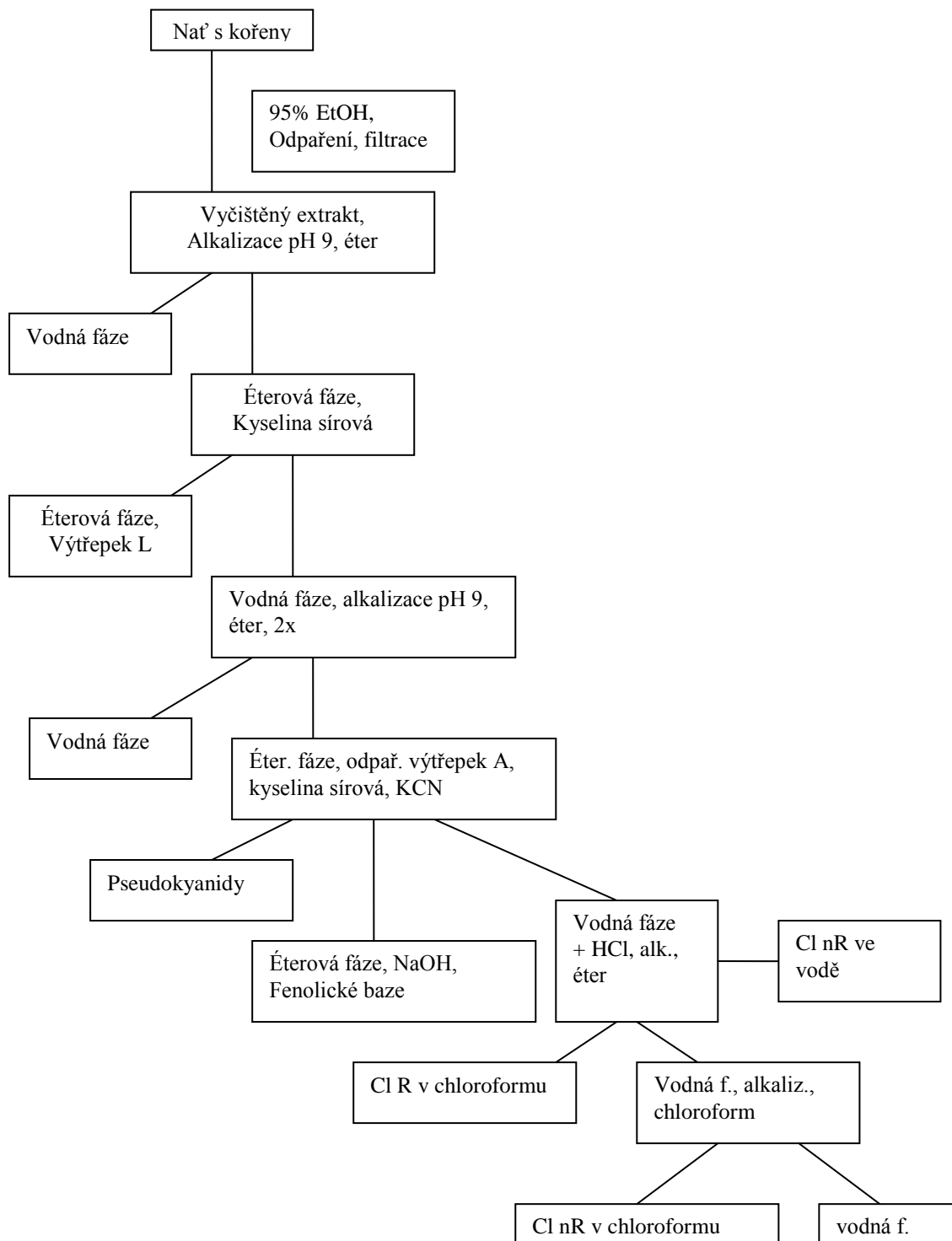
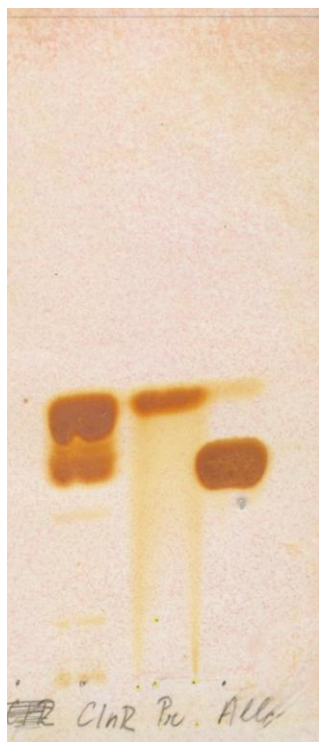


Schéma 1: Příprava alkaloidních koncentrátů (extrakce nati s kořeny vlašovičnicku)

Dělení směsi alkaloidů z chloridů nerozpustných v chloroformu (AD):



Obrázek 4: Kontrolní TLC bází alkaloidů z chloridů nerozpustných v chloroformu ClnR) se standardy protopinu (Pr) a allokryptopinu (Allo).

Adsorbent: neutrální oxid hlinitý 0,1-0,2 mm, st. aktivity III 1300 g

Chrom. lože: vrstva s adsorbentem: 5x66 cm

vrstva s frakcí: 5x6,6 cm

Nanáška: 15,91 g alkaloidní směsi

Frakce: 250 ml

Doba toku: ~20 min.

Alkaloidní směs byla rozpuštěna v 20 ml chloroformu, smíchána s 15 g adsorbentu, rychle vysušena při 40 °C a dosušena 16 hodin ve vakuovém exsikátoru nad silikagelem.

Potom byla nanesena na sloupec obvyklým způsobem.

