

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

RIGORÓZNÍ PRÁCE

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

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

Školitel : doc. RNDr. Lubomír Opletal, CSc.

Maršov, 27. srpna 2007

Mgr. Eva Vítková

Poděkování:

Chtěla bych poděkovat panu doc. RNDr. Lubomíru Opletalovi, CSc. za jeho trpělivost, cenné odborné rady, poskytnuté materiály a vedení během práce na mé rigorózní práci. Dále panu Mgr. Danielu Junovi, Ph.D. z Univerzity obrany v Brně, fakulty vojenského zdravotnictví v HK za provedení testu vlivu mojí izolované látky na aktivitu AChE a v neposlední řadě pak kolektivu katedry farmaceutické botaniky a ekologie za příjemné prostředí a pomoc při řešení technických problémů.

OBSAH

1.	ÚVOD	8
2.	CÍL PRÁCE	13
3.	TEORETICKÁ ČÁST	15
3.1.	Alzheimerova choroba a její terapie	16
3.1.1.	Alzheimerova choroba	16
3.1.2.	Terapie AD	17
3.1.2.1.	Inhibitory mozkových cholinesteras	18
3.1.2.2.	Inhibitory NMDA receptorů	20
3.1.2.3.	Nové nadějně přístupy k léčbě AD	21
3.1.3.	Fytoterapie AD	21
3.1.3.1.	Látky ovlivňující osud ACh a AChE	21
3.1.3.2.	Inhibitory ACAT	23
3.1.3.3.	Látky ovlivňující produkci anuloиду	23
3.1.3.4.	Neuroprotektiva	23
3.1.3.5.	Inhibitory propylendopeptidasy (PEPI)	23
3.2.	<i>Chelidonium majus</i> L. (vlastovičník větší)	25
3.2.1.	Synonyma	25
3.2.2.	Systematika	26
3.2.3.	Botanický popis	26
3.2.4.	Ekologie a cenologie	28
3.2.5.	Celkové rozšíření	28
3.2.6.	Rozšíření v ČR	28
3.2.7.	Drogy získávané z <i>Chelidonium majus</i> L.	28
3.3.1.	Chelidonii radix (kořen vlastovičníku většího)	28
3.3.2.	Chelidonii herba (nať vlastovičníku většího)	29

3.4. Obsahové látky <i>Chelidonium majus</i> L.	30
3.4.1. Alkaloidy	30
3.4.1.1. Alkaloidy podle chemické struktury	30
3.4.1.2. Alkaloidy kořene	34
3.4.1.3. Alkaloidy nati	37
3.4.1.4. Alkaloidy plodu	39
3.4.1.5. Alkaloidy semen	39
3.4.2. Ostatní látky	40
3.4.2.1. Rostlinné kyseliny	40
3.4.2.2. Minoritní složky	41
3.5. Biologická aktivita obsahových látek	42
3.5.1. Metody studia aktivity rostlinných látek na AChE a BuChE	42
3.5.1.1. Atomová silová mikroskopie (AFM) a silová spektra (FS)	42
3.5.1.2. TLC	42
3.5.2. Inhibice BuChE některými isochinolinovými alkaloidy	43
3.6. Farmakologické účinky rostliny <i>Chelidonium majus</i> L.	45
3.6.1. Protinádorové a antivirové působení	45
3.6.2. Hepatotropní spasmolytické účinky	46
3.6.3. Biologické účinky hlavních obsahových látek	47
3.7. Využití <i>Chelidonium majus</i> L.	50
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST A VÝSLEDKY	51
4.1. Všeobecné postupy	52
4.1.1. Destilace a odpařování	52
4.1.2. Chromatografie	52
4.1.2.1. Tenkovrstvá chromatografie	52
4.1.2.2. Sloupcová chromatografie	52

4.2. Materiál a vybavení	52
4.2.1. Rozpouštědla, chemikálie a standardní látka	52
4.2.2. Chemikálie a materiál ke stanovení účinku erythrocytární AChE (IC ₅₀)	53
4.4.1. Přístroje	53
4.2.4. Detekční činidla	54
4.2.5. Chromatografické adsorbenty	54
4.2.6. Vyvíjecí soustavy pro tenkovrstvou chromatografii	55
4.3. Postup extrakce alkaloidů z <i>Chelidonium majus</i> L.	55
4.3.1. Původ drogy	55
4.3.2. Příprava extraktu a jeho čištění	55
4.3.3. Příprava alkaloidního výtřepku A z primárního extraktu	56
4.3.4. Čištění surového výtřepku A	56
4.3.5. Příprava pseudokyanidů	56
4.3.6. Separace výtřepku A po odstranění benzofenantridinových bazí	57
4.3.7. Příprava fenolických alkaloidů z výtřepku A	57
4.4. Příprava vyčištěného výtřepku A	57
4.4.1. Příprava chloridů nerozpustných ve vodě z výtřepku A a alkaloidů z nich	58
4.4.2. Příprava alkaloidů z chloridů rozpustných v chloroformu (AC)	58
4.4.3. Příprava alkaloidů z chloridů nerozpustných v chloroformu (AD)	58
4.5. Dělení směsi alkaloidů z chloridů nerozpustných v chloroformu (AD)	61
4.5.1. Čištění frakcí 38-44 (allokryptopin)	62
4.6. Stanovení účinku alkaloidů na erythrocytární AChE (IC₅₀)	63
4.6.1. Podmínky měření	63
4.6.2. Stanovení hodnot IC ₅₀	63

4.7. Matematické zpracování experimentálních dat	63
4.8. Výsledky testu vlivu látky na aktivitu AChE	64
5. DISKUSE	65
6. SOUHRN	71
7. LITERATURA	74
ABSTRAKT / ABSTRACT	81

Zkratky

ACAT	Acetylkoenzym A-cholesterol acyltransferasa
AD	Alzheimerova choroba
ACh	Acetylcholin
AChE	Acetylcholinesterasa
AChEI	Inhibitor(y) acetylcholinesterasy
AFM	Atomová silová mikroskopie
ATP	Adenosintrifosfát
BuChE	Butyrylcholinesterasa
CAT	Cholinacetyltransferasa
Ch	Cholin
COX-2	Cyklooxygenasa-2
CT	Počítačová tomografie
FS	Silová spektra
GABA	Kyselina γ -aminomáselná
HPLC	Vysokotlaká kapalinová chromatografie
ICP	Inductively coupled plasma
IL-1b	Interleukin-1b
IL-6	Interleukin-6
MAO	Monoaminoxidasa
MRI	Magnetická rezonance
nAChR	Nikotinové acetylcholinové receptory
NGF	Nervový růstový faktor
NMDA-receptor	N-methyl-D-aspártátový receptor
PAF	Destičkový aktivační faktor
PEP	Serinové peptidasy
PET	Pozitronová emisní tomografie
PG-E2	Prostaglandin-E2
SFE	Superkritická fluidní extrakce
TLC	Tenkovrstvá papírová chromatografie
TNF α	Tumor necrosis faktor alfa
TRH	Thyrotropin-releasing hormon

1. ÚVOD

V současné době dochází ke zvýšené manifestaci chorob, které ještě před několika desetiletími byly označovány za vzácné až raritní. Děje se tak v důsledku zvyšování standardů zdravotnické péče, zlepšení přežívání dříve smrtících chorob a postupného zvyšování průměrného věku populace. Jedná se především o skupiny chorob podle etiologie označované jako civilizační a primárně idiopatické.

Jako civilizační označujeme ta onemocnění, u kterých lze vysledovat závislost výskytu na změnách, moderních podmínkách života, charakterizovatelné snížením fyzické zátěže, vyšší spotřebou energeticky bohaté stravy s narůstajícím podílem jednoduchých cukrů a tuků, růstem dlouhodobého psychického zatížení s oblibou označované jako chronický stres a v neposlední řadě vyšší výskyt toxických látek v životním prostředí. Lze bezesporu hovořit o epidemii celosvětově vázanou na popsanou formu životního stylu manifestující se onemocněními kardiovaskulárního systému (chronická ischemická choroba srdeční ve všech formách, hypertenze, aterosklerosa a chronické ischemické choroby končetin), gastrointestinálního systému (peptická vředová choroba, funkční obstipace, kolorektální karcinom, nealkoholická steatohepatitida, alkoholická cirhosa), respiračního systému (pneumokoniosy, bronchogenní karcinom, chronická obstrukční plicní nemoc) a celého tkáňového metabolismu (hyperlipidemie, hypercholesterolemie, diabetes mellitus).

Primárně idiopatické choroby jsou sice po vyloučení všech ostatních možností bez známého etiologického činitele, ale například průběh a stupeň astmatu prokazatelně ovlivňuje kvalita ovzduší. Důležitým faktorem je potlačení přirozené selekce populace a následná změna jejího genofondu, který spolu s familiárním výskytem řady chorob, zvyšuje incidenci této skupiny chorob. Jsou to změny neovlivnitelné a proto nezbyvá pohlízet na ně jinak než jako na dlouhodobé vývojové trendy. Jako charakteristické zástupce můžeme označit astma bronchiale, idiopatické střevní záněty typu Crohnovy choroby a ulcerosní kolitidy nebo právě neurodegenerativní onemocnění. Zvyšování průměrně dosahovaného věku potom činí z dříve minoritního, ba často tabuisovaného, okruhu neurodegenerativních chorob příčinu vysoké nemocnosti a úmrtnosti v seniu. Lze říci, že zrádnost těchto onemocnění tkví především ve snížení kvality života geriatrických pacientů, alteraci jejich kognitivních funkcí a celkové degradaci dříve zralé a soběstačné osobnosti.

Neurodegenerativní onemocnění:

- **Parkinsonova choroba**, označována také jako hypertonicko-hypokinetický syndrom, je onemocněním substantia nigra, která ovlivňuje pomocí dopaminergních drah GABAergní buňky striata.

Častou příčinou této choroby bývá dědičná zátěž, která v období mezi středním a vysokým věkem vede k degeneraci dopaminergních neuronů. Onemocnění může být způsobeno také úbytkem pigmentových buněk v mozkových gangliích. Uvádí se mnoho příčin. Projeví se např. i za mnoho let po prodělaném virovém zánětu mozku, po otravách, po dlouhodobé aplikaci antidepresiv, narkotik, jsou popisovány případy poúrazové, souvislosti s rozvojem aterosklerosy. V důsledku toho dochází k zániku buněk substantia nigra, zčásti pravděpodobně apoptosou připisovanou často volným, reaktivním formám kyslíku. K projevení symptomů musí ale dojít k výpadku více než 70 % neuronů substantia nigra. Dochází ke značnému snížení odpovídající dopaminergní inervace a následnými pochody k nadměrné inhibici thalamu. Jistou souvislost vidíme s nedostatečnou činností jater a pohlavních žláz. V posledních letech byla zjištěna v mozkových gangliích abnormálně nízká koncentrace dopaminu, o němž se předpokládá, že přenáší nervové impulzy.

Hlavními příznaky vzniklého nedostatku dopaminu je potlačení volní motoriky, hypokineze, rigor, nekonstantní klidový třes, ohnuté držení těla, zvýšená vagotonie (slinění, pocení, slzení), mimická strnulost, tichá, monotónní a smazaná řeč, mikrografie a nakonec dochází i k dalším poruchám jako např. deprese a demence, které jsou vyvolány dalšími lézemi. Mnoho pacientů umírá cca po 10 letech na bronchopneumonii.

Klasická léčba spočívá v podávání celé řady léků, které obsahují dopamin, dále antihistaminika, anticholinergika. Někdy se přistupuje k operaci mozku a transplantaci tkáně dřeně nadledvinek.

Přírodní medicína podává odvar z kozlíku lékařského, česnek, vitaminy skupiny B. Doporučuje se dieta s omezením cholesterolu. Homeopatika, ajurvédské přípravky, nozody, akupunktura a různé způsoby detoxikace.

- **Alzheimerova choroba (AD)**

Jedná se o nejrozšířenější formu demence vůbec (až 70 %). Náleží mezi několik nejzávažnějších a také nejnákladnějších chorob. Je to progresivně se zhoršující a irreversibilní onemocnění mozku.

Tato choroba byla poprvé popsána na začátku 20. století psychiatrem Aloisem Alzheimerem, který objevil zvláštní formu demence u 51-leté pacientky a sledoval ji 5 let. Je

charakterizována jako progresivní mentální rozpad postupující do takového stupně, že narušuje schopnost se běžně pracovně a společensky uplatnit. Jsou narušeny paměťové a abstraktní myšlenkové procesy. K příznakům patří deprese, zmatené vnímání prostoru a času, neschopnost soustředění a komunikace, ztráta schopnosti udržet moč a stolicí, ztráta paměti, změny osobnosti a prudké změny nálady. Zdraví a celková funkční osobnost se rychle zhoršují, až je člověk naprosto neschopen samostatně fungovat.

Příčiny AD mohou být genetické, virové, zánětlivé, zhoršení činnosti mozku nebo snížená funkce neurotransmiterů. Můžeme ji rozdělit na onemocnění familiární, tedy dědičné, a na sporadické onemocnění vyššího věku, které představuje asi 80% výskytu AD, kde se příčiny nemoci se přičítají nedostatečnému přísunu živin do mozku (hlavně vitaminy skupiny B, zinku, antioxidačních vitaminů A,E a karotenoidů, deficit selenu bóru a draslíku). To úzce souvisí se špatným vnitřním střevním prostředím - tzv. dysbiózou a následně se sníženou schopností vstřebávací. Požívání alkoholu a mnohých syntetických léčiv prohlubujících nedostatek klíčových vitaminů a minerálů.

Nejde o onemocnění geneticky jednotné. Zvláště těžká forma AD je autozomálně dominantně dědičná. Je prokázáno, že dochází k defektům na chromozomech 1, 12, 14, 19 nebo 21. Dochází k degeneraci zejména (predisponovaných) cholinergních neuronů (poškození ascendentních cholinergních traktů z nucleus basalis Meynerti do kůry) v neokortexu a hippocampu, přičemž jsou postiženy i jiné systémy související s učením a pamětí (CRF = Corticotropin Releasing Factor, somatostatinový, neurotenzinový, noradrenolinový a serotoninový). Systém obsahující CRF je přitom postižen první (v časné fázi nemoci), kdežto pokles ACh (acetylcholinu) je zjišťován až v terminálních stádiích nemoci. Dále vznikají senilní plaky (primární léze), tvoří se neurofibrilární smotky narušující cytoskelet a tím i činnost neuronů a snižuje se počet synapsí v CNS. Je zde také patrná zvýšená tvorba reaktivních forem kyslíku a oxidační stres.

AD se projevuje ve 3 stádiích: 1. stádium je mírná forma trvající 2-4 roky, pacient často ztrácí věci, zabloudí na známých místech, dochází ke změnám osobnosti, dezorientaci a obtížnému hledání slov; 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, má sklon k podvýživě, infekcím a dekubitům.

V terapii AD se uplatňují v současnosti hlavně látky ovlivňující osud ACh a AChE. Prakticky užívané jsou pouze: donepezil (Aricept[®]), galanthamin (Reminyl[®]) a rivastigmin (Exelon[®]). Od dříve užívaného takrinu (Cognex[®]) bylo už v současné době upuštěno. Terapie je pak vhodně doplněna i antioxidanty (vit. E, C), popř. estrogeny, protizánětlivými látkami, kortikoidy, inhibitory amylooxidasy, nootropiky, neuroleptiky a hypnotiky.

Stále je snaha vyvíjet nová léčiva jak přírodního tak chemického původu. Jednou z možností je znovuobjevování už známých, ale zapomenutých nebo opomíjených látek. Zde je věnována pozornost studiu starších prací ve snaze po nalezení a využití takových poznatků, které v době publikování nebyly nebo nemohly být dostatečně doceněny. Příkladem může být penicilin. Do této oblasti ale můžeme zahrnout i mnoho léčiv přírodního původu, která jsou objevována na základě využití poznatků lidového léčitelství a představují vlastně nejstarší způsob objevu léčiv. Tímto způsobem bylo získáno mnoho chemických individuí, jako je např. morfin a jiné alkaloidy, náprstníkovité glykosidy apod. Znalost léčivého efektu, ale i toxicity rostliny (a tím tedy i jejích obsahových látek) vede často k izolaci jejích jednotlivých účinných látek a pozdějšímu stanovení terapeutických i toxických dávek. Tyto izolované látky z přírodních materiálů se pak také často stanou předlohou pro pozdější syntézy modelových látek, které vytvářejí celé farmakoterapeutické skupiny léčiv.

V oblasti přírodních látek se provádí i výzkum látek ovlivňujících osud ACh, AChE (jako stimulatory nikotinových receptorů – např. arekolin; M₂ agonisté – např. himbacin; nebo acetyl-l-karnitin); ACAT - pyripyropen A; produkci amyloidu - tanshinon I; dále přírodních neuroprotektiv - ginkgolid B a inhibitorů propylendopeptidasy - PEP.

Jednou z rostlin, kterou se vědci zabývají v souvislosti s jejím inhibičním účinkem na AChE je také *Chelidonium majus* L.. Má se zato, že by některé látky v ní obsažené mohly mít pozitivní vliv na průběh AD. Účinnost je zatím zkoušena pouze na homogenátu mozku.

2. CÍL PRÁCE

Cílem mé rigorózní práce bylo společně s Šárkou Bryndovou, Dagmar Kubincovou a Janou Nagyovou:

1. provést extrakci 41,8 kg suché nati s kořeny pomocí perkolátoru. Poté tento získaný primární extrakt vyčistit a to filtrací a následným oddestilováním rozpouštědla na vakuové odparce. Dále 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 benzofenantridinovýchází, fenolové baze, chloridy alkaloidů rozpustných a nerozpustných ve vodě. Z chloridů nerozpustných ve vodě byly připraveny dvě frakce: chloridy rozpustné a 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 protopinových 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 AChE.

3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1. AD a její terapie

3.1.1. Alzheimerova choroba a její terapie

AD je progresivní neurodegenerativní onemocnění charakterizované postupnou ztrátou paměti a schopnosti učit se (demencí) a poruchami chování.¹ Je nejčastější příčinou demence vůbec. Náleží mezi několik nejzávažnějších a také nejnákladnějších chorob. Závažnost spočívá v četnosti, míře postižení kvality života nemocných i v tom, že AD představuje jednu z nejčastějších primárních příčin smrti.

Dosud neznáme kompletní etiologii AD, proto nejsme schopni léčit tuto závažnou demenci kauzálně. Využívají se postupy, které ovlivňují známé patogenetické řetězce.²

Je známo, že vlivem různých faktorů jako jsou:

- genetické predispozice; (onemocnění ale není geneticky jednotné. Zvláště těžká forma nemoci je autozomálně dominantně dědičná. Defekty mohou být na chromozomech 1, 12, 14, 19 nebo 21);
 - defektní prekursor β -amyloidu,
 - faktory životního prostředí,³
 - snížení hladiny estrogenů,⁴
 - toxiny³ (např. vliv chronické intoxikace hliníkem^{5,6} a jinými kovy je zatím diskutován⁵)
- nebo zánět dochází k tomu, že fibrily β -amyloidu mohou reagovat s receptory na povrchu buněk, jako je RAGE (receptor for advanced glycation endproducts) a scavenger receptor (RA). Následně se tvoří volné kyslíkové radikály, které mohou – pravděpodobně prostřednictvím depolarizace buněčné membrány a aktivace NMDA-receptorů – zvyšovat neuronální intracelulární koncentraci Ca^{2+} . Kyslíkové radikály a Ca^{2+} podporují buněčnou smrt neuronů. V mikroglialních buňkách stimuluje aktivace RAGE a RA tvorbu popř. uvolňování oxidu dusnatého, prostaglandinů, excitotoxinů, cytokinů, $\text{TNF}\alpha$, tumor growth faktoru ($\text{TGF}\beta$) a růstového faktoru pro fibroblasty (b-FGF). Vzniká zánět, který rovněž postihuje neurony. Zánik neuronů může být urychlen nedostatkem NGF nebo NGF-receptorů. Zánik neuronů jde ruku v ruce se sníženou tvorbou a koncentrací neurotransmiterů v mozku. Obzvláště výrazně se to týká ACh. V kůře velkého mozku a v hippocampu se nachází až o 90 % snížená koncentrace CAT, enzymu, který je potřebný pro tvorbu ACh. Klesají ale také koncentrace dalších neurotransmiterů jako noradrenalinu, somatotropinu, serotoninu, neuropeptidu Y, substance P a kortikoliberinu (CRH).³

Některé studie dokazují, že plaky a neurofibrilární pleteně charakteristické pro AD se objevují spontánně během stárnutí jako důsledek přirozeného poklesu energetického metabolismu a změny hladiny Ca^{2+} . Tedy nejen nutně díky známým patogenům. Tento názor může vést k nečekanému závěru. Přirozené stárnutí hraje v procesu neurodegenerace daleko významnější roli než je mu v současnosti připisováno.⁷

Klinicky se AD diagnostikuje obtížně na základě sledování kognitivních funkcí a změn v chování; pro odlišení od jiných typů demence se začínají používat moderní zobrazovací metody (CT, MRI, PET) a sledování biochemických markerů. Histopatologické změny v mozku pacientů s AD jsou prokazatelné většinou až *post mortem*.¹

Mozek je zmenšený, závitky jsou zúžené, rýhy rozšířené, maximum změn bývá v okcipitálních a frontálních lalocích. Atrofie postihuje také bílou hmotu, hippocampus a bazální ganglia. Mozeček a mozkový kmen zůstávají většinou nezměněny. Atrofii provází rozšíření postranních komor. Základní strukturální změnou je redukce počtu neuronů, Alzheimerovy změny neurofibril, senilní drůzy, granulovaskulární tělíska v cytoplazmě neuronů a Hiraniho tělíska. Dalším diagnostickým znakem je amyloidosa drobných cév v pia mater a v kůře. Výše uvedené změny nejsou pro presenilní demenci patognomonické, vyskytují se i v mozku starších osob bez klinické odezvy a jsou také součástí jiných degenerativních onemocnění. Pro diagnózu AD je charakteristické, že uvedené změny jsou velmi početné a topograficky charakteristicky rozložené.⁶ Dále je pro AD typické snížené množství ACh a CAT a jsou patrné změny vyvolané nadbytečnou tvorbou reaktivních forem kyslíku a oxidačním stresem.

Molekulární mechanismy vedoucí k těmto změnám jsou do značné míry objasněny, ale vzájemné vztahy mezi nimi nikoliv.¹

3.1.2. Terapie AD

Etiologie AD ještě není plně objasněna, proto se ve farmakoterapii vychází ze známých etiologických řetězců. Nejrozšířenějším typem biologické terapie AD je farmakoterapie, zaměřená především na ovlivnění poznávacích a výkonných funkcí. V současné době jsou založeny na důkazech 2 farmakoterapeutické postupy:

- užití inhibitorů acetylcholinesteras,
- užití parciálních nekompetitivních inhibitorů NMDA receptorů excitačních aminokyselin (memantin),

Důležitý je u demencí nejen Alzheimerova typu také nefarmakologický přístup. Nefarmakologické přístupy v managementu demencí lze rozdělit na následující skupiny podle toho, na který problémový okruh jsou zaměřeny:

- včasná diagnóza a podpora pacienta v úvodní fázi onemocnění, poskytnutí informací,
- zachování či zlepšení kognitivních funkcí,
- zachování či zlepšení soběstačnosti v aktivitách denního života,
- zmírnění či odstranění problémového chování a psychologických příznaků demence,
- zlepšení kvality života pacientů a zlepšení komunikace mezi pacientem a lékařem,
- zlepšení kvality života v terminálních fázích demence,
- podpora pečujících rodin,

AD a jiné demence tedy vyžadují celostní a multidisciplinární přístup.⁸

3.1.2.1. Inhibitory mozkových cholinesteras

Užití **inhibitorů mozkových cholinesteras** je nejužívanější postup v terapii AD, především lehkých až středních forem. Tyto látky náležejí do skupiny kognitiv, tedy farmak ovlivňujících příznivě centrální acetylcholinergní transmisi. Předpokládá se, že acetylcholinergní neurony tvoří substrát pro reverberační okruhy, které zprostředkují krátkodobou paměť a paměťovou konsolidaci.

U AD je porušena především presynaptická část acetylcholinergního neuronu. Je snížena aktivita enzymu CAT, syntetizujícího ACh z Ch a z acetyl-koenzymu A. Pre- i postsynaptické muskarinové i nikotinové receptory zůstávají relativně dobře zachovány.² Jiná studie uvádí, že jeden z nejvýraznějších cholinergních deficitů je redukce nAChR v mozku.⁹ Po uvolnění z vazby na receptory je ACh odbouráván acetylcholinesterasami a u AD i butyrylcholinesterasami. U AD je sníženo uvolnění ACh z presynaptických zakončení. Toto uvolnění je facilitováno stimulací nikotinových presynaptických receptorů. Acetylcholinesterasy mají několik různých forem. V mozku zdravého člověka převládá tetramerní forma G4 a pouze minoritní je monomerní forma G1. U AD roste podíl G1 a klesá G4. Navíc se u AD uplatňuje další enzym, který je za normálních podmínek naprosto minoritní – BuChE. Ta je novotvořena aktivovanými gliovými elementy v oblasti alzheimerovských plaků a podílí se na odbourání ACh. Dochází k situaci, kdy klesá počet molekul AChE a stoupá počet molekul BuChE.² Obě formy jsou rozlišeny geneticky, strukturně a také reakční kinetikou. V lidském mozku se BuChE nachází v neuronech, gliových buňkách, stejně tak jako v neuritovém plaku a pletení u pacientů s AD. Zatímco

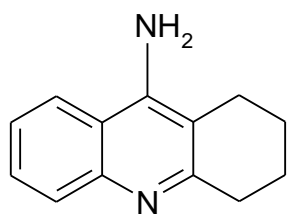
acetylcholinová aktivita snižuje progresivitu AD v mozku nemocných pacientů, BuChE aktivita může zvýšit progresivitu, záleží však na dalších faktorech. Na základě různých modelů (a u pacientů s pokročilou AD) se však zdá, že BuChE může určitou měrou nahradit AChE při hydrolýze mozkového ACh.¹⁰ BuChE se ukázala skutečně novým cílem v terapii AD.¹¹

Inhibitory acetylcholinesteras představují chemicky nejednotnou skupinu, jednotlivé preparáty se také liší v typu inhibice a v tom, zda podstatně odbourávají či neodbourávají molekuly BuChE. Existují 3 typy inhibice acetylcholinesteras: reverzibilní, irreverzibilní a pseudoirreverzibilní.²

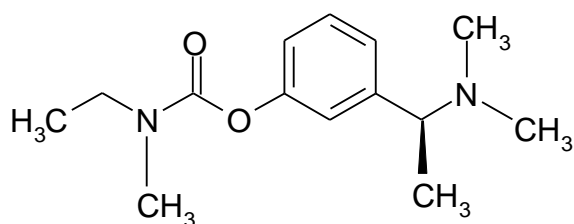
V současnosti je spektrum klinicky použitelných látek relativně úzké.^{12,13} Např. donepezil a ikopezil jsou selektivní vůči AChE, zatímco takrin a heptylfysostigmin má vysokou aktivitu k BuChE; všechny čtyři sloučeniny zvyšují hladinu ACh v myším mozku. Donepezil a ikopezil mají však výhodnější terapeutický index než neselektivní inhibitory takrin a heptylfysostigmin (z hlediska posouzení centrálních a periferních účinků).¹⁴

V naší republice jsou používány 3 inhibitory AChE: rivastigmin, donepezil a galanthamin.²

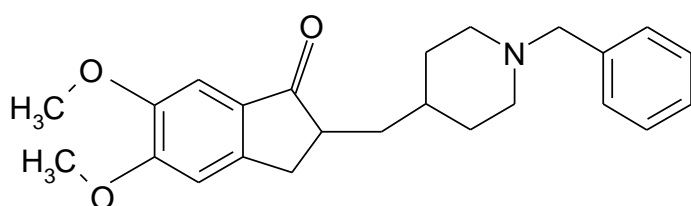
- reverzibilní AChEI:
 - takrin (Cognex[®])
 - donepezil (Aricept[®])¹ – náleží mezi piperidinové deriváty. Je značně specifický pro inhibici AChE, ale BuChE inhibuje naprosto nevýrazně.²
 - galanthamin (Reminyl[®])¹ – má dualistické působení – provádí reverzibilní inhibici AChE a také moduluje pre- i postsynaptické nikotinové receptory. Touto modulací se zlepšuje jednak výdej ACh z presynaptických zakončení, jednak se do jisté míry brání desenzitizaci postsynaptických muskarinových receptorů.²
- pseudoirreverzibilní – rivastigmin (Exelon[®])¹ – karbamátový derivát. Účinně inhibuje i BuChE. Navíc zvyšuje i obsah CAT, enzymu syntetizujícího v cholinergních neuronech ACh. Je vysoce specifický vůči monomerní formě acetylcholinesteras G₁ a allostericky moduluje nikotinové receptory.²
- irreverzibilní - metrifonát (dichlorvos), který se v praxi ale nevyužívá.¹



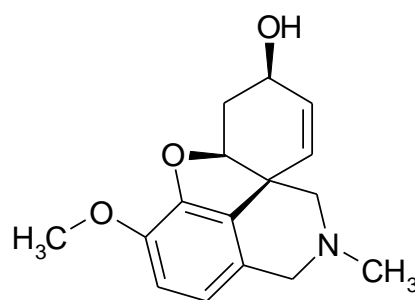
Takrin



Rivastigmin



Dopenezil

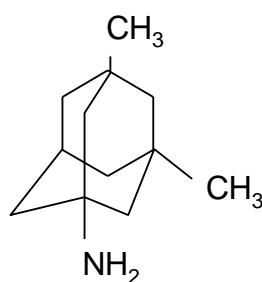


Galanthamin

Co lze od podávání AChEI očekávat? Nejedná se o kauzální léčbu, ale je velmi pravděpodobné, že inhibice AChE není jediným mechanismem účinku. Předpokládá se, že AChEI také zasahují do zřejmě základního neuropatologického článku AD – do formace β -amyloidu a to tak, že snižují tvorbu β -amyloidu zřejmě ovlivněním enzymů β - a γ -sekretas nebo zvyšují toxicitu β -amyloidu tím, že s ním vytvářejí toxické komplexy.