Sloupec byl připraven nalitím suspenze adsorbentu. Chromatografie byla prováděna za následujících podmínek (tab 4).

Tabulka 4: Sloupcová chromatografie směsi alkaloidů, jejichž chloridy jsou nerozpustné v CHCl₃.

Souhrnná frakce	Frakce	Eluent*	Hmotnost (g)	Popis
1-17	1-14	Bz-CHCl ₃ 90:10	0,34	Žlutý, olejovitý
	15-17	Bz-CHCl ₃ 85:15		
18-23	18-23	Bz-CHCl ₃ 80:20	0,55	Světle hnědý, pevný
24-25	24-25	Bz-CHCl ₃ 80:20	0,11	Bílý, krystalický**
26-27	26-27	Bz-CHCl ₃ 70:30	0	---
28-30	28-30	Bz-CHCl₃ 70:30	3,44	Bílý, krystalický
31-37	31-37	Bz-CHCl ₃ 70:30	8,12	Bílý, krystalický
38-44	38-40	Bz-CHCl₃ 70:30	1,86	Bílý, krystalický
	41-44	Bz-CHCl₃ 60:40		

* Bz – benzín 40-60 °C; CHCl₃ - chloroform

** nejedná se o alkaloid

Čištění frakcí 28-30 (protopin)

Spojené frakce 28-30 byly krystalizovány ze směsi chloroform-ethanol za vzniku 0,92 g prizmatických jehlic.

Protopin C₂₀H₁₉NO₅ (353,374), t. t. 207-208 °C, směsná t. t. bez deprese, chromatografické srovnání se standardem (Kieselgel F₂₅₄, S1, komora nasycená, Dragendorffovo činidlo, R_f 0,48) bez rozdílu hodnot R_f.

Vypočteno C 67,97; H 5,44; N 3,96

Nalezeno C 67,81; H 5,22; N 3,72

Tabulka 5: Chování protopinových alkaloidů na vrstvě silikagelu.

Látka	viditelné	366 bez ind.	254 s ind.
Protopin	0	0	Černý (zháší)

4.4. STANOVENÍ ÚČINKU ALKALOIDŮ NA ERYTROCYTÁRNÍ ACHE (IC₅₀)

4.4.1. Materiál

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

4.4.2. Podmínky měření

Experimenty byly prováděny:

při teplotě 25°C

v prostředí PB,

při pH 7,4,

při vlnové délce spektrofotometru 436 nm

v jednorázových plastových kyvetách o tloušťce 1 cm.

4.4.3. Stanovení hodnot IC₅₀^{75, 76}

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

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

4.4.4. Výsledky a jejich matematické zpracování

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

Tabulka 6: Výsledky testu vlivu protopinu na aktivitu AChE

Látka	IC_{50} [M]	95% konfidenční interval [M]
Protopin	0,00112	$8,6 - 13,8 \times 10^{-4}$

Hodnoty se udávají např.: 0,221 (0,177 – 0,277), čísla v závorce znamenají rozpětí hodnoty IC_{50} které je tím větší, čím byla měření zatížena větší chybou. Hodnota směrnice znázorňuje „strmost“ lineární části průběhu křivky IC_{50} a poskytuje tak podrobnější informaci o průběhu inhibice; tato hodnota nahrazuje hodnoty IC_{25} a IC_{75} (popř. jiné), které bývají pro tento účel obvykle používány.

Z naměřených hodnot je patrné, že protopin vykazuje slabou inhibiční aktivitu vůči AChE.

5. DISKUSE

Léčba Alzheimerovy choroby je záležitost velmi svízelná a problematická; tato choroba je totiž komplexem řady patofyziologických procesů, z nichž některé na sebe navazují, některé působí zcela separátně. V současné době je hlavním terapeutickým zásahem zásah do aktivity mozkové acetylcholinesterasy. Řada sloučenin má cholinomimetické účinky velmi příznivé, prakticky jsou však bohužel nepoužitelné. Tyto účinky jsou nejen centrální, ale i periferní. Z přírodních látek přichází v úvahu pouze několik málo sloučenin; v současné době začíná být využíván jen galanthamin (Reminyl®). Velmi intenzivně se pracuje na různých galanthaminových derivátech.⁷⁷ Fysostigmin, který je významným cholinomimetikem, je těžko použitelný kvůli svým nežádoucím účinkům. Další velmi perspektivní přírodní látkou je alkaloid izolovaný z některých zástupců čeledi Lycopodiaceae- huperzin A. Podává se v podstatně nižších dávkách než galanthamin; jeho dosažitelnost je však současné době poněkud obtížnější, než u jiných přírodních látek. Nicméně rozsáhlé syntetické studie dokazují, že tato látka je přístupná totální syntézou.⁷⁸ Tato látka je velkou nadějí, protože syntetické látky v současnosti používané (takrin, donepezil (Aricept®)) nenaplňují terapeutické potřeby podle našich představ; takrin je v této době prakticky už léčivem „mrtvým“.

Z těchto důvodů probíhá intenzivní výzkum jak syntetických, tak přírodních látek, s ohledem na jejich schopnost reverzibilně inhibovat mozkovou AChE. Jako velmi nadějně se kromě různých syntetických látek ukazují i některé další látky; kromě již zmíněného huperzinu Cerebra® (*Huperzia errata*, Lycopodiaceae) je to např. saligenamid C (*Sarcococca saligna*, Buxaceae). Vysoký inhibiční efekt vůči AChE má také ursolová kyselina (*Majorana hortensis*, *Rosmarinus officinalis*, *Salvia officinalis*, Lamiaceae), dále látky typu arisugacinu-arisuguacin A (*Penicillium* sp., $IC_{50} = 1 \times 10^{-6}$ M), α -viniferin (*Caragana chamlague*, Fabaceae, $IC_{50} = 2 \times 10^{-6}$ M), cyklofostin (*Penicillium* WK-4164 e FO-4259). Významné jsou obzvláště látky typu alkaloidů- jak už byl zmíněn např. galanthamin (*Galanthus woronovii*, Amaryllidaceae) a jeho deriváty. Z hlediska preparativního jsou také alkaloidy atraktivní tím, že se s nimi pracuje podstatně lépe, než s neutrálními sloučeninami- lze je rychleji a méně nákladně čistit.

Jednou z rostlin, u které se vyskytly alkaloidy biologicky aktivní vůči AChE je vlašovičnick větší (*Chelidonium majus* L.). V této rostlině byly objeveny alkaloidy 4 typů:⁴⁴

- a) Beznofenanthridinové (α -naftofenanthridinové) alkaloidy jsou charakteristické svým tetracyklickým isochinolonovým kruhovým systémem. Tato skupina se dá rozdělit na 2 podskupiny: 1. alkaloidy obsahující ve své molekule **terciární** dusík (např.

- chelidonin, homochelidonin), 2. alkaloidy s **kvartérním** dusíkem a dvěma centrálními aromatickými prstenci (sanguinarin, chelerythrin).
- b) Protoberberinové alkaloidy jsou zde zastoupeny: 1. tetrahydroporotoberberiny - jsou to **terciární** alkaloidy (např. stylopin) 2. protoberberiny - **kvarterní** alkaloidy (např. berberin, koptisin).
- c) K protopinovým alkaloidům náleží terciární alkaloid protopin (typický pro čeleď Papaveraceae) a allokryptopin.
- d) Kvartérní aporfiny, deriváty benzyloisochinolinu zde zastupuje magnoflorin a spatrein.

Výzkum vlašovičníku se v poslední době poměrně rozšiřuje, patrně z důvodu studia antineoplastického účinku alkaloidní látky **Ukrain** (alkaloidy *Chelidonium majus* L. konjugované s kyselinou thiofosforečnou)⁴⁵ souvislosti s tímto studiem je však sledována řada alkaloidů i na jiné účinky. Např. efekt benzofenanthridinových alkaloidů na lidské keratinocyty,⁷⁹ inhibice 5- a 12- LOX neredoxním mechanismem,⁸⁰ ad. V poslední době je věnována také pozornost vlivu vlašovičnickových alkaloidů na hydrolýzu acetylthiocholinu a acetylcholinestrasu (také podobných alkaloidů izolovaných z *Bocconia cordata*, Papaveraceae), zejména chelidoninu, sanguinarinu, chelerythrinu a také Ukrainu. Ukázalo se, že benzo[c]fenanthridinové alkaloidy (sanguinarin a chelerythrin) jsou poměrně účinné ($IC_{50} = 0,2-0,3$ mM). Zajímavý účinek na inhibici AChE však vykazuje též chelidonin a Ukrain ($IC_{50} = 2-2,5$ mM).⁸¹

V souvislosti se screeningem alkaloidních látek charakteristických pro čeledi Papaveraceae a Fumariaceae, který je prováděn na katedře farmaceutické botaniky a ekologie, byl proveden pokus o izolaci alkaloidů z vlašovičníku s cílem podrobit tyto látky testování vlivu na erytrocytární AChE a v pozdější době na prolylendopeptidasu a na některé další enzymové systémy. K této izolaci bylo použito 41,8 kg celé sušené rostliny (nať a kořeny). Základní izolační postup byl použit jak je uvedeno v literatuře profesorem Slavíkem,^{51,55} jehož pracovní skupina se alkaloidy z čeledi Papaveraceae (pouze z preparativního hlediska) zabývala v 50.-70.tých letech 20. století. Pro tyto izolace používala pracovní skupina sofistikovanou a velice logickou metodu: rostlinná část byla extrahována methanolem nebo ethanolem, po odstranění rozpouštědla byl odparek roztřepán se slabým roztokem kyseliny sírové a zfiltrován. Prakticky neutrální alkaloidy a neutrální znečištěniny byly odstraněny vytřepáním tohoto kyselého roztoku etherem, vodná vrstva byla zalkalizována uhličitanem sodným na pH cca 9-10, vyloučené alkaloidy vytřepány diethyletherem. Takto vznikl výtřepek A, ze kterého byly po okyselení a přidání kyanidu

draselného odděleny pseudokyanidy benzofenanthridinových alkaloidů. Posléze byly odděleny i fenolické alkaloidy. Po okyselení a přidavku kyseliny chlorovodíkové vznikly chloridy nerozpustné ve vodě, které byly dále vytěpávány chloroformem. Zbývá vodná fáze obsahovala chloridy nerozpustné v chloroformu. Ve formě chloridu nerozpustného v chloroformu se vyskytovaly protopinové alkaloidy - především protopin a allokryptopin. Jejich oddělení frakční krystalizací, jak ji popisuje Slavík, však nepřineslo látky zcela čisté a proto byla k definitivnímu čištění alkaloidů použita sloupcová chromatografie, která je zde originálním postupem.

Já jsem se dále zabývala pouze protopinem. Provedla jsem sloupcovou chromatografii na neutrálním oxidu hlinitém (eluční soustava benzín+chloroform). Získala jsem 7 souhrnných frakcí (1-17, 18-23, 24-25, 26-27, 28-30, 31-37, 38-44). Protože se frakce 28-30 jevila jako nejbohatší z hlediska obsahu alkaloidů, byla podrobena krystalizaci ze směsi chloroform- ethanol. Vzniklo 0,92 g bílých prizmatických jehlic.