3.1.2.2. Inhibitory NMDA receptorů

Nekompetitivní inhibitory NMDA receptorů excitačních aminokyselin: také tento postup je založen na důkazech (evidence-based). Zatím je klinicky používaná pouze jediná látka – memantin (Exiba).



Memantin

Kombinace memantinu a inhibitorů AChE je racionální, používá se u středních Alzheimerových demencí, avšak je finančně velmi náročná.

3.1.2.3. Nové nadějně přístupy k léčbě AD

- z nefarmakologických biologických přístupů to je implantace kmenových buněk, které by pak vedly k novotvorbě neuronů. Je však teprve v počátečním stádiu klinického ověřování.
- použití monoklonálních protilátek proti β -amyloidu.
- jsou vyvíjeny inhibitory β - a γ -sekretas, patologických enzymů u pacientů s AD.
- ověřování látek inhibujících enzym glykogen syntasy kinasu 3 β – antidiabetika (rosiglitazon) a také soli lithia.²

3.1.3. Fytoterapie AD

Ve farmakoterapii AD jsou v současné době perspektivní i některé přírodní látky.

3.1.3.1. Látky ovlivňující osud ACh a AChE

- stimulatory nikotinových receptorů (nAChRs): galanthamin (*Galanthus woronovii*, *Narcissus sp.*); dobře snášen, určité periferní cholinergní účinky, podstatně účinnější než takrin; některé analogy arekolinu (studie *in vitro*),
 - M_2 antagonisté muskarinu: *Galbulimima baccata*, Himantandraceae: himbacin.
 - látky jiného působení: acetylkarnitin – působí proti úbytku glukokortikoidních receptorů
 - inhibitory AChE - jako např.:

a) *Huperzia serrata*, Huperzidaceae: huperzin – (Cerebra[®]), dlouze působící inhibitor, který má neuroprotektivní aktivitu, kognitivní efekt¹, odbourává β -amyloid, podporuje syntézu RNA a proteinů v mozku, zvyšuje hladinu Ca^{2+} a eliminuje superoxidové aniony.¹⁵ Splňuje tedy ideální kritéria pro symptomatickou léčbu AD.¹

b) *Sarcococca saligna*, Buxaceae: salignenamid C výraznější zásah do BuChE.¹⁶

Sarcococca coriacea, Buxaceae: z listů byly izolovány 2 steroidní alkaloidy a 2 známé sloučeniny funtumafrin C a N-methylfuntumin. U třech z nich byla zjištěna inhibiční aktivita na AChE a na BuChE z koňského séra.¹⁷

c) *Fiatoua villosa*, Orchidaceae; *Zea mays*, Poaceae: zeatin, IC₅₀ 1,9.10⁻⁴ M, také inhibice tvorby β-amyloidu.

d) *Angelica gigas*, Apiaceae: dekursinol, vysoká inhibiční aktivita vůči AChE *in vitro*.¹

e) *Majorana hortensis*, *Rosmarinus officinalis*, *Salvia officinalis*, Lamiaceae: ursolová kyselina, vysoký inhibiční efekt vůči AChE¹⁶, který je na dávce závislý, kompetitivního/nekompetitivního typu.¹⁸

f) *Penicillium sp. FO-4259-11*: produkuje arisugaciny¹⁹ (meroterpenoidy)¹ A a B a také sérii metabolitů označených jako arisugaciny C, D, E, F, G a H. Ty jsou strukturně příbuzné arisugacinům A a B. IC₅₀ arisugacinů C a D bylo 2,5 mM a 3,5 mM, kdežto ostatní arisugaciny E, F, G a H nevykazují inhibiční aktivitu ani na 100 mM.¹⁹

Penicillium sp.: arisugacin A (IC₅₀ 1.10⁻⁶ M); provedena totální syntéza.

Penicillium WK-4164 a *FO-4259*- cyklofostin – ovlivnění také BuChE.

g) *Evodia rutaecarpa*, Rutaceae: dehydroevodiamin – inhibice AChE, antiamnestický efekt. Silnější než takrin, kombinace úč.: inhibice AChE a zvýšení vasodilatace.

h) *Buxus hyrcana*, Buxaceae: (+)-homomoenjodaramin, moenjodaramin.

ch) *Buxus papillosa*, Buxaceae: cykloprotobuxin C, cyklovirobuxein A, cyklomikrofilin A.

i) *Ononis spinosa*, Fabaceae: α-onocerin.

j) *Caragana chamlague*, Fabaceae α-viniferin. Aktivita specifická, reverzibilní a nekompetitivní.

k) *Cynanchum atratum*, Ranunculaceae: cynatrosidy A, B, C; významné inhibice:

- A-β-D-oleandropyranosid.
- B-cymaropyranosyl-digitoxopyranosyl-β-D-oleandropyranosid; neaktivnější.
- C-cymaropyranosyl-digitoxopyranosyl-α-D-oleandropyranosid.¹

l) *Aconitum falconeri*, Ranunculaceae: faleoconitin a pseudoaconitin, nové norditerpenoidní alkaloidy s inhibiční aktivitou proti AChE.²⁰

m) *Corydalis ternata*, Papaveraceae: protopin izolovaný z methanolického extraktu z hlízy rostliny. Inhibice AChE je na dávce závislá (IC₅₀ = 50 mM), specifická, reverzibilní a kompetitivní. Účinek protopinu je téměř identický velnakinu. Protopin má tedy účinek jak anticholinesterasový, tak anti-amnestický.²¹

3.1.3.2. Inhibitory ACAT

- *Aspergillus fumigatus*: pyripyropen A.

3.1.3.3. Látky ovlivňující produkci amyloidu

- *Salvia miltiorrhiza*¹ a některé jiné druhy *Salvia sp.*²², Lamiaceae: tanshinon I.

3.1.3.4. Neuroprotektiva

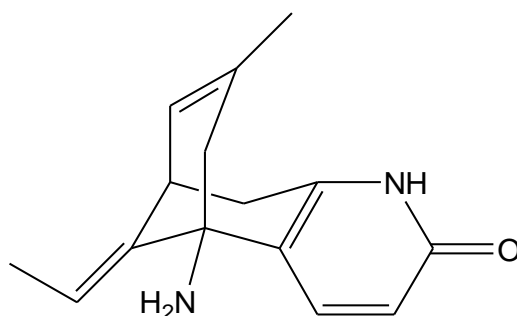
▪ ginkgolid B (BN-520121, *Ginkgo biloba*, Ginkgoaceae; Ipsen-Beaufour), antagonist PAF (také léčba septického šoku). Ochrana neuronů při mozkové hypoxii (potřeba nižší tenze kyslíku), snížení viskozity krve.

3.1.3.5. Inhibitory propylendopeptidasy (PEPI)

▪ PEP - jsou široce rozšířeny v různých tkáních, také v lidském mozku, kde hydrolyzují neuropeptidy s obsahem prolinu, které participují na učení a paměťových procesech (vasopresin, substance P, TRH). Jejich zvýšená hladina je pozorována u neurodegenerativních chorob jako výrazná deprese, manie, demence Alzheimerova typu; patrně zodpovědná za metabolismus C-terminální části amyloidního prekurzorového proteinu, zodpovědného za degeneraci neuronů; navozuje imunoreaktivitu zodpovědnou za procesy rychlejšího stárnutí mozku. Inhibitory PEP mají anti-amnestický efekt.

- a) fenantrenové deriváty (*Salvia deserta*, Lamiaceae).¹

Velmi významnou roli hraje studium přírodních látek, protože struktura těchto poměrně složitých molekul významně modifikuje účinek nejen ve smyslu vlastního efektu, ale především vedlejších účinků. Inhibice AChE byla pozorována např. u 1,8-cineolu a terpinen-4-olu, tj. obsahových látek z Tea Tree Oil²³, steroidních alkaloidů ze *Sarcococca saligna*²⁴, α -onocerinu z *Lycopodium clavatum*²⁵, ceramidů z *Tanacetum artemisioides*²⁶, ale i u jiných nedusíkatých látek jako jsou xanthony. 4 z nich působí i jako duální inhibitory AChE a MAO.²⁷ Velmi významné je však studium (resp. použití) alkaloidů především isochinolinového typu, vyskytujících se v různých zdrojích: zástupcích čeledi Amaryllidaceae: galanthaminu a jeho současných derivátů^{28,29} a chinolinové baze z čeledi Lycopodiaceae, jako je huperzin A a jeho deriváty^{30,31}. U některých přírodních látek byla pozorována spřažená aktivita - inhibují jak AChE tak BuChE - jako např. silice z druhů *Salvia fruticosa*, *S. lavandulaefolia*, *S. officinalis* a *S. officinalis* var. *purpurea*.³² a další.^{24,33} Při syntéze nových léčiv tohoto typu je velmi zásadní stereochemie. Terapeuticky významně aktivní jsou pouze některé stereoizomery³⁴ a to se uplatňuje i z hlediska ovlivnění AChE a BuChE, jak je to vidět např. u stereoizomerů huperzinu A³³, kde (-)-Huperzin A je cca 38x účinnější než (+)-Huperzin A.¹



Huperzin

Tento faktor musí být významně zohledněn, protože jinak dochází v řadě případů k výraznému vzestupu nežádoucích účinků.³⁵

Dnes je velký zájem věnován hledání stále lepších AChEI hlavně rostlinného původu. Pro screening extraktů z rostlin je používána Ellmannova zkouška a tenkovrstvá chromatografie. Rostliny jsou rozdrceny a extrahovány hexanem, chloroformem, ethylacetátem, methanolem, ethanolem, vodou, dichlormethanem/methanolem (1:1), aq. ethanolem, hexanem/chloroformem (80%) nebo dichlormethanem/ethylacetátem (1:1).³⁶

Jednou z rostlin, která je v současné době zkoumána je také *Chelidonium majus* L.

3.2. *Chelidonium majus* L. (vlašťovičník větší)

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.³⁷



Obr. 1: *Chelidonium majus* L. – celá rostlina³⁸

3.2.2. Systematika

Tab. 1: Systematické zařazení *Chelidonium majus*³⁹

Říše:	rostliny	<i>Plantae</i>
Podříše:	vyšší rostliny	<i>Cormobionta</i>
Oddělení:	krytosemenné	<i>Magnoliophyta</i>
Třída:	vyšší dvouděložné	<i>Rosopsida</i>
Řád:	makotvaré	<i>Papaverales</i>
Čeleď:	makovité	<i>Papaveraceae</i>
Rod:	vlaštovičník	<i>Chelidonium</i>

3.2.3. Botanický popis

Jde o vytrvalé byliny ; lodyhy 30 – 90 (-100) cm vysoké, větvené, roztroušeně chlupaté⁴⁰ s krátkým a rozvětveným oddenkem. Celá rostlina je proniknuta mléčnicemi se žlutým až oranžovým mlékem. Listy střídavé, přízemní i stonkové stejnotvaré, dolní řapíkaté, horní přisedlé.⁴¹ Čepel jednoduše až přetrhovaně lichožpeřená, na líci sytě, na rubu sivě zelená, tenká. Lístky vejčité, laločnatě vroubkované, terminální 3laločný. Květy v chudém okolíku – květenství tvoří 2-6kvěťový okolík; květy 1-2 cm v průměru.⁴⁰ Jsou oboupohlavné, zdánlivě pravidelné.⁴¹ Kalich žlutý, prchavý; kališní lístky 2, volné; korunní lístky 4, obvykle celokrajné. Blizna dvoulaločná, čnělka velmi krátká; tyčinky žluté, s kyjovitě ztlustlými nitkami.⁴⁰ Plody jsou tobolky, kostrbaté, čárkovité, otevírající se dvěma chloupky od baze k vrcholku.⁴¹ Tobolky jsou 3-8 cm dlouhé, tvarem připomínající šesuli.⁴⁰ Semena až 1,5 mm dlouhá, černá, vejčitá⁴¹ s masitým hřebenitým výběžkem.⁴⁰ Kvete v květnu až září.⁴¹



Obr. 2: *Chelidonium majus* L. – květ³⁸

Jde o jediný druh se 3-4 poddruhy, někdy považovanými za samostatné druhy:⁴⁰

- 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.): vzrůst menší, listy se zkrácenými řapíky.
- var. *maius*: listy poměrně pevné, čepele jen málo řezané, vroubkované, matné, všechny směřující dolů, nanejvýš ty nejspodnější postavené. Korunní lístky celookrajové. 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. *semiplenum* DOMIN. Ačkoli je rozdělení var. *maius* do různých forem duchaplné, stále ale zůstává sporné.
- var. *tenuifolium* LILJ. (syn. *Chelidonium laciniatum* MILL., *Chelidonium majus* L. var. *laciniatum* (MILL.) KOCH, *Chelidonium majus* L. var. *quercifolium* T HUILL)³⁷: 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.⁴⁰

Existují různé karyotypy: v Evropě a Asii se jsou rostliny diploidní (mají 12 chromozomů – $2n = 12$); v Japonsku a ve východní Evropě $2n = 10$; $2n = 20$ v Japonsku. V Polsku se vyskytuje tetraploidní vyšlechtěná kultura ($2n = 24$). Pěstuje se zde jako *Chelidonium majus* L. „Cynober“. Optimální čas výsevu je na podzim.³⁷

3.2.4. Ekologie a cenologie

Roste divoce na starých zdech, hromadách sutin, v příkopech,⁴² na návsích, zahradách, rumištích, okrajích cest, v akátinách, humózních hájích, na mírně zastíněných, vlhkých a dusíkem bohatých půdách. Diagnostický druh ve společenstvech svazu *Chelidonio-Robinetelata*, častý též ve společenstvech svazu *Galio-Alliarion*, *Sambuco-Salicioncapreae*, popř. *Aegopodium podagrariae*.⁴⁰

3.2.5. Celkové rozšíření

Pochází z mírného pásma, kde je široce rozšířen.⁴³ Jižní a střední Evropa, jižní Skandinávie; mírné až subarktické pásmo Asie včetně Japonska a střední Číny.⁴⁰ Byl zavlečen do atlantické oblasti Severní Ameriky.^{40,43}

3.2.6. Rozšíření v ČR

V termofytiku a mezofytiku obecný až roztroušený, v oreofytiku vzácný. Těžiště výskytu v planárním a kolinním stupni, vzácně zasahuje až do stupně submontánního (max. Krkonoše, Obří důl, 850 m).⁴⁰

3.3. Drogy získávané z *Chelidonium majus* L.

3.3.1. *Chelidonii radix* (kořen vlašovičnicku většího)

- drogu získáváme sběrem volně rostoucích rostlin, pěstováním; v Polsku pěstováním druhu „Cynober“ a z vysoko výnosových sazenic.
- kořen vlašovičnicku se používá sušený.

3.3.2. *Chelidonii herba* (nať vlaštovičnicku většího)

- drogu získáváme sběrem volně rostoucích rostlin³⁷ – sbírá se celá kvetoucí nať na začátku kvetení bez hrubých a dužnatých částí.
- někdy se používá i čerstvá kvetoucí nať ***Chelidonii herba recens***.
- materiál se suší umělým teplem při teplotě 60-70°C, přičemž nastává inaktivace proteolytických enzymů mléčné šťávy.⁴³
- jiný, novější, zdroj uvádí, že vhodné je zahřátí na 105°C s následným sušením při pokojové teplotě, či při 60°C. Základem pro tento poznatek je, že zahřátí přes 100°C inaktivuje enzymy odbourávající alkaloidy. Některé zdroje uvádějí, že pokud drogu sušíme jen při pokojové teplotě, či při 60°C bez předchozího zahřátí na 105°C, získáme zřetelně nižší obsah alkaloidů.³⁷
- makroskopie: zelené, slabě ochlupené lodyhy jsou zakulacené, listy střídavé, perovitě, na okraji hrubě vroubkované, málo ochlupené a na spodní straně světle zelené. Žluté květy jsou v chudých okolících.
- mikroskopie: charakteristické jsou mléčnice ve všech částech rostliny, velké tenkostěnné trichómy na lodyze a listech a žlutá, kulatá pilová zrna s 3 klíčovými brázdami a perforovanou exodermou. Pokud jsou přítomná semena, mají v perforované testě velké množství šťavelanu vápenatého.

Vystužující elementy a škrob droze chybí.⁴³



Obr. 3: *Chelidonium majus* L. – list³⁸

3.4. Obsahové látky *Chelidonium majus* L.

3.4.1. Alkaloidy

Alkaloidy jsou hlavními obsahovými látkami vlašovičníku. V rostlině jich bylo popsáno již více než 30. Za zmínku stojí, že z tohoto počtu jich 15 poprvé izoloval a převážně i strukturně určil J. Slavík.⁴¹

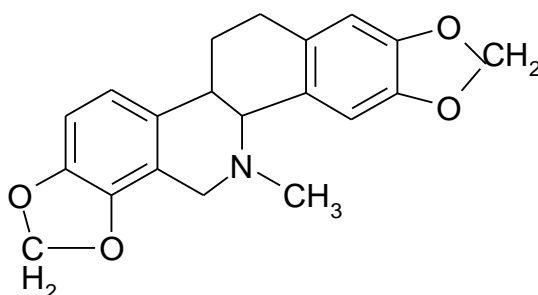
3.4.1.1. Alkaloidy podle chemické struktury

- můžeme rozdělit do 4 základních skupin:

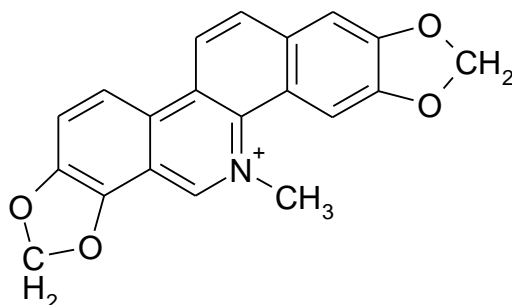
a) benzofenanthridinový typ (α - naftofenanthridinový typ):

▪ tuto skupinu tvoří 2 podskupiny:

1. obsahuje terciární dusík (např. chelidonin) : **terciární alkaloidy**.

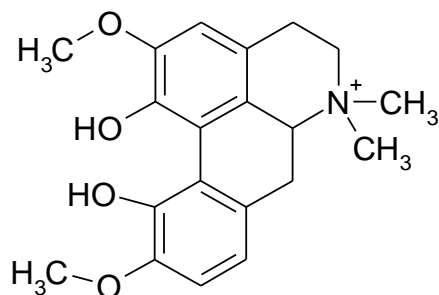


2. obsahuje kvartérní dusík s 2 centrálními aromatickými kruhovými systémy (např. sanguinarin) : **kvartérní alkaloidy**.

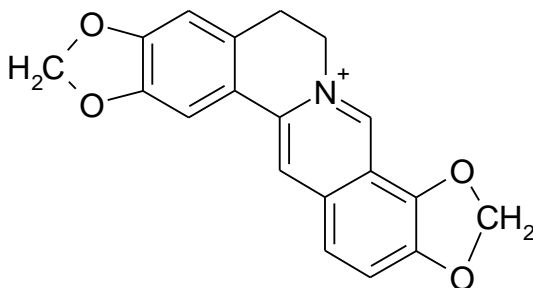


b) protoberberinový typ

- tyto alkaloidy jsou zde zastoupeny: **tetrahydroprotoberberiny** (např. stylopin).

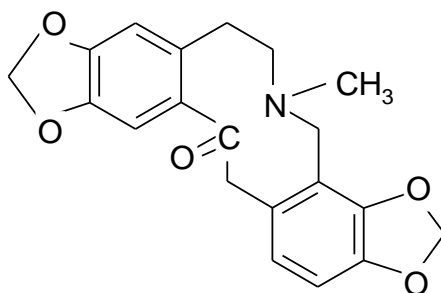


: **protoberberiny** (např. berberin).



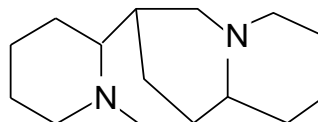
c) protopinový typ

- sem náleží protopin, alkaloid typický pro čeleď Papaveraceae, ale také allokryptopin.



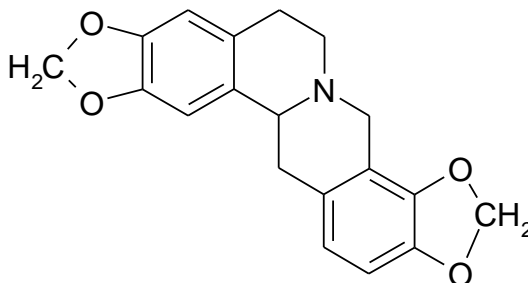
d) ostatní

- deriváty benzylochinolinu – 3 typy, které jsou zde zastoupeny jen v menším množství : chinolizidin, spartein (*Chelidonii herba*);



Sparteín

- aporfinový alkaloid magnoflorin (*Chelidonii radix*)³⁷



Byly provedeny extrakce alkaloidů *Chelidonium majus L.* různými metodami (tradiční vymačkávání a příprava čaje, mikrovlnná extrakce a SFE). Extrakty byly vodné a propylenglykolové. Pro srovnání extrakčních metod byl výtěžek ohodnocován podle celkového obsahu alkaloidů zjištěného spektroskopicky. 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.⁴⁴

Nejběžnější metodou izolace kvartérních a slabých terciárních alkaloidů z rostlinných extraktů, tedy i z *Chelidonium majus L.*, je sloupcová chromatografie s následnou úpravou pH eluentů. Krystalizací se pak získávají výše zmíněné alkaloidy.⁴⁵

Tab. 2: Alkaloidy izolované z *Chelidonium majus* L.⁴¹

Alkaloid	Kořen	Nadzemní část
<i>Kvarterní benzo[c]fenanthridiny</i>		
Sanguinarin	+++	+++
Chelerythrin	+++	+++
Chelirubin	+	+
Chelilutin	+	+
Makarpin	+	+
<i>Terciární benzo[c]fenanthridiny</i>		
Chelidonin	+++	+++
Homochelidonin	++	+
Chelamin	+	-
Chelamidin	+	-
Dihydrosanguinarin	+	+
Dihydrochelerythrin	+	+
Dihydrochelirubin	+	-
Dihydrochelilutin	+	-
N-Demethyl-9,10-Dihydro-oxysanguinarin	+ ?	- ?
Chelidimerin	+	+
Norchelidonin	-	+
Isochelidonin	+	-
Oxysanguinarin	-	-
„Methoxychelidonin“*		
<i>Terciární protoberberiny</i>		
Stylopin	++	++ až +++
<i>Kvarterní protoberberiny</i>		
Methylstylopin	+	+
Berberin	++	+++
Koptisin	+++	+++
Korysamin	+	+
<i>Protopiny</i>		
Protopin	++	+
Allokryptopin	++	+
<i>Kvarterní aporfíny</i>		
Magnoflorin	+++	-
Turkiyenin	+	+
Sparteín	?	?

*Methoxychelidonin není individuální alkaloid, ale směs homochelidoninu, chelaminu a chelamidinu.⁴¹

Novým alkaloidem izolovaným z *Chelidonium majus* je (-)-turkiyenin.⁴⁶ Chemickou strukturou ho řadíme mezi kvarterní aporfíny.⁴¹

Výzkumy mléčné šťávy získané z lodyhy *Chelidonium majus* ukázaly, že čerstvá, ještě nezoxidovaná mléčná šťáva obsahuje větší množství dihydrokoptisinu, sanguinarinu, chelerythrinu, berberinu a koptisinu. V zoxidované mléčné šťávě už nelze prokázat dihydrokoptisin, pouze koptisin. Lze tedy 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.

Zajímavé se zdá být i **rozdělení obsahových látek čerstvého vlašovičnickového latexu**: všech 5 prozkoumaných alkaloidů, jmenovitě berberin, chelerythrin, koptisin, dihydrokoptisin a sanguinarin, je obsaženo ve vakuolách spolu s chelidonovou kyselinou a enzymy jako jsou hydrolasy a blíže nespecifikované fenolické sloučeniny.³⁷ Alkaloidy jsou tedy obvykle v rostlině vázány na kyselinu chelidonovou.⁴³ Sanguinarin a chelerythrin mají přitom větší afinitu k vakuolovému obsahu než berberin, koptisin a dihydrokoptisin a proto mohou být z vakuol uvolněny do mléčné šťávy až naposled. Sanguinarin a chelerythrin při volném stání roztoku způsobují rozklad tonoplastu, což je asi základ přesné izolace. Enzym fenoloxidas je obsažen v mléčné šťávě, ne ve vakuolách. Přítomnost enzymů v rostlině, získávaných společně s aktivními účinnými látkami, je možná základem pro dříve často popisované „nejisté působení“ preparátu vlašovičnicku – přítomnost enzymů může vést k přeměnám či vzniku méně aktivních účinných látek.³⁷

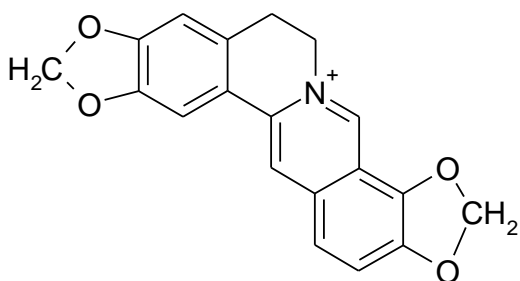
Distribuce alkaloidů v rostlině je nerovnoměrná.⁴¹ Obsah a spektrum alkaloidů je kolísavé. Nacházejí se především v mléčné šťávě⁴³ a rozdíly jsou znatelné podle rostlinné části, vegetační periody^{41,43} (nejvyšší obsah je v létě, popř. na podzim, podmíněný jak provenienčně, tak geneticky; tetraploidy mají obsah asi o 50-60 % vyšší),⁴³ v závislosti na klimatických podmínkách a stáří rostliny. Nejbohatším orgánem je kořen, obsah alkaloidů v něm často dosahuje až 2-3 %, kulminuje na konci vegetačního období, zatímco při kvetení rostliny klesá. U víceletých rostlin je obsah alkaloidů v kořeni výrazně vyšší než v prvním roce vegetace.⁴¹ Jiný zdroj uvádí, že obsah alkaloidů v kořeni bývá 0,5 – 0,8 %⁴³ nebo do 2 %⁴² a v čerstvé nati pak 0,2 – 0,4 %.⁴³

3.4.1.2. Alkaloidy kořene

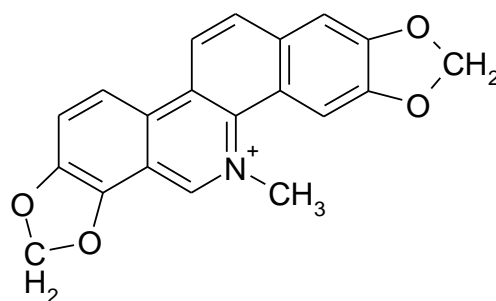
Obsah alkaloidů v droze **Chelidonii radix** závisí na původu a podmínkách sušení drogy a dosahuje – 0,8 až 2 %.³⁷ Podle J. Slavíka je nejvhodnějším materiálem pro izolaci alkaloidů kořen sbíraný na podzim, který obsahuje 2,02 % alkaloidů v sušině, kdežto v kořeni sbíraném v květnu byly nalezeny alkaloidy v množství pouze 0,77 %.⁵³

Hlavními alkaloidy kořene jsou **koptisin** (0,15-0,57 %) a **chelidonin** (0,5-1,02 %) ³⁷, významný je i obsah **sanguinarinu**, **chelerythrinu**, **berberinu** a kvartérního aporfinového alkaloidu **magnoflorinu**. ⁴¹

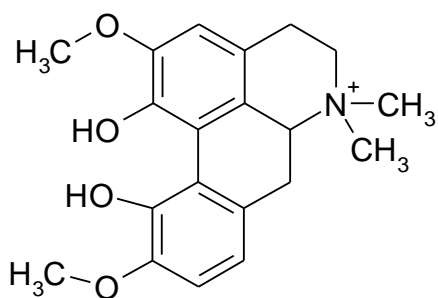
Chelerythrin a sanguinarin se podařilo od sebe kvantitativně oddělit J. Slavíkovi a L. Slavíkové pomocí sloupcové chromatografie na sloupci oxidu hlinitého, obsahujícího ionty Cl⁻, benzenovým roztokem octanů. Chelerythrin takto připravený krystaluje z etheru v bezbarvých hranolcích o t.t. 282 – 283 °C. Sanguinarin připravený chromatograficky obsahuje malé množství nealkaloidní balastní látky. Krystalizací lze tuto látku odstranit. Čistý sanguinarin překrystalizovaný z etheru má t.t. 266 – 267 °C a jeho pseudokyanid 237 – 238 °C. ⁴⁷



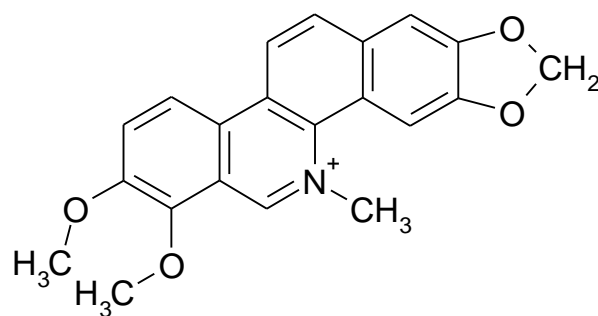
Berberin



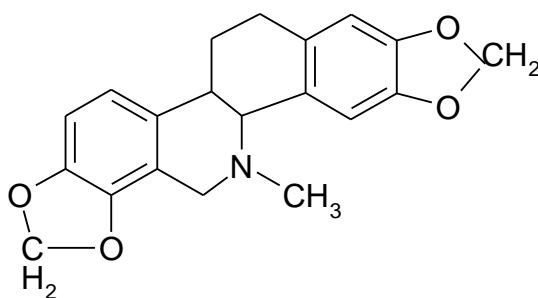
Sanguinarin



Magnoflorin



Chelerythrin

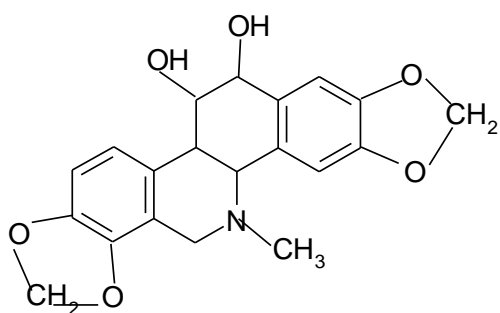


Chelidonin

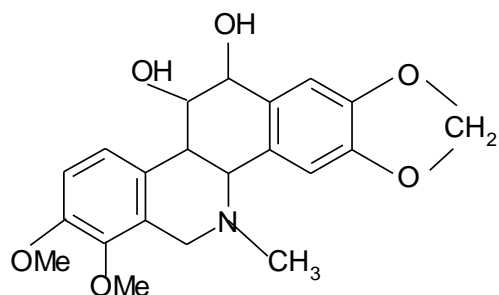
Jako **vedlejší alkaloidy** se tu nacházejí 6-methoxydihydrochelerythrin, 6-methoxydihydrosanguinarin, dihydrosanguinarin, oxysanguinarin, dihydrochelerythrin, homochelidonin, β -allokryptopin, chelilutin,³⁷ chelirubin,⁵³ chelamin a korysamin.³⁷