Předpokládala jsem, že na základě údajů z literatury, že vyloučený alkaloid bude **protopin**. Proto jsme provedla tenkovrstvou chromatografii (Kieselgel F₂₅₄, S1, komora nasycená, Dragendorffovo činidlo) za použití standardu protopinu. Ukázalo se, že můj předpoklad byl správný, o čemž svědčilo i chování zkoumané látky na vrstvě silikagelu (při 254 nm zháší fluorescenci, což dělají protopinové alkaloidy). Z porovnání některých fyzikálně chemických charakteristik s údaji v literatuře se tedy potvrdilo, že izolovanou látkou je opravdu protopin.

Dále byl proveden test vlivu alkaloidu na aktivitu erytrocytární acetylcholinesterasy. Pokles aktivity je úměrný použité koncentraci inhibitoru. Stanovení aktivity enzymu probíhá na základě rozkladu ACh acetylcholinesterasou na kyselinu ocotvou a cholin a je ho následně navázání na DTNB. Měří se pak absorbance, která je úměrná aktivitě erytrocytární acetylcholinesterasy. Měření byla opakována pro každou koncentraci testované látky nejméně třikrát.

U protopinu byly naměřeny tyto hodnoty: $IC_{50} = 1,12 \times 10^{-3}$ M, 95% konfidenční interval = $8,6-13,8 \times 10^{-4}$. Protopin tedy vykazuje slabou inhibiční aktivitu vůči AChE.

V literatuře je protopin popisován jako o látka s účinkem analgetickým, antialergickým, protizánětlivým, choleretickým.⁸² Dále bylo prokázáno, že protopin blokuje nejen uvolňování nitrobuněčného Ca^{2+} , ale i vstup extracelulárního Ca^{2+} do buněk. Tím brání nadměrnému dráždění buněk a způsobuje vaso-, bronchodilataci a má spasmolytické účinky na buňky hladkého svalstva. Protopin ovlivňuje kardiovaskulární systém navíc ještě svým antiarytmickým a negativně inotropním efektem.⁸³ Inhibuje mikrosomální enzymy a má

hepatoprotektivní účinky (snižuje hladiny aminotransferas). Některé studie uvádějí i inhibiční účinek protopinu na GABA-transaminasy (u lidí)⁸⁴, serotoninový a noradrenalinový transporter a s tím související antidepresivní účinek protopinu (u myši). Navíc také snižuje hladinu glutamátu a zvyšuje aktivitu glutamátdehydrogenasy.⁸⁵ Do jaké míry se mohou tyto účinky projevit v z hlediska ovlivnění neurodegenerativních procesů není dosud známo.

Některé studie zkoumají ovlivnění aktivity acetylcholinesterasy protopinovými alkaloidy, především protopinem a allokryptopinem.⁸⁶ Kim D.K. a spol. naměřili inhibiční aktivitu protopinu vůči AChE: $IC_{50} = 1,61 \times 10^{-5} \text{ M}$ ⁸⁶; neupřesňují ale, zda použili AChE lidskou, či zvířecí, ani zda pochází z mozku či z erytrocytů. Na katedře botaniky a ekologie jsme provedli stanovení inhibiční aktivity protopinu na lidskou erytrocytární AChE: $IC_{50} = 1,12 \times 10^{-3} \text{ M}$. Z porovnání výsledků soudím, že Kim D.K. a spol. použili ke zkoumání AChE jinou. Přestože tedy už bylo zkoumáno IC_{50} protopinu vůči AChE, musela jsem to na tomto dostupném a relativně stálém a snadno čerstvě získatelném modelu provést znovu, protože z hlediska vytvoření knihovny těchto alkaloidů, resp. použití výsledků na matematický model hledání optimální látky to musí být uděláno na jednom biologickém modelu pokud možno s co nejmenšími odchylkami.

Ačkoli tedy protopin vykazuje slabý inhibiční efekt vůči acetylcholinesterase, nezdá se, že by mohl být, např. v porovnání s galanthaminem ($IC_{50} = 1,26 \times 10^{-6}$)⁸⁷ či fysostigminem ($IC_{50} = 1,26 \times 10^{-6}$)⁸⁷ výchozí látkou pro další studium z hlediska ovlivňování aktivity neurodegenerativních procesů, které se odrážejí v mozkovém cholinergním systému.

6. SOUHRN

Spolu s ostatními kolegyněmi (Šárkou Brožovou, Janou Nagyovou a Evou Vítkovou) jsem provedla extrakci 41,8 kg suché nati s kořeny. Primární extrakt jsme vyčistily filtrací a následným oddestilováním rozpouštědla na vakuové odparce. S Evou Vítkovou jsme se dále zabývaly výtřepkem A, ze kterého jsme, po odstranění benzofenanthridinových alkaloidů ve formě pseudokyanidů) a fenolických alkaloidů, a okyselení získaly chloridy. Ve formě chloridů nerozpustných v chloroformu se vyskytovaly protopinové alkaloidy: především protopin a allokryptopin.

Provedly jsme sloupcovou chromatografií směsi alkaloidů, jejichž chloridy jsou nerozpustné v chloroformu. Já jsem se dále zabývala frakcí 28-30, ze které jsem po vykrystalizování ze směsi rozpouštědel získala 0,92 g bílých jehlic. Změřila jsem teplotu tání a provedla chromatografií se standardem protopinu. Na vrstvě silikagelu daná látka při 254 nm zhasela fluorescenci. Všechny provedené reakce prokázaly, že se jedná o protopin.

V závěru práce byl proveden test vlivu protopinu na aktivitu AChE. Z naměřené hodnoty $IC_{50} = 1,12 \times 10^{-3}$ M je patrné, že protopin slabě inhibuje aktivitu AChE.