Chelirubin a chelilutin, nazvané podle intenzivně zbarvených solí, byly nalezeny v podílu basí tvořících nebasické pseudo-kyanidy (kyanidová frakce). Od hlavních alkaloidů sanguinarinu a chelerythrinu byly odděleny chromatograficky.⁵³ Oba nově izolované alkaloidy, chelirubin a chelilutin, se vlastnostmi podobají chelerythrinu a sanguinarinu a neshodují se se žádným alkaloidem v literatuře dosud popsáným. Tvoří bezbarvé baze, rozpustné ve zředěných kyselinách za vzniku intenzivně zbarvených solí, krystalizujících v jehlicích. Chelirubin, tvořící purpurově červené soli, byl zřejmě příčinou krvavého zbarvení solí sanguinarinu, popisovaného staršími autory. Soli chelilutinu mají barvu oranžovou. Možnost sekundárního vzniku chelirubinu a chelilutinu ze sanguinarinu a chelerythrinu během chromatografie byl vyloučen zjištěním, že čistý sanguinarin a chelerythrin se při chromatografii za stejných podmínek nemění. Rovněž fialově zbarvené rozkladné produkty, které vznikají zvláště hojně při převádění pseudo-kyanidů na chloridy, mají zcela rozdílné vlastnosti od obou nových bazí. Vedle toho lze oba alkaloidy prokázat i v celkových basích z vlašovičnicku, které nebyly podrobeny kyanidovému dělení. Ve vlašovičnicku sbíraném v květnu však chelilutin nalezen nebyl, takže se zdá, že je v rostlině obsažen jen v určitém vegetačním období. Při rozdělovací TLC mají všechny čtyři alkaloidy, tvořící kyanidovou frakci, odlišné hodnoty R_f a ve směsném chromatogramu tvoří dobře oddělené skvrny.⁴⁷

Mezi nové alkaloidy kořene, které byly popsány pouze zřídka kdy, patří chelamin $C_{20}H_{19}NO_6$ a chelamidin $C_{21}H_{23}NO_6$. Podle spektrální analýzy jim náleží struktura 10-hydroxychelidoninu a 10-hydroxyhomochelidoninu. Pouze občas byl izolován také alkaloid chelimerin (meso-forma 1,3-bis(hydrosanguinarinyl)acetonu).⁴⁸



Chelamin



Chelamidin

Pro izolaci kvartérních alkaloidů z kořene *Chelidonium majus* použijeme např. tuto metodu: nejprve extrahujeme rostlinný materiál 0,6% kyselinou octovou dokud nedosáhneme $\text{pH} > 5$. Dále provedeme sloupcovou chromatografii. Extrakt s kvarterními bazemi je pak selektivně naadsorbován na silikagelový sloupec a kolona promyta acetátovým pufrem o pH 5. Eluát obsahuje směs alkoholů o nízké molekulární hmotnosti (hlavně methanol) a 0,05 - 0,5 M H_2SO_4 (nejlépe však 0,15 M) v objemovém poměru 70-80 : 30-20. Sulfáty alkaloidů pak izolujeme z eluátu krystalizací.⁴⁹

Z kořene také byly izolovány 2 aporfinové alkaloidy: korydin a norkorydin. Identifikovány byly pomocí IR, UV, $^1\text{H-NMR}$ a mass spektrálního srovnání.⁵⁰

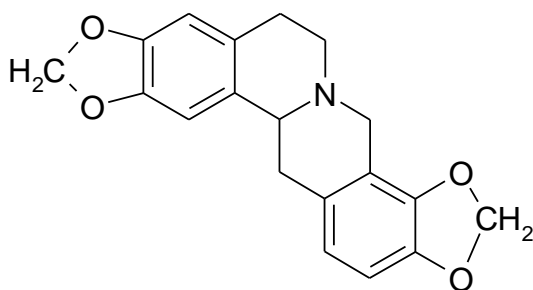
3.4.1.3. Alkaloidy nati

V nadzemních částech rostliny je zastoupení alkaloidů nižší (0,5-1,5 %) a podléhá v průměru vegetace významným kvalitativním změnám.⁴¹ Podle jiné práce se obsah alkaloidů v nati pohybuje podle původu a podmínek sušení od 0,01 do 1 %. Jde především o benzyloisochinolinové deriváty benzofenanthridinového, protoberberinového a protopinového typu.³⁷ Jako **hlavní alkaloidy** jsou uváděny **chelidonin**, **koptisin**, **stylopin**, **sanguinarin**, **chelerythrin**^{37,41} **berberin** a **protopin**. V mnohem nepatrnějším množství zde nalezneme ještě asi 20 alkaloidů,³⁷ jako je chelirubin, α -allokryptopin a navíc ještě malé množství amorfních basí fenolické povahy.⁵¹ Ve velmi nepatrném množství (0,3 mg/kg) je v droze obsažen chinolizidinový alkaloid spartein.³⁷ 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. Obsah v nadzemních částech činil 0,4-0,8 %. Na počátku vegetačního období byl jako druhý hlavní alkaloid nadzemních částí stanoven stylopin, přičemž obsah chelidoninu, sanguinarinu a chelerythrinu byl relativně nízký. Po

odkvětu rostliny však obsah tří posledně jmenovaných alkaloidů narůstal a ke konci vegetačního období již patřily k hlavním, zatímco obsah stylopinu značně poklesl. Rovněž bylo prokázáno, že hlavní alkaloidní látkou nálevu z usušené nadzemní části sbírané v květnu je koptisin (0,1-0,2 %), zastoupení ostatních alkaloidů je nepatrné (<0,001 %).⁴¹

Z nadzemní části rostliny *Chelidonium majus* J. Slavík poprvé izoloval v roce 1954 nový alkaloid - stylopin. Oddělil z nadzemní části vlaštovičniku, která obsahovala 0,29 % alkaloidů, opticky inaktivní alkaloid o složení $C_{19}H_{17}O_4N$, krystalizující v jehlicích s t.t. 221 °C, který byl identifikován směsným bodem tání s autentickým *dl*-stylopinem. Z matečných louhů po *dl*-stylopinu byl izolován další alkaloid o t.t. 203 °C, identický s *l*-stylopinem.

Stylopin (tetrahydrokoptisin) $C_{19}H_{17}O_4N$, je obsažen také v řadě rostlin dymnivkovitých (*Fumariaceae*) rodu *Corydalis*, *Fumaria* a *Dactylicapnos*, z rostlin makovitých (*Papaveraceae*) byl nalezen ve *Stylophorum diphyllum* a *Dicranostigma franchetianum*. V přírodě se vyskytuje v *l*-, *d*- i v *dl*-formě, která je identická s *dl*-tetrahydrokoptisinem, produktem redukce alkaloidu koptisinu.⁵¹



Stylopin

3.4.1.4. Alkaloidy plodu

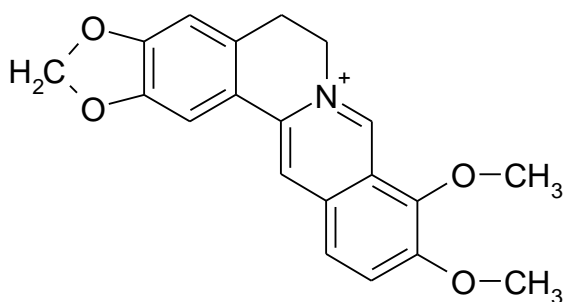
Byly izolovány 2 protoberberinové alkaloidy a 1 benzofenantridinový alkaloid. Na základě chemických a spektroskopických důkazů pak byla určena struktura těchto sloučenin jako **chelidoninu**, **koptisinu** a **berberinu**.⁵²



Obr. 4: *Chelidonium majus* L. - plody³⁸

3.4.1.5. Alkaloidy semen

V semenech převažuje **koptisin**.⁴¹



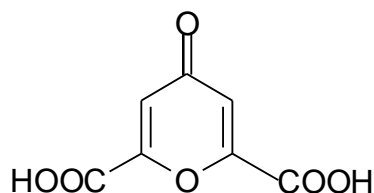
Koptisin

Přestože se výzkumem alkaloidů *Chelidonium majus* L. zabýval větší počet autorů, nebyla dosud věnována pozornost přítomnosti těch kvartérních alkaloidů, které na rozdíl od kvartérních alkaloidů benzofenarthridinového a protoberberinového typu nemohou být extrahovány nepolárním rozpouštědlem z alkalického roztoku. Protože je známo, že kořen a nadzemní část rostliny zásadně liší jak v obsahu, tak ve složení alkaloidů, byly zkoumány obě části odděleně. V obou případech byl postup stejný: nejdříve byl okyselený vodný extrakt vytřepáván etherem, aby byly odděleny nebazické nebo velmi slabě bazické látky (*frakce L*). Potom byl vodný roztok slabě alkalizován a znovu vytřepáván s etherem a byla získána *frakce A*. A nakonec silná alkalizace a vytřepávání s etherem dala *frakci B*. Další alkaloidy byly získány po jejich převedení na jodidy extrakcí chloroformem. 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 *frakce L* z kořene byly získány v závislosti na oxysanguinarinu, který byl izolován už dříve, dihydrosanguinarin, dihydrochelerythrin a dihydrochelirubin, také byla upřesněna přítomnost menšího množství dihydrochelilutinu. V nadzemní části byly detekovány pouze stopová množství dihydrosanguinarinu a dihydrochelerythrinu. Nález dihydrochelirubinu a dihydrochelilutinu v *Chelidonium majus* L. je vůbec prvním důkazem výskytu těchto 2 látek v přírodě.⁴⁸

3.4.2. Ostatní látky

3.4.2.1. Rostlinné kyseliny

Jako protiklad k bazickým alkaloidům najdeme v droze organické kyseliny a to především **kyselinu chelidonovou** vedle citronové, jablečné a jantarové.³⁷



Kyselina chelidonová

V jedné z novějších prací nalezneme také deriváty kyseliny kávové: 2-(-)-kaffeoyl-D-glycerová kyselina, 4-(-)-kaffeoyltrihydroxymáselná kyselina, 2-kaffeoyl-L-jablečná kyselina a ester kyseliny kávové s 1,4-laktonem kyseliny threonové.^{37,41}

Hydrolýzou vodno-methanolického extraktu drogy získáme kyselinu kávovou, p-kumarovou, ferulovou, gentisinovou a p-hydroxybenzoovou.³⁷ Ve vlašovičnicku byla také nalezena snad i kyselina mravenčí.⁵³ Dřívější práce uvádějí i přítomnost alkoholu chelidonolu⁴¹, ve šťávě z natě hojně fosforečnanu vápenatého a hořečnato-amonného, v semenech olej a velmi účinná lipasa. Dále byla v rostlině prokázána proteasa, peroxidasa, glukóza a fruktóza, třísloviny, kaučuk⁵³, vysoký obsah karotenů a kyseliny askorbové^{53,41} a flavonoidů rutinu a kvercetin.⁴¹ Glykosidy ani saponiny údajně nebyly nalezeny.⁵³ V novějších pracích už ale byly dokázány jako minoritní složky.³⁷ V celé rostlině je obsaženo hojně pryskyřičnatých látek, z nichž jedna – žlutě zbarvená – se uvádí v souvislost s toxicitou čerstvé rostliny.⁵³

3.4.2.2. Minoritní složky

Podle novějších zdrojů byly tedy z čerstvých nadzemních částí rostliny izolovány saponiny^{37,41} a flavonolaglykon. Ani jedna z obou sloučenin ale nebyla blíže identifikována. Rostlina mimoto obsahuje silice 0,1% v nati a třísloviny (bez bližších údajů).³⁷ Dále byly prokázány nespecifikované triterpenoidy, silice a kyselina nikotinová⁴¹, cholin a biogenní aminy – histamin, methylamin a tyramin (bez udání množství).^{41,37}

Minerální prvky: 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 v čerstvé droze (kořeni i nati), v jejím vodném roztoku a alkalickém extraktu.⁵⁴ Obsah prvků byl zkoumán pomocí ICP^{54,44} a emisní spektrometrií. Obsah Ca, Na a Fe byl nejvyšší v mikrovlnném poli.⁴⁴ Rozdíly v obsahu prvků v extraktu (vyjma Cu, Mn a Na) jsou značné. Bylo zjištěno, že kořeny obsahují 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.⁵⁴ Obsah Mg se liší podle části rostliny.⁵⁵ Byly zkoumány korelace mezi obsahem alkaloidů a minerálními a stopovými prvky v rostlině. Byl ustanoven vztah mezi obsahem Mg, Cr, Al, Co a Sr a protoberberinovými alkaloidy; stejně tak vztah mezi Mg, Cr, Al a Zn a benzofenanthridinovými alkaloidy byl evidentní.⁵⁶

Můžeme říci, že obsah makro-, ale i mikroelementů v extraktu značně přispívá k jeho terapeutické hodnotě.⁵⁴

3.5. Biologická aktivita obsahových látek

3.5.1. Metody studia aktivity rostlinných látek na AChE a BuChE

3.5.1.1. Atomová silová mikroskopie (AFM) a silová spektra (FS)

FS mezi mol. AChE a jejím přirozeným substrátem ACh a vliv inhibitorů a reaktivátorů AChE byly zkoumány AFM na molekulární úrovni v reálném čase. AChE a ACh byly kovalentně navázány na pozlacený povrch slídy a špičku (Si_3N_4) atomového silového mikroskopu. Nejprve byla AChE nahrána do obrazového módu AFM a jedna z molekul AChE byla vybrána jako centrum skeningu. Poté byl skenovací mód změněn v silový skenovací mód a FS zaznamenáno při frekvenci $5 \times \text{s}^{-1}$. Roztoky léčivých nebo toxických látek mohou být injikovány v jakýkoli požadovaný čas. FS mezi ideálně navázanou normální, inhibovanou nebo starší AChE a ACh mělo každé své vlastní tvarové rysy. Vliv léčivých nebo toxických látek na tyto rysy mohou být sledovány v reálném čase.⁵⁷

Měřením FS založeném na obrazu molekul AChE bylo zjištěno, že přitažlivé intermolekulární síly mezi individuálními molekulovými páry ACh a AChE jsou (10 ± 1) pN dokud se konec ACh s kvartérním N (tedy cholinový konec) nestřetne s negativním koncem AChE a vzdálenost, kdy dochází k rozpadu sil je (4 ± 1) nm od povrchu AChE. Adhezní síly mezi individuálními molekulovými páry ACh a AChE jsou (25 ± 2) pN. Jejich rozkladné vlastnosti jsou popisovány jako fast-slow-fast. Přitažlivé síly mezi AChE a Ch jsou totožné jako ty mezi AChE a ACh. Adhezní síly jsou pak o něco slabší. Z výsledků vyplývá, že AChE má řídicí úlohu pro difuzi ACh a brání odcházení Ch klasickou cestou, čímž umožňuje jeho kontakt s AChE jako cholinový konec ACh.⁵⁸

Výsledky tedy ukazují, že AFM může být použita jako nová metoda studia efektu léčivých a toxických látek – tedy i obsahových látek z *Chelidonium majus* L. - na aktivitu enzymu z hlediska farmakologie a toxikologie.⁵⁷

3.5.1.2. TLC

Pro screening inhibitorů AChE a BuChE z rostlinných extraktů byla vyvinuta také jednoduchá a rychlá bioautografická enzymová zkouška na TLC deskách. Enzymová aktivita byla detekována přeměnou 1-naftyl-acetátu na naftol, která byla doprovázena odpovídající barevnou reakcí červeného diazonia s Fast Blue B solí. Inhibitory cholinesteras zanechávaly

bílé zóny na světle fialovém pozadí TLC desek. Jako detektory citlivosti reakce byly použity známé inhibitory AChE alkaloidy galanthamin a fysostigmin.⁵⁹

3.5.2. Inhibice BuChE některými isochinolinovými alkaloidy

Byla studována také inhibice BuChE v lidském séru protoberberinovými, benzofenanthridinovými a aporfinovými alkaloidy v porovnání se 4 modelovými sloučeninami. Alkaloidy byly (až na výjimky) izolovány z rostlinného materiálu a převedeny na rozpustné soli – chloridy a hydrochloridy. Mechanismus inhibice je vysvětlován na základě rozdílných typů interakce těchto sloučenin s BuChE a AChE.

Je známo, že některé sloučeniny s kvartérním dusíkovým atomem v molekule fungují jako inhibitory BuChE. Jejich efekt na BuChE aktivitu a následně na AChE se liší jejich inhibiční schopností a mechanismem indukce s enzymy. Bylo zjištěno, že kvartérní protoberberinové a benzofenanthridinové alkaloidy inhibují AChE prostřednictvím vazby na tzv. γ -anionickou stranu enzymu umístěného mimo aktivní centrum enzymu.

Tab. 3: Inhibice cholinesteras

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}

Pozn.: Hodnota I_{50} byla určena ze závislosti koncentrace alkaloidů vs. procento inhibice.

Aktivita BuChE byla určena jako počáteční stupeň hydrolýzy butyrylthiocholin jodidu. Množství uvolněného thiocholinu v čase bylo měřeno fotometricky s pomocí DTNB (5,5'-

dithio-bis-2,2'-nitrobenzoovou kyselinou). Měření byla provedena při vlnové délce 405 nm, pH 7,7 a koncentraci substrátu 7 mmol/l. Aktivita pak byla stanovena pomocí komerční sady „Test-Combination Cholinesterase“ Boehringer.

Protoberberinové alkaloidy jsou pouze slabé inhibitory BuChE. Jejich IC_{50} není možné ani detekovat. Inhibiční efekt benzofenanthridinových alkaloidů (sanguinarinu, chelerythrinu) a indenoisochinolinového derivátu na BuChE je daleko nižší než na AChE. U všech studovaných alkaloidů se jedná o kompetitivní mechanismus inhibice. Kinetika dvou současně působících inhibitorů na aktivitu BuChE prozrazuje podobnost kompetitivního mechanismu působení v páru N-methylfenanthridin a chelerythrin. Kinetická měření ukazují, že všechny studované typy alkaloidů jsou vázány na aktivní centrum BuChE. Hydroxylem substituované protoberberinové alkaloidy (kolumbamin a jatrorrhizin) a aporfínové alkaloidy se pravděpodobně váží na stejnou vazebnou stranu, která se ale liší od místa vazby benzofenanthridinových alkaloidů. Aktivní centrum BuChE se skládá stejně jako aktivní centrum AChE ze dvou funkčních jednotek – esterové a anionické. Enzymy se ale navzájem liší anionickou jednotkou, přičemž esterová je stejná. Anionická jednotka BuChE je stéricky omezena a vazba inhibitorů je tedy ovlivněna jejich tvarem a velikostí. Při interakci aktivního centra BuChE s inhibitorem hraje řetězec anionického centra daleko menší roli než je tomu u AChE. Nejvíce se zde na interakci podílejí Van der Waalsovi síly a hydrofóbní interakce. Je také zřejmé, že BuChE pravděpodobně nemá své anionické centrum umístěné na okraji. Na rozdíl od AChE se u BuChE všechny studované sloučeniny váží na aktivní centrum enzymu. Benzofenanthridinové alkaloidy (sanguinarin a chelerythrin) stejně jako slabé inhibitory berberin a koptisin se váží na anionické centrum. Rozdílná schopnost inhibice může být vysvětlena jejich rozdílnou hydrofobicitou a stereochemií molekuly.³⁵

Všechny alkaloidní inhibitory AChE jsou terciární baze; ukázalo se však, že také kvartérní amoniové baze alkaloidního³⁵ i nealkaloidního typu⁶⁰ mají aktivitu vůči mozkové AChE a BuChE.

3.6. Farmakologické účinky rostliny *Chelidonium majus* L.

Až do roku 1970 byla zkoumána pouze čerstvá droga : „Herba Chelidonii recens – čerstvá, na začátku doby květu, sbíraná nať s kořeny“. Převládlo mínění, že droga při sušení ztrácí své účinné látky. Většina farmakologických výzkumů byla tedy 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 tudíž jen obtížně převeditelné na sušený vzorek drogy. A proto jsou v podstatě nepoužitelné (nejsou stejné podmínky experimentů), přesto ale objasňují, kde spočívá základní působení drogy.³⁷

3.6.1. Protinádorové a antivirové působení

Klinické použití vlaštovičníku při léčbě nádorů se datuje již od minulého století. Botkin popsal dva případy karcinomu léčené extrakty z vlaštovičníku. Další klinické údaje z tohoto období popisují užití chelidoninsulfátu při rakovině žaludku, extraktu z vlaštovičníku při karcinomu prsu a dalších orgánů. Dále má droga dlouhou historii při léčbě bradavic, papilomů a kondylomat.⁴¹ Později při testování rostlinných extraktů na antitumorovou aktivitu byl pozorován inhibiční účinek extraktů z vlaštovičníku na sarkom 180 a Ehrlichův myší sarkom.^{37,41} Při intenzivním výzkumu antitumorové aktivity v šedesátých letech byly popsány inhibiční účinky extraktů z vlaštovičníku 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.

V nedávné době opět vzrostl zájem o využití vlaštovičníku při terapii karcinomů, a to v souvislosti s přípravkem **Ukrain** vyvinutým a patentovaným rakouskými autory. Tento preparát obsahuje alkaloidy *Chelidonium majus* L. konjugované s kyselinou thiofosforečnou a vyznačuje se imunomodulační aktivitou. Působí zvýšení počtu T-lymfocytů a normalizaci poměru T-helper/T-supresorových lymfocytů, bez ovlivnění hladiny imunoglobulinů. Přípravek byl aplikován pacientům s různými typy karcinomů. Byl pacienty dobře snášen, navodil obnovení buněčné imunity, provázené objektivním zlepšením stavu pacientů a v několika případech i regresi tumorů. V *in vivo* studiích na myších tumorech bylo prokázáno,

že intravenózní podávání **Ukrainu** snižuje rychlost růstu tumoru. V pokusech *in vitro* bylo doloženo, že preparát obnovuje porušenou schopnost makrofágů lyticky štěpit tumorové buňky prostřednictvím stimulace LPS (lipopolysacharid, endotoxin). Obnovená cytolytická aktivita je nezávislá na TNF- α , což naznačuje, že **Ukrain** aktivuje alternativní cytolytický mechanismus u makrofágů. Studium dalších vlastností uvedeného přípravku je nadále věnována značná pozornost.

3.6.2. Hepatotropní spasmolytické účinky

Tradiční použití vlašovičnicku při onemocněních žlučových cest a jater je zcela odlišnou oblastí indikace vlašovičnicku. 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 spasmu hladké svaloviny pochází vesměs ze starších prací. 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. Příznivé účinky preparátu **Panchelidon** obsahujícího extrakt z čerstvých rostlin s obsahem 20 % alkaloidů při léčbě chronické cholangitidy, cholelithiasy a diskinezi popsal v roce 1977 Neumann-Mangoldt. Preparát vykazoval spasmolytický a středně analgetický účinek, výrazně omezoval diarrhoeu, vyvolanou léčbou antibiotiky.⁴¹ Zpomalení střevní pasáže je způsobeno centrálním sympatomimetickým působením alkaloidů vlašovičnicku.³⁷ Weiss hodnotí účinky vlašovičnicku jako nekonstantní. S odvoláním na vlastní zkušenost uvádí, že účinnost drogy klesá delším uchováváním a je tedy nutné užívat extrakty vždy z čerstvé drogy. (Oproti tomu dle poznatků E. Táborské a kol. se obsah alkaloidů v usušené droze uchováváním nemění, stejně jako se nemění alkaloidní složení tinktury uchovávané několik měsíců v chladu). 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.⁴¹ Existuje řada klinických studií provedených především v 30-tých letech hlavně na pacientech s chorobami žaludku, střeva a jater (také s chronickým městnáním žluči či zánětem žlučníku). Pacienti byli léčeni preparáty z čerstvé rostliny (vylišované šťávy nebo rozetřena celá rostlina 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) bylo vlašovičnicku přiřazeno spasmolytické působení na

GIT a žlučové cesty. Působení bylo přičítáno především chelidoninu. Také v monografii *Chelidonii herba* se udává: „Dostatečně jisté je papaverinu podobné, lehce spasmolytické působení na horní část GIT.“; jak je už předesláno, nenacházejí se v literatuře žádné dostatečné podklady. K otázce zda má vlašovičnický cholagogní působení, či zda se jedná jen o efekt choleretický nebo cholekinetický, neexistují žádné dostačující důkazy. Podle klinických studií, provedených hlavně ve 30-tých letech, mají mít preparáty celé čerstvé rostliny podávané p.o. u pacientů s cholestasou cholagogní působení. V jedné z novějších prací bylo zkoumáno působení alkoholového suchého extraktu ze sušené nati na sekreci žluče a pankreatické šťávy u pacientů se smíšenými hepatopatiemi (část pacientů měla zřetelně znatelný syndrom cholestasy). Pomalé, ale kontinuální zvyšování žlučového proudu bylo autorem označeno jako choleretický účinek. Zda cholagogní působení drogy pro terapii nemocí žluč. cest vůbec praktické uplatnění, zůstává otázkou.³⁷

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 xantorrhiza*. Preparát obdobného složení **Aristochol** (Steiber and Co.) byl hodnocen Baumanem, který uvádí, že přípravek zvyšuje vylučování žluči, sekreci lipasy a amylasy. Pozitivní účinky preparátu **Hepaticum-Medice** (Medice) na metabolismus žlučových kyselin popsal Matzekis.

3.6.3. Biologické účinky hlavních obsahových látek

Hlavními alkaloidy rostliny jsou koptisin a chelidonin. Přestože koptisin se strukturně jen málo liší od berberinu, jehož biologické účinky byly předmětem řady studií, o účincích samotného koptisinu 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. Lze očekávat, že koptisin vykazuje i řadu dalších efektů analogických berberinu.

Druhý hlavní alkaloid chelidonin má významné spasmolytické účinky. Působí na spasmy GIT a bronchů, snižuje tonus hladkého svalstva dělohy, uretry a cév. Jeho spasmolytický účinek je poloviční ve srovnání s papaverinem. Chelidonin též snižuje krevní tlak a zpomaluje srdeční aktivitu působením přes *nervus vagus*. Polští autoři uvádí, že

chelidonin vykazuje inhibiční účinek na dopaminergní struktury u krys v dávkách 50-200 mg/kg. Snižuje spontánní motorickou aktivitu a tělesnou teplotu. Potencuje aktivitu hypnotik, zvyšuje tlumivý účinek reserpinu. Má cholagogický a choleretický účinek a ve žlučových cestách působí antisepticky. Má také antimitotické účinky.

Značná pozornost byla věnována biologickým účinkům benzofenanthridinovým alkaloidům sanguinarinu a chelerythrinu, které byly izolovány i z jiných rostlinných druhů, přičemž kořen vlašovičnicku patří k jejich nejvýznamnějším zdrojům. Již dlouho jsou známy v praxi využívány protizánětlivé^{41,43} a antimikrobiální účinky těchto alkaloidů.⁴¹ Sanguinarin navíc snižuje nitrooční tlak, chelerythrin má sedativní, analgetické a spasmolytické účinky.⁴³ V zemích bývalého Sovětského svazu je vyráběn preparát **Sangviritrin**, obsahující směs sanguinarinu a chelerythrinu. V Severní Americe jsou benzofenanthridinové alkaloidy součástí některých přípravků užívaných v ústní hygieně. Byly popsány inhibiční účinky sanguinarinu a chelerythrinu na celou řadu enzymů např. na cholinesterasy, alaninaminotransferasu, Na⁺/K⁺-ATPasu, Ca²⁺-ATPasu. Oba alkaloidy působí též jako rozpojovače respirace a oxidační fosforylace. S nativní dvouspirálovou DNA vytváří komplexy typu interkalace, inhibují syntézu RNA na DNA matici a 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 báze. Sanguinarin rovněž zvyšuje vodivost lipidové dvouvrstvy. Chelerythrin, sanguinarin a chelidonin mají též prokazatelné antimitotické účinky. Zdá se, že mechanismus jejich působení naznačuje nedávné zjištění, že uvedené tři alkaloidy inhibují polymeraci tubulinu. Lze předpokládat, že antimikrobiální i cytostatická aktivita těchto alkaloidů je podmíněna výše uvedenými účinky na řadu klíčových enzymů buněčného metabolismu.⁴¹ Někteří autoři uvádějí, že cytostatický účinek benzofenanthridinových alkaloidů je pro jejich toxicitu a malou terapeutickou šířku prakticky nevyužitelný.⁴³

Jeden ze zdrojů uvádí, že jsou to především dva alkaloidy, sanguinarin a chelidonin, které způsobují farmakodynamické účinky vlašovičnicku na následující oblasti:

- specificky na játra a žlučovody; jde o cholagogní, choleretický a hypolipidemický účinek.
- sekundárně na plíce; jde o antitusický a antihistaminický účinek.
- následně na ledviny.⁶¹