7. LITERATURA

¹ <http://www1.lf1.cuni.cz/~zfisar/bp/8.2.htm>

² <http://www.causa-subita.cz/clanek.php?akce=view&clanekid=255&r=6&c=2>

³ Hartl, J., Palát, K.: Farmaceutická chemie I. Nakladatelství Karolinum, Praha 2001, s. 6- 7.

⁴ Lincová, D., Farghali, H. et al.: Základní a aplikovaná farmakologie, kap. 4, Vývoj a registrace nových léčiv, vydání 1., Galén, 2002.

⁵ http://66.249.93.104/search?q=cache:65ne-j0Y75sJ:www.zdravcentra.cz/cps/rde/xbcr/zc/2005_6_FTP_03.pdf+du%C3%A1ln%C3%AD+inhibitor&hl=cs&ct=clnk&cd=2

⁶ <http://www.stopstigmapsychiatrie.cz/alzheimer/index.html>

⁷ Opletalová, V., Opletal, L., Kuča, K., Jun, D.: Sborník Abstraktů z 34. konference Syntézy a Analýzy léčiv: Pokroky ve vývoji cholinergik pro léčbu Alzheimerovy choroby, Brno, 12.- 14. 9. 2005, s. 27.

⁸ Silbernagl, S., Lang, F.: Atlas patofyziologie člověka. Grada Publishing, spol. s.r.o., Praha 2001, s. 348-349.

⁹ Patočka, J.: Memantin a jeho terapeutický potenciál u degenerativních poruch CNS. Psychiatrie, **6** (1), 35–40 (2002).

¹⁰ Lincová, D., Farghali, H. et al.: Základní a aplikovaná farmakologie, kap. 7, Látky ovlivňující centrální nervový systém, vydání 1., Galén, 2002.

¹¹ <http://www.tigis.cz/PSYCHIAT/SUPL0102/04.htm>

¹² Momonoki, Y., Oguri, S., Kato, S., Kamimura, H.: Studies on the mechanism of salt tolerance in *Salicornia europaea* L. III. Salt accumulation and ACh function. Nippon Sakumotsu Gakkai Kiji, **65**(4), 693-699 (1996).

¹³ Jiráček, R.: Současné trendy v biologické terapii Alzheimerovy choroby. Psychiatrie pro praxi, 2006, s. 8-11

¹⁴ Grieg, N. H., Lahiri, D. K., Sambamurti, K.: Butyrylcholinesterase: an important new target in Alzheimer's disease therapy. Int Psychogeriatr., **14** (suppl 1), 77-91 (2002).

¹⁵ Giacobini, E.: Cholinesterases: new roles in brain function and in Alzheimer's disease, Neurochem. Res. **28**(3-4), 515-22 (2003).

¹⁶ Ivách, B., Haen, E.: Acetylcholinesterase inhibition in Alzheimer's disease. Curr. Pharm. Des., **10** (3), 231-251 (2004).

-
- ¹⁷ Gauthier, S., Emíre, M., Farlow, M. R., Bullock, R., Grossberg, G. T., Potkin, S. G.: Strategie for continued successful treatment of Alzheimer's disease: switching cholinesterase inhibitors. *Curr Med Res Opin.*, **19** (8), 707-14 (2003).
- ¹⁸ Liston, D. R., Nielsen, J. A., Villalobos, A., Chapin, D., Jones, S. B., Hubbard, S. T., Shalaby, I. A., Ramirez, A., Nason, D., White, W. F.: Pharmacology of selective acetylcholinesterase inhibitors: implications for use in Alzheimer's disease. *Eur J Pharmacol.*, **486** (1), 9-17 (2004).
- ¹⁹ Abe, Y., Aoyagi, A., Hara, T., Abe, K., Zamazali, R., Kumage, Y., Naruto, S., Koyama, K., Marumoto, S., Tago, K., Toda, N., Takami, K., Yamada, N., Ori, M., Kogen, H., Kaneko, T.: Pharmacological characterization of RS-1259 an orally active dual inhibitor of acetylcholinesterase and serotonin transporter, in rodents: possible treatment of Alzheimer's disease. *J Pharmacol Sci.*, **93** (1), 95-105 (2003).
- ²⁰ Toda, N., Tago, K., Marumoto, S., Takami, K., Ori, M., Yamada, N., Koyama, K., Naruto, S., Abe, K., Zamazali, R., Hara, T., Aoyagi, A., Abe, Y., Kaneko, T., Kogen, H.: A conformational restriction approach to the development of dual inhibitor of acetylcholinesterase and serotonin transporter as potential agents for Alzheimer's disease. *Bioorg Med Chem.*, **11** (20), 4389-415 (2003).
- ²¹ Mucke, H. A. M.: Preclinical studies with galanthamine. *Drugs Today*, **33**(4), 259-264 (1997)
- ²² <http://www.tigis.cz/PSYCHIAT/SUPL0102/04.htm>
- ²³ Maelicke, A.: Allosteric modulation of nicotinic receptors as a treatment strategy for Alzheimer's disease. *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders*, **11** (Suppl. 1), 11-18 (2000).
- ²⁴ Opletal, L., Opletalová, V., Jun, D., Kuča, K.: Sborník abstraktů z 34. konference Syntézy a analýzy léčiv: Současné uplatnění některých přírodních látek v terapii demencí Alzheimerova typu, Brno, 12.- 14.září, 2005, s. 26.
- ²⁵ <http://www.aislp.cz>
- ²⁶ <http://www.tigis.cz/PSYCHIAT/PSYCH299/10svestk.htm>
- ²⁷ Mills, C., Clary, B. L., Gilmer, J. F., Walsh, J. J.: Inhibition of acetylcholinesterase by Tea Tree Oil. *J Pharm Pharmacol.*, **56** (3), 375-9 (2004).
- ²⁸ Zaheer-Ul-Haq, Z. U., Wellenzon, B., Riedl, K. R., Rode, B. M.: Molecular docking studies of natural cholinesterase-inhibiting steroidal alkaloids from *Sarcococca saligna*. *J Med Chem.*, **46** (28), 5087-90 (2003).