Řada významných fyziologických účinků byla popsána u kvartérního alkaloidu berberinu, jehož zastoupení v kořeni je srovnatelné se sanguinarinem. Tento alkaloid, jehož

hlavním zdrojem jsou druhy rodu *Berberis*, má některé účinky podobné chelidoninu. V Evropě a na Dálném východě je po mnoho staletí užíván jako prostředek proti průjmu, žloutence a chronické dysenterii. Stimuluje sekreci žluče a má rovněž hypotenzivní, vazodilatační a sedativní účinky. V *in vitro* pokusech bylo popsáno, že působí jako antagonist α -2-adrenoreceptorů lidských krevních destiček. Působí inhibičně na některé enzymy a má antibakteriální účinky. Řada prací se zabývá účinkem berberinu na srdeční aktivitu. V pokusech na zvířatech byly zjištěny jeho pozitivní ionotropní a dromotropní a negativně chronotropní efekty.⁴¹

Stylopin je hlavním alkaloidem nadzemní části rostliny, která byla užívána v orientálních státech na odstranění bradavic, papilomat a kondylomat, stejně jako na léčbu jaterních onemocnění. Stylopin nemá cytotoxický efekt na nestimulované buňky RAW 264.7, ale v závislosti na koncentraci redukuje produkci NO, PGE₂, TNF α a interleukinů – IL-1b a IL-6 a aktivitu COX-2. Výzkumy prokázaly, že stylopin potlačuje produkci oxidu dusnatého a PGE₂ v makrofázích inhibicí induktibilní NO-synthasy a COX-2. Tato biologická aktivita stylopinu pravděpodobně podporuje protizánětlivý účinek celé rostliny.⁶²

Ačkoliv je často popisováno antimikrobiální působení jednotlivých alkaloidů *Chelidonium majus* L., je na toto téma provedeno jen minimum pokusů. Vysušený, 70% ethanolem upravený extrakt ze sušené drogy Chelidonii herba vykazuje na agarovém kultivačním testu (400 μ g/misku) slabé antibakteriální působení proti *Staphylococcus aureus* 209, *St. aureus* 617, *Escherichia coli* 12,835 (lac.+sach.), E. „crim“ 2584 a *Shigella sonnei* 3c (Minimální inhibiční zóny : méně než 10 mm v průměru). Ethanolový tekutý extrakt ze sušené celé rostliny (nerozlišuje se, jestli z celé rostliny nebo jen z nati) ukazuje v agarovém difuzním testu od slabého až po silné antimykotické působení proti různým druhům : *Candida*, *Trichophyton*, *Microsporum*, a *Epidermaphyten* (Inhibiční průměr 12-30 mm, bez udání dávky). Inhibiční působení extraktu se liší také podle doby sběru drogy (inhibiční průměr extraktu u *Candida albicans* : doba sběru červenec = 12-13 mm; září = 24-30 mm).³⁷

Rovněž některé z nealkaloidních látek prokázaných v *Chelidonium majus* mají výrazné fyziologické účinky. Kyselina kávová i její estery mají spasmolytickou, cholagogickou a antibakteriální aktivitu.⁴¹ Kyselina chelidonová má sedativní účinek.⁶¹ Nebylo dosud zkoumáno, do jaké míry se na terapeutických efektech vlašovičnicku mohou podílet tyto látky.

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 přisuzována již za 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 jako⁴¹ droga, extrakt nebo tinktura s účinkem spasmolytickým, cholagogickým,^{41,43} analgetickým, 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.⁴¹

Chelidonium majus se používá jako surovina pro farmaceutický průmysl.⁴⁰ Extrakty z vlaštovičníku jsou součástí řady galeník, produkovaných zejména v západní Evropě.⁴¹ Jsou indikovány při hepatopatiích, na doléčení posthepatických stavů, poruchách funkce žlučníku a po jeho operacích^{41,43} a jako mírné sedativum.⁴³ V Číně se extrakty z *Chelidonium majus* užívají při léčbě chronické bronchitidy, dávivého kašle a jako analgetikum.

Vlaštovičník je součástí řady homeopatik⁴¹, kde se používá v těchto základních klinických indikacích:

- ikterus způsobený cholestázou,
- virová hepatitida s cholestázou,
- zácpa a světlá stolice,
- u žlučové koliky jako doplňková terapie k spasmolytickým lékům,
- hypercholesterolemická lithiáza.⁶¹

V lidovém léčitelství se stále traduje použití rostliny, zejména čerstvé šťávy, jako prostředku k odstranění bradavic.⁴¹

Semena pak obsahují 40-60 % technicky upotřebitelného oleje.⁴⁰

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST A VÝSLEDKY

4.1. Všeobecné postupy

4.1.1. Destilace a odpařování

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

Odpařování chromatografických frakcí bylo prováděno na vakuové odparce 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. Materiál a vybavení

4.2.1. Rozpouštědla, chemikálie a standardní látka

Rozpouštědla:

Cyklohexan; C₆H₁₂, č.

Diethylether, č. bez stabilizátoru

Ethanol 95%; EtOH, denaturovaný methanolem, č.

Chloroform; CHCl₃, č.

Methanol; CH₃OH, č.

Diethylamin; Et₂NH₂, č.

Toluen; C₆H₅CH₃, č.

Chemikálie:

Kyselina sírová 96%; H₂SO₄, p.a.

Vodný roztok chlorovodíku 36%, HCl, p. a.

Kyselina octová 99%; CH₃COOH, p. a.

Dusičnan bismutitý zásaditý; Bi₂(NO₃)₃

Kyselina vinná, č.

Jodid draselný, p. a.

Standardní látka:

Allokryptopin (Sigma-Aldrich)

4.2.2. Chemikálie a materiál ke stanovení účinku erythrocytární AChE (IC₅₀)

Chemikálie:

Acetylthiocholinjodid, ≥99,0% (Fluka, Sigma-Aldrich, Praha, ČR)

5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoová kyselina), DTNB, ≥98% (Sigma-Aldrich, Praha, ČR)

Dihydrát dihydrogenfosforečnanu sodného, p.a. (Lachema, Brno, ČR)

Dodekahydrát hydrogenfosforečnanu disodného, p.a. (Lachema, Brno, ČR)

Ethanol, EtOH, (Fluka, Sigma-Aldrich, Praha, ČR)

Materiál:

Hemolyzát lidských erythrocytů, který sloužil jako zdroj acetylcholinesterázy:

- plná krev byla odstředěna po dobu 15 minut při 10000 ot./min, získaná erythrocytární 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.⁶³

Plastové kyvety DISPOLABKARTELL 1937 PS MICROCUVETTES.

4.2.3. Přístroje

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

pH metr Φ 72 METER (Beckmann, USA)

UV-spektrofotometr UVIKON 942 (Kontron instruments, Švýcarsko)

4.2.4. Detekční činidla

D 1: Dragendorff činidlo modifikované podle Muniera:⁶⁴

- pro alkaloidy a ostatní sloučeniny obsahující dusík
- *roztok A*: se připraví rozpuštěním 1,7 g zásaditého dusičnanu bismutitého a 20 g kyseliny vinné v 80 ml vody.
- *roztok B*: se připraví rozpuštěním 16 g jodidu draselného ve 40 ml vody
- *zásobní roztok*: připravíme smísením roztoků A a B v poměru 1:1. Ta může být uložena několik měsíců v lednici.
- *činidlo pro analýzu*: se připraví tak, že se k roztoku 5 ml kyseliny vinné rozpuštěné v 50 ml vody přidá 5 ml zásobního roztoku.

4.2.5. Chromatografické adsorbenty

A 1: Oxid hlinitý neutrální (Reanal, Hungary), 0,1 – 0,2 mm

Komerční adsorbent se suspenduje v trojnásobném 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 prakticky neutrální. Po odsátí a několikadenním vysušení na bezprašném místě se aktivuje 12 hodin při 200 °C, po zchlazení v uzavřené nádobě se deaktivuje přidávkem 6 % vody, dobře promíchá a ponechá min. 24 hodin ekvilibrovat.

A 2: Oxid hlinitý kyselý, 0,1 – 0,2 mm

Byl připraven modifikací popsané metody⁶⁵ z oxidu hlinitého neutrálního (Reanal): 1000 g adsorbentu bylo rozmícháno s 2 l vodného roztoku chlorovodíku, 12 hodin mícháno vrtulovou míchačkou po dalších hodinách (za občasných míchání) byla suspenze ostře odfiltrována přes fritu a ponechána sušit na vzduchu za nepřístupu prachu po dobu 3 dnů za občasných míchání ve vrstvě nepřevyšující 2 cm. Po této době byl adsorbent aktivován 12 hodin 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.

A 3: Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck), 5×10 cm.

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

A 4: Silufol® UV 254, (Kavalier Votice), 15×15 cm.

Hotové desky pro chromatografii na tenké vrstvě. Hliníková fólie; sorbent: Silpearl – širokoporézní silikagel podle Pitry s luminiscenčním indikátorem pro UV 254.

4.2.6. Vytváření soustavy pro tenkovrstvou chromatografii

S 1: C₆H₁₂ – Et₂NH₂ 9:1

4.3. Postup extrakce alkaloidů z *Chelidonium majus* L.

4.3.1. Původ drogy

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 2006⁶⁶ 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, byly přidány asi 2 litry vody. Vznikl temně hnědý, dehtovitý, sirupovitý odparek.

Tento extrakt byl rotací rozehrát 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, seděly více u dna), dehet byl seškrabán, umístěn do velké kádinky, přidáno 500 ml bezvodé kyseliny octové a na vodní lázni byla směs dokonale 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 znova ve 200 ml octové kyseliny, zase rozehrát a srážen 4 litry vody. Oba dekantáty byly spojeny, ponechány přes noc stát, poté byl tento oranžový roztok zfiltrován přes skládaný polyamidový filtr, ten byl promyt vodou a ponechán vykapat; vyloučil se práškovitý sediment hnědo-oranžové barvy. Oba kyselé filtráty (z kyseliny sírové i octové) byly spojeny; vyloučila se bělavá sraženina; vzniklá suspenze byla znovu zfiltrována přes polyamidový filtr, filtr promyt 1,5 l 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 5x 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 nekystaloval.

4.3.4. Čištění surového výtřepku A

151,0 g tohoto odparku bylo rozpuštěno při cca 50 °C celkem ve 4,2 litrech 0,3 M kyseliny 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 okyselena 1M kyselinou sírovou na pH ~4, všechny alkaloidy kromě pseudobází 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 odpařen 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 bylo získán světle hnědý, nekystalický odparek (6,01 g).

4.3.6. Separace výtřepku A po odstranění benzofenantridinových bazí

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 fenolových 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).

4.4. 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).

4.4.1. 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 suspenzovány (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).

4.4.2. Příprava alkaloidů z chloridů rozpustných v chloroformu (AC):

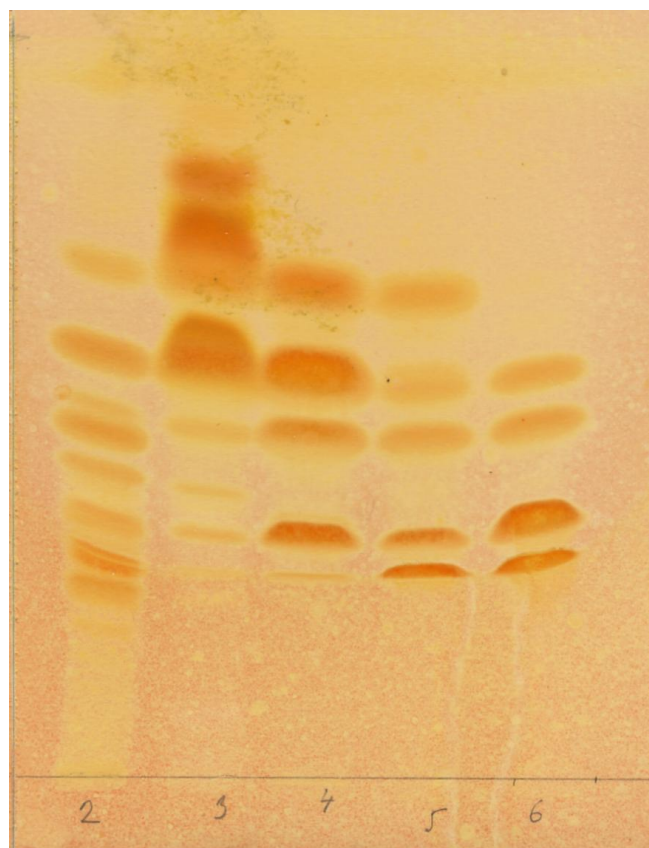
800 ml oranžového filtrátu po oddělení nerozpustných chloridů bylo vytřepáno 6x 250 ml chloroformu, chloroform odpařen, zbytek rozpuštěn ve 130 ml 0,3 M kyseliny sírové, roztok zředěn vodou na 800 ml, alkalizován 25% amoniakem na pH 9 a vytřepán 5x 600 ml diethyletheru za vzniku pevného, světle hnědého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

4.4.3. 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).

Tab. 4: Výsledky přípravy výtřepků s terciárními a kvartérními bazemi z nati s kořeny

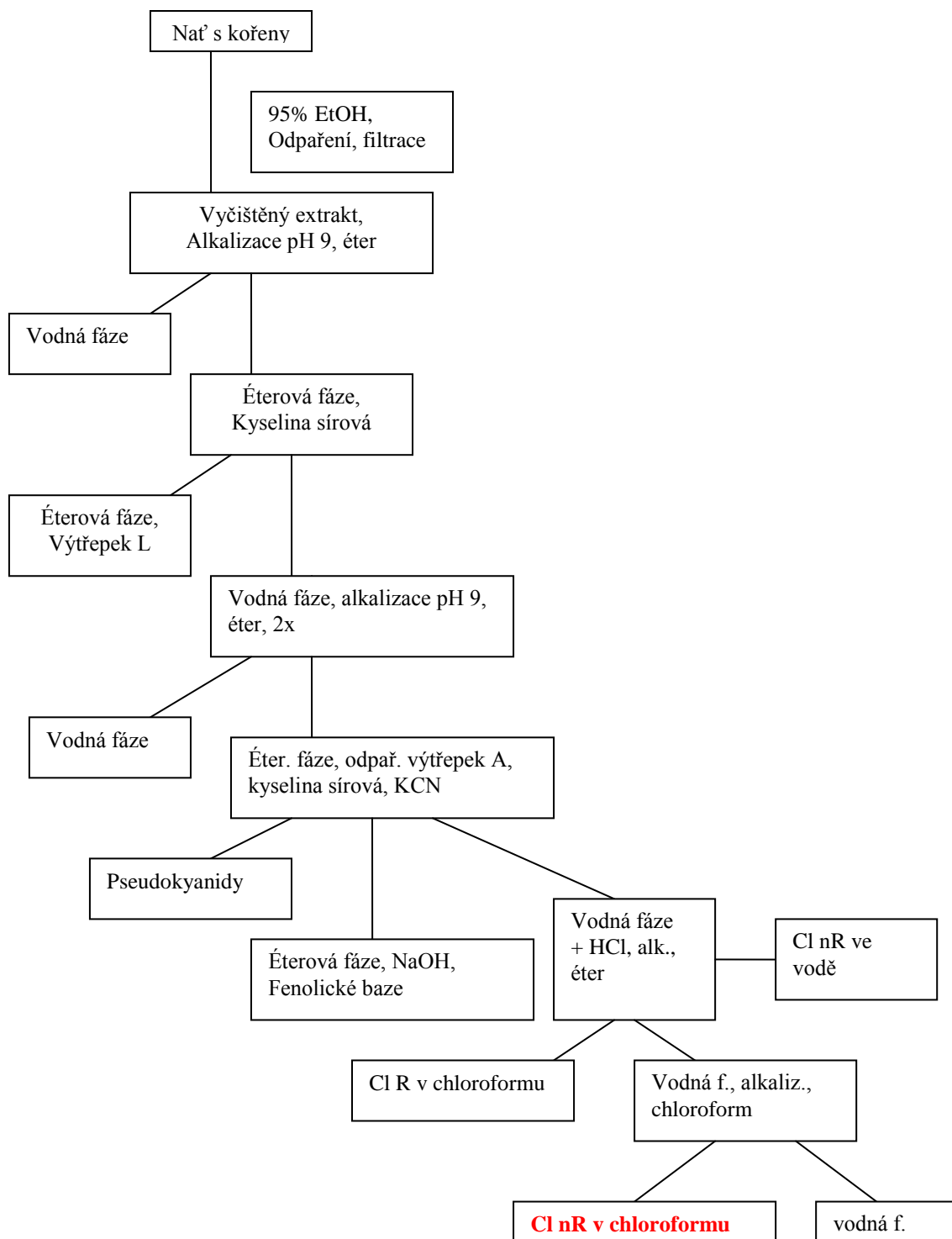
Označení	Č. na chromatog.	Odparek (g)	Popis
L	1	0,30	Tmavě hnědý s vylouč. kryst.
A-fenoly	2	0,35	Tmavě hnědý nafouklý
A-benzofenathr.	3	6,01	Hnědý, nafouklý
Cl ⁻ nR H ₂ O	4	45,27	Nažloutlý, prakticky krystalický
AC (R Ch)	5	3,38	Světle hnědý, tvrdý
AD (nR Ch)	6	15,91	Práškovitý, bílý