-
- ²⁹ Orhan, I., Terzioglu, S., Sener, B.: Sloha-onoceri: an acetylcholinesterase inhibitor from *Lycopodium clavatum*. *Planta Med.*, **69** (3), 265-7 (2003).
- ³⁰ Lamirault, L., Guillou, C., Thal, C., Simon, H.: (-)-9-dehydrogalanthaminium bromide, a new cholinesterase inhibitor, enhances place and object recognition memory in young and old rats. *Neurobiol Lezen Mem.*, **80** (2), 113-22 (2003).
- ³¹ Piotrovsky, V., Van Peer, A., Van Osselaer, N., Armstrong, M., Aerens, J.: Galanthamine population pharmacokinetics in patients with Alzheimer's disease: modeling and stimulations. *J Clin Pharmacol.*, **43** (5), 514-23 (2003).
- ³² Corey-Bloom, J.: Galanthamine: a review of its use in Alzheimer's disease and vascular dementia. *Int J Clin Pract.*, **57** (3), 219-23 (2003).
- ³³ Simon, B. B., Knuckley, B., Powell, D. A.: Galantamine facilitates acquisition of a trace-conditioned eyeblink response in healthy, young rabbits. *Lezen Mem.*, **11** (1), 116-22 (2004).
- ³⁴ Wang, L. S., Zhou, J., Shao, X. M., Tang, X. C.: Huperzine A attenuates cognitive deficits and brain injury after hypoxia-ischemic brain damage in neonatal rats. *Zhonghua Er Ke Za Zhi.*, **41** (1), 42- 5 (2003).
- ³⁵ Zangara, A.: The psychopharmacology of huperzine A: an alkaloid with cognitive enhancing and neuroprotective properties of interest in the treatment of Alzheimer's disease. *Pharmacol Biochem Nebav.*, **75** (3), 675-86 (2003).
- ³⁶ Kelly, S. A., Foricher, Y., Mann, J., Bentley, J. M.: A convergent approach to huperzine A and analogues. *Org biomol Chem.*, **1** (16), 2865-76 (2003).
- ³⁷ Jin, G., Luo, X., He, X., Jian, H., Zhang, H., Bai, D.: Synthesis and docking studies of alkylene-linked dimers of (-)-huperzine A. *Arzneimittelforschung.*, **53** (11), 753-7 (2003).
- ³⁸ Darvesh, S., Walsh, R., Martin, E.: Enantiomer effects of huperzine A on the aryl acylamidase activity of human cholinesterases. *Cell Mol Neurobiol.*, **23** (1), 93-100 (2003).
- ³⁹ Cordato, D. J., Mather, L. E., Herkes, G. K.: Stereochemistry in clinical medicine: a neurological perspective. *J Clin Neurosci.*, **10** (6), 649-54 (2003).
- ⁴⁰ Park, Ch. H., Kim, S. H., Choi, W. L., Young J., Kim, J. S., Kang, S.S., Suh, Y. H.: Novel anticholinesterase and anti-amnesic activities of dehydroevodiamine, a constituent of *Evodia rutaecarpa*. *Planta Med.*, **62**(5), 405-409 (1996)

-
- ⁴¹ Sung, S. H., Kang, S. Y., Lee, K. Y., Park, M. J., Kim, J. H., Park, J. H., Kim, Y. Ch., Kim, J., Kim, Y. Ch.: (+)- α -Viniferin, a stilbene Trimer from *Caragana chamlague*, inhibits acetylcholinesterase. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, **25**(1), 125-127 (2002).
- ⁴² <http://www.pace.cz/source.php?id=15&page=1>
- ⁴³ <http://www.kvetenacr.cz/detail.asp?IDdetail=158>
- ⁴⁴ Blaschek, W., Ebel, S., Hackenthal, E., Holtzgrabe, U., Kellner, K., Reichling, J., Schnetz, V. et al.: *Hager ROM 2004: Hager's Handbuch der Drogen und Arzneistoffe*, Springer & Info II Uni. Würzburg, Würzburg, 2005.
- ⁴⁵ Táborská, E., Bochořáková, H., Dostál, J., Paulová, H. : Vlaštovičník větší (*Chelidonium majus* L.)- přehled současného stavu poznatků. *Čes. a Slov. Farm.*, **44** (2), 71-75 (1995).
- ⁴⁶ Hejný, S., Slavík, B.: *Květena České republiky 1, 2.vydání*, Academica, Praha 1997.
- ⁴⁷ Tomko, J., a kol.: *Farmakognozia, učebnice pre farmac. Fakulty, 2. opravené vydanie*, vydavateľstvo Osveta, Martin 1999, s. 344.
- ⁴⁸ Dostal, J., Slavik, J.: Some aspects of the chemistry of quaternary benzo[c]phenanthridine alkaloids. *Studies in Natural Products Chemistry*, 27 (Bioactive Natural Products ,Part H) 2002, s. 155-184.
- ⁴⁹ Then, M., Szentmihályi, K., Sarkozi, A., Illes, V., Forgacs, E.: Effect of sample handling on alkaloid and mineral content of aqueous extracts of greater celandine (*Chelidonium majus* L.). *J. Chromatogr.*, 889 (1+2), 69-74 (2000).
- ⁵⁰ Slavík, J., Slavíková, L.: Alakloidy rostlin makovitých (*Papaveraceae*) II. Dělení chelerythrinu a sanguinarinu a nélez dvou nových alkaloidů ve vlaštovičníku (*Chelidonium majus* L.). *Chemické listy*, 48, 1382-86 (1954)
- ⁵¹ Slavík, J., Slavíková, L.: Minor alkaloids from *Chelidonium majus* L. *Collection Czechoslov. Chem. Commun.*, 42, 2686 – 93 (1977).
- ⁵² Rogeli, B., Popovic, T., Ritonja, A., Strukelj, B., Brzin, J.: Chelidocystatin, a novel phytocystatin from *Chelidonium majus*. *Phytochemistry*, **49**(6), 1645-1649 (1998).
- ⁵³ Shafiee, A., Jafarabadi, A. H.: Corydine and norcorydine from the roots of *Chelidonium majus*. *Planta Med.*, **64** (5), 489 (1998).

-
- ⁵⁴ Kim, M. S., Hwang, B. Y., Choe, S. G., Lee, M. K., Ro, J. S., Lee, K. S.: Alkaloidal components of *Chelidonium fructus*. *Saengyak Hakhoechi*, **31** (4), 390-393 (2000).
- ⁵⁵ Slavík, J.: Alkaloidy rostlin makovitých (Papaveraceae) I.- Látky z vlaštovičniku (*Chelidonium majus* L.) *Českosl. Farm.*, 1, 15-17 (1954).
- ⁵⁶ Nikolic, M.B., Lepojevic, Z.D., Veresbaranji, I.I: Examination of oil of celandine (*Chelidonium majus* L.) seeds. *Acta Periodica Technologica*, 31(Pt. B), 661-665 (2000).
- ⁵⁷ Sarkozi, A., Then, M., Szentmihalyi, K.: Mineral element content of greater celandine (*Chelidonium majus* L.). *Acta Alimentaria*, **34** (2), 113-120 (2005).
- ⁵⁸ Szentmihalyi, K., Sarkozi, A., Then, M.: Variations in macro-and microelements content as well as in alkaloids in *Chelidonium majus* L. plant and its extract. *Olaj, Szappan, Kosmetika*, **51** (1), 33-37 (2002).
- ⁵⁹ Buzyk, G. N., Lovkova, M. Y., Sokolova, S. M., Tyutekin, Y. V.: Determination of correlations between the content of alkaloids and the content of mineral and trace elements with the help of mathematical modeling. *Doklady Akademii Nauk.*, **376** (5), 690-93 (2001).
- ⁶⁰ Kuznetsova, L. P., Nikol'skaya, E. B., Sochilina, E. E., Faddeeva, M. D.: Inhibition of enzymatic hydrolysis of acetylthiocholine with acetylcholinesterase by principal alkaloids isolated from *Chelidonium majus* and *Macleaya* and by derivative drugs. *Tsitologiya*, **43**(11), 1046-1050 (2001).
- ⁶¹ Ulrichová, J., Walterová, D., Preninger, V., Šimánek, V.: Inhibition of butyrylcholinesterase activity by some isochinoline alkaloids. *Planta Med.*, 48, 174-77 (1983).
- ⁶² Doc. Opletal, dosud nepublikováno
- ⁶³ Zahrychuk, O.: Austria Ukrain, a thiophosphoric acid derivative of alkaloids of *Chelidonium majus* L., is effective in the treatment of recurrent bronchopulmonary pathology in children from areas contaminated after the chernobyl accident. *International Journal of Immunotherapy*, **19** (2-4), 47-53 (2003).
- ⁶⁴ Lisnyak, O.I., Lozjuk, R.M.: Biological activity of some thiophosphamide derivates of alkaloids with respect of influenza virus. *Drugs Exp. Clin. Res.*, **22**(3/4/5), 225-228 (1996).
- ⁶⁵ Daniel, K., Schmalz, D.: *Das Schöllkraut*, Hippokrates Verlag, Stuttgart, 1939.
- ⁶⁶ Baumann, J. Ch. "Med. Mschr. 29, 173 (1975).

-
- ⁶⁷ Khaimskii, Z. M.: Agent for treating periodontal and gingival diseases and method for producing the remedy. Russ. RU 2167641 C2 27, květen 2001, No pp. given (Rusko).
- ⁶⁸ Jagiello-Wojtowicz, E., Klacinski, Z., Chodovská, A., Feldo, M.: Effects of alkaloids from *Chelidonium majus* L. on the protective activity of antiepileptic drugs in mice. *Herba Pol.*, **44** (4), 383-385 (1998).
- ⁶⁹ Lutsyk, M., Wai, L. K., Osyp, Y., Stoika, R.: Mitogen stimulated human lymphocytes as target cells in testing substances for antiproliferative activity. *Eksperymental'na ta Klinichna Fiziologiya i Biokhimiya*, (1), 19-24 (2005)
- ⁷⁰ Jang, S. I., Kim, B. H., Lee, W. Y., An, S. J., Choi, H. G., Jeon, B. H., Chung, H. T., Rho, J. R., Kim, Y. J., Chai, K. Y.: Stylopine from *Chelidonium majus* inhibits LPS-induced inflammatory mediators in RAW 264.7 cells. *Archives of Pharmacal Research*, **27** (9), 923-29 (2004)
- ⁷¹ Kim, S. R., Hwang, S. Y., Jang, Y. P., Park, M. J., Markelonis, G. J., Oh, T. H., Kim, Y. Ch.: Protopine from *Corydalis ternata* has anticholinesterase and anti-amnesic activities. *Planta Med.*, **65**(3), 218-221 (1999)
- ⁷² Stahl, E.: *Thin-layer Chromatography, A Laboratory Handbook*; Springer – Verlag Berlin, Heidelberg, New York 1999, str. 873
- ⁷³ Slavík, J., Slavíková, L.: Alkaloide der Mohngewächse (*Papaveraceae*) XVII. Über neue Alkaloide aus *Sanguinaria canadensis* L. *Coll. Czech Chem. Commun.* **25**, 1667-1675 (1960)
- ⁷⁴ Český lékopis 2005 Doplněk 2006, elektronická verze, Grada Publ. A. s., Praha 2006.
- ⁷⁵ Bajgar J.: Stanovení aktivity cholinesteráz v lidské krvi – možná modifikace pro polní použití. *Vojenské zdravotnické listy* (1972) **XLI** (2), 78-80 (1972).
- ⁷⁶ Ellman G. L., Courtney D. K., Andres V., Featherstone R.M.: A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* **7**, 88-95 (1961).
- ⁷⁷ Bores, G. M., Kosley, R. W., Jr.: Galanthamine derivatives for the treatment of Alzheimer's disease. *Drugs Fut.*, **21** (6), 621-35 (1996).
- ⁷⁸ Tang, X. C., He, X. C., Bai, D. L.: Huperzin A: a novel acetylcholinesterase inhibitor. *Drugs Fut.*, **24** (6), 647-63 (1999).
- ⁷⁹ Vavřečková, C., Gawlik, I., Mueller, K.: Benzophenanthridine alkaloids of *Chelidonium majus*, Part 2. Potent inhibitory action against the growth of human keratinocytes. *Planta Med.*, **62** (6), 491-94 (1996).

-
- ⁸⁰ Vavřečková, C., Gawlik, I., Mueller, K.: Benzophenanthridine alkaloids of *Chelidonium majus*, Part 1, Inhibition of 5- and 12-lipoxygenase by a non-redox mechanism. *Planta Med.*, **62** (5), 397-401 (1996).
- ⁸¹ Kuznetzova, L. P., Nikolskaya, E. B., Sochilina, E. E., Faddeeva, M. D.: Inhibition of enzymatic hydrolysis of acetylcholine with acetylcholinesterase by principal alkaloids isolated from *Chelidonium majus* and *Macleaya* and by derivative drugs. *Tsitologia*, **43** (11), 1046-50 (2001).
- ⁸² Zhang, H.: Chinese patent CN 1579387 (2005). *Dactylicapnos scandens* injection preparation and its preparation method. CAPLUS (Copyright © 2007 ACS on SciFinder ®)
- ⁸³ Li, B., Wu, Q., Sun A., Shi, J., Huang, X.: Effects of protopine on contraction and intracellular free calcium concentration of smooth muscle of thoracic aorta in rats. *Di-San Junyi Daxue Xuebao*, **27**(11), 1097-1099 (2005).
- ⁸⁴ Choi, S.Y., Bang, M.H., Lee, E.J., Kwon, O.S., Kang, T.C., Lee, Y.H., Rho, Y.D., Baek, N.I.: Human brain GABA-T (γ -aminobutyric acid transaminase) inhibitory alkaloids from *Corydalis tuber*. *Agricultural Chemistry and Biotechnology*, **46**(2), 67-72 (2003).
- ⁸⁵ Kwan Ho, L., Jae-Wan, H., Myung-Min, Ch., Seung Yong, Y., Seung-Ju, Y.: *Experimental and Molecular Medicine* **37**(4), 371-377 (2005).
- ⁸⁶ Kim, D.K., Lee, K. T., L., Baek, N.-I., Kim, S.-H., Park, H. W., Lim, J. P., Shin, T. Y., Eom, J. S.: Acetylcholinesterase inhibitors from the aerial parts of *Corydalis speciosa*. *Archives of Pharmacal Research*, **27**(11), 1127-1131 (2004).
- ⁸⁷ Tang, X.C., He, X.C., Bal, D.L.: Huperzine A: novel acetylcholinesterase inhibitor. *Drugs of the Future* 1999, **24**(6): 647-663

Abstrakt

Kubincová, D.: Biologická aktivita obsahových látek rostlin XIV.; Vliv alkaloidů z *Chelidonium majus* L. na acetylcholinesterasu. Rigorózní práce, Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hr. Králové, 74 stran.

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

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

Zabývala jsem se dělením alkaloidů připravených z chloridů nerozpustných v chloroformu; z této směsi jsem kombinací sloupcové a tenkovrstvé chromatografie izolovala protopin ve formě baze (porovnáním s autentickým standardem a porovnáním fyzikálně-chemických charakteristik izolované látky s údaji v literatuře).

Biologická aktivita (inhibice lidské erytrocytární acetylcholinesterasy) byla IC_{50} $1,12 \cdot 10^{-3}$ M. V porovnání s biologickou aktivitou standardních alkaloidních inhibitorů acetylcholinesterasy (galanthaminu a fysostigminu) se jedná o látku, která je spíše nezajímavá z hlediska dalšího studia přírodních látek, které by se mohly uplatnit jako výchozí struktury pro studium potenciálních léčiv vůči Alzheimerově chorobě.

Abstract

Kubincová, D.: Biological activity of plant metabolites XIV; Influence of alkaloids from *Chelidonium majus* L. on acetylcholinesterase. Rigorous work, Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy Hradec Králové, 74 pp.

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

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

The isolated compound inhibited the human erythrocytic acetylcholinesterase with $IC_{50} 1,12 \cdot 10^{-3}$ M. Comparing its biological activity with that of standard alkaloid inhibitors (galanthamine and physostigmine) the isolated substance is not very interesting regarding further studies of natural products that could serve as lead compounds for the development of potential drugs against the Alzheimer's disease.