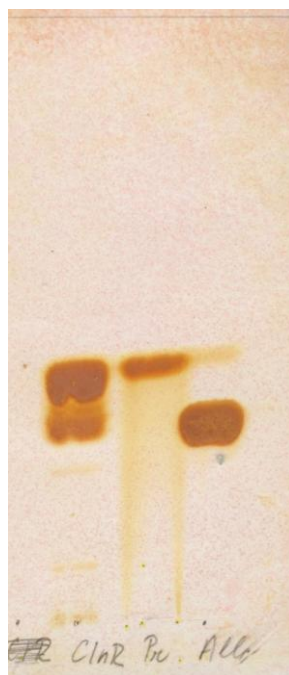
Obr. 5: Kontrolní TLC jednotlivých typů výtřepků z nati s kořeny vlašovičniku

(Pozn.: Kieselgel F₂₅₄, S1, komora nasycená, vyvíjení 1x detekce Dragendorffovo činidlo; popis viz tab. 4)

Schéma přípravy alkaloidních koncentrátů (extrakce nati s kořeny vlašovičniku)



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



Obr. 6: Kontrolní TLC bází alkaloidů z chloridů nerozpustných v chloroformu Cl nR) 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 ve 20 ml chloroformu, smíchána s 15 g adsorbentu, rychle vysušena při 40 °C a dosušena 16 hodin ve vakuovém exsikátoru nad silikagelem. Potom byla nanášena na sloupec obvyklým způsobem.

Sloupec byl připraven nalitím suspenze adsorbentu. Chromatografie byla prováděna za následujících podmínek (Tab. 5)

Tab. 5: 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-CHCl ₃ 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

4.5.1. Čištění frakcí 38-44 (allokryptopin)

Spojené frakce 38-44 byly krystalizovány z ethanolu za vzniku 2,18 g velmi jemných bílých prizmatických jehlic.

Allokryptopin C₂₁H₂₃NO₅ (369,416), t. t. 162-163 °C, směsná t. t. bez deprese, chromatografické srovnání se standardem připraveným z komerčního hydrochloridu (Kieselgel F₂₅₄, S1, komora nasycená, Dragendorffovo činidlo, R_f 0,38) bez rozdílu hodnot R_f.

Vypočteno C 68,27; H 6,27; N 3,79

Nalezeno C 67,99; H 6,02; N 3,85

Tab. 6: Chování allokryptopinu alkaloidů na vrstvě silikagelu

Látka	Viditelné	366 bez indikátoru	254 s indikátoru
Allokryptopin	0	0	Černý (zháší)

4.6. Stanovení účinku alkaloidů na erytrocytární AChE (IC_{50})

4.6.1. Podmínky měření

Experimenty byly prováděny za těchto podmínek:

- 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.

4.6.2. Stanovení hodnot IC_{50}

Cholinesterasy jsou kompetitivně inhibovány kvartérními, ale i nekvartérními látkami. Pokles aktivity je úměrný použité koncentraci inhibitoru. Stanovení aktivity enzymu je založeno na jeho reakci s nativním substrátem, kdy je tento štěpen na alkohol cholin a kyselinu octovou.

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 délka absorbance, která je úměrná aktivitě erytrocytární acetylcholinesterasy.⁶⁷

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.

4.7. Matematické zpracování experimentálních dat

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).

4.8. Výsledky testu vlivu látky na aktivitu AChE

Tab. 7: Biologická aktivita allokryptopinu

Látka	IC ₅₀ [M]	95% konfidenční interval [M]
Allokryptopin	0.00147	0.00133-0.00162

5. DISKUSE

Alzheimerova choroba je dnes jedním z velmi častých onemocnění, proto je otázce její terapie věnována poměrně velká pozornost. Bohužel nejde o záležitost bezproblémovou. AD je totiž multifaktoriálním onemocněním neznámé etiologie a při její terapii nezbyvá než vycházet ze známých patofyziologických řetězců, které vedou k jejímu vzniku. Ve výsledku jde o progresivně se zhoršující chronické onemocnění mozku; dochází k celkovému zhoršení mozkové činnosti a zejména paměti, funkcí sensorických a motorických. V praxi se v rámci terapie užívají hlavně látky ovlivňující osud ACh a AChE. Řada sloučenin má cholinomimetické účinky velmi příznivé. Často se nejedná bohužel jen o žádoucí centrální, ale i o vedlejší periferní účinky, díky nimž je řada látek nevyužitelných. Z přírodních látek přichází v úvahu jen několik málo sloučenin; v současné době začíná být prakticky využíván pouze galanthamin (Reminyl[®]). Jedná se o reverzibilní AChEI s dualistickým působením – provádí reverzibilní inhibici AChE a také moduluje pre- i postsynaptické nikotinové receptory. Touto modulací se zlepšuje jednak výdej ACh z presynaptických zakončení, jednak se do jisté míry brání desensitizaci postsynaptických muskarinových řetězce.² Velmi intenzivně se pracuje i na různých galanthaminových derivátech.⁶⁸

Další velmi perspektivní přírodní látkou je alkaloid izolovaný z některých zástupců čeledi Lycopodiaceae – Huperzin A. Terapeutická dávka je podstatně nižší než u galanthaminu¹ (LD₅₀ při aplikaci p.o. u člověka = 0,1 mg).¹⁶ Syntéza racemátu i přírodního (-)-Huperzinu A je v současné době už vypracována.¹ I jiné studie dokazují vysokou inhibiční aktivitu Huperzinu-A. V dávce 0,03 až 0,06 μM Huperzin-A už po 30 minutách po i.c.v. injekci jednoznačně vykazuje inhibici mozkové AChE. Jeho inhibiční aktivita vůči AChE/BuChE (IC₅₀ = 0.082 μM) je výraznější než takrinu (IC₅₀ = 0.093 μM), fysostigminu (IC₅₀ = 0.251 μM) a galanthaminu (IC₅₀ = 1.995 μM), ale nižší než donepezilu (IC₅₀ = 0.01 μM).⁶⁹ Huperzin-A je velkou nadějí, protože syntetické látky v současnosti používané (donepezil, takrin) nenaplňují terapeutické potřeby podle našich představ. Navíc je takrin dnes už léčivem v podstatě prakticky nevyužitelným.

Z těchto důvodů probíhá intenzivní výzkum jak syntetických, tak přírodních léčiv s ohledem na jejich schopnost reverzibilně zastavovat rozklad mozkové AChE. Jako velmi nadějně se kromě různých syntetických látek ukazují i některé přírodní látky. Patří sem např. již výše zmiňovaný huperzin (*Huperzia serrata*, Huperziaceae); dále zeatin (*Fiatoua villosa*, Orchidaceae nebo *Zea mays*, Poaceae) s IC₅₀ 1,9.10⁻⁴ M a navíc s inhibičním efektem na tvorbu β-amyloidu; dekursinol (*Angelica gigas*, Apiaceae) – má vysokou inhibiční aktivitu vůči AChE *in vitro*¹; ursolová kyselina, která byla izolována z většího počtu druhů čeledi Lamiaceae (*Majorana hortensis*, *Rosmarinus officinalis*, *Salvia officinalis*), má vysoký

inhibiční efekt vůči AChE¹⁶, který je na dávce závislý, kompetitivního/nekompetitivního typu¹⁸; α -onocerin (*Ononis spinosa*, Fabaceae); α -viniferin (*Caragana chamlague*, Fabaceae); faleoconitin a pseudoaconitin - nové norditerpenoidní alkaloidy s inhibiční aktivitou vůči AChE (*Aconitum falconeri*, Ranunculaceae)²⁰. Z čeledi Ranunculaceae prokazují signifikantní inhibici AChE také např. cynatosidy A, B, C a to A- β -D-oleandropyranosid, B-cymaropyranosyl-digitoxopyranosyl- β -D-oleandropyranosid (nejaktivnější) a C-cymaropyranosyl-digitoxopyranosyl- α -D-oleandropyranosid (*Cynanchum atratum*, Ranunculaceae);¹ z čeledi Buxaceae pak (+)-homomoenjadaramin, moenjadaramin (*Buxus hyrcana*, Buxaceae) a cykloprotobuxin C, cyklovirobuxein A, cyklomikrofilin A (*Buxus papillosa*, Buxaceae). Výzkum se zabývá i látkami, které můžeme zařadit mezi meroterpenoidy¹ jako jsou arisugaciny A, B, C, D, E, F, G a H.¹⁹ Všechny tyto látky jsou produkovány některými druhy *Penicillium*. Inhibice AChE byla pozorována také např. u 1,8-cineolu a terpinen-4-olu, tj. obsahových látek z Tea Tree Oil²³, steroidních alkaloidů ze *Sarcococca saligna* (Asteraceae)²⁴, ceramidů z *Tanacetum artemisioides* (Buxaceae)²⁶, ale i u jiných nedusíkatých látek jako jsou xanthony. Čtyři z nich působí dokonce jako duální inhibitory AChE a MAO.²⁷

Výzkum se zabývá ale i látkami, které působí na AChE jako pseudoirreverzibilní inhibitory jako je např. ganstigmin – látka strukturálně příbuzná alkaloidu genserinu (1,2-oxazinový kruh) s výraznější inhibicí AChE než BuChE. Navíc ganstigmin zvyšuje také hladinu serotoninu a mohl by příznivě ovlivňovat deprese, které se u pacientů s AD často vyskytují. Nachází se v II. fázi klinického hodnocení.¹ Jedná se o látku velmi nadějnou.

Z hlediska preparativního jsou alkaloidy atraktivní také tím, že se s nimi podstatně lépe pracuje než s neutrálními sloučeninami (lze je rychleji a méně nákladně čistit). Jednou z rostlin, u kterých se vyskytly alkaloidy biologicky aktivní vůči AChE je vlašovičník větší (*Chelidonium majus* L.).

Rostlina obsahuje 4 základní skupiny alkaloidů:

1. benzofenanthridinový typ (α -naftofenanthridinový typ):
 - terciální alkaloidy: např. chelidonin.
 - kvartérní alkaloidy: např. sanguinarin.
2. protoberberinový typ:
 - tetrahydroprotoberberiny (např. stylopin), protoberberiny (např. berberin).
3. protopinový typ:
 - protopin a allokryptopin.

4. ostatní

- deriváty benzylochinolinu: 3 typy, které jsou zde zastoupeny jen v menším množství : chinolizidin, spartein (v *Chelidonii herba*);
- aporfinový alkaloid magnoflorin (*Chelidonii radix*).³⁷

Výzkum vlašovičnicku většího se v posledních letech poměrně rozšiřuje. Jedním z důvodů je studium antineoplastického účinku alkaloidní látky nazvané **Ukrain**. **Ukrain** obsahuje některé alkaloidy *Chelidonium majus* L. konjugované s kyselinou thiofosforečnou.⁴¹ Jako hlavní složky **Ukrainu** byly identifikovány alkaloidy chelidonin, sanguinarin, chelerythrin, protopin a allokryptopin.⁷⁰ V souvislosti se studiem antineoplastické aktivity je studována také řada ostatních alkaloidů i ohledně odlišných účinků – např. inhibice 5- a 12-lipoxygenasy neredoxním mechanismem, atd..⁷¹

V poslední době je také věnována pozornost vlivu vlašovičnickových alkaloidů na hydrolýzu acetylthiocholinu a AChE (také podobných alkaloidů izolovaných z *Bocconia cordata*, Papaveraceae), a to zejména chelidoninu, sanguinarinu, chelerythrinu a také preparátu **Ukrainu**. Ukázalo se, že benzo[c]fenathridinové alkaloidy (sanguinarin, chelerythrin) mají na hydrolýzu acetylthiocholinu a AChE poměrně velký účinek (IC_{50} = 0,2-0,3 mM). Zajímavý účinek ale vykazuje také chelidonin a **Ukrain** (IC_{50} = 2-2,5 mM).⁷²

Výzkum se zabývá také protopinovými alkaloidy. Zajímavé jsou např. výsledky testu vlivu protopinu a allokryptopinu na aminotransferasy (ALT - alaninaminotranferasa, AST - aspartátaminotranferasa) z krevního séra krys v porovnání se sérovými hodnotami α -fetoproteinu (AFP) a β 2-microglobulinu.⁷³ Za povšimnutí také stojí použití allokryptopinového enantiomeru nimodipinu v tabletové směsi látek na léčbu HIV pozitivních pacientů⁷⁴. Allokryptopin byl také shledán potenciálním účinným anthelmintikem.⁷⁵

V souvislosti se screeningem přírodních látek alkaloidního charakteru z čeledi Papaveraceae a Fumariaceae, který je prováděn na katedře farmaceutické botaniky a ekologie, byl proveden pokus o izolaci alkaloidů s cílem podrobit tyto látky testování vlivu na AChE, později i na prolylendopeptidasu a další enzymové systémy. K této izolaci bylo použito 41,8 kg celé sušené rostliny (nat' a kořeny). Izolační postup byl použit jak je uvedeno v literatuře J. Slavíkem.^{48,51} Jeho pracovní skupina se zabývala alkaloidy z čeledi Papaveraceae od 50.-70.tých let 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 ve slabém roztoku kyseliny sírové a zfiltrován. Prakticky neutrální alkaloidy a neutrální znečištěniny byly odstraněny vytřepáváním tohoto roztoku etherem. Vodná vrstva byla zalkalizována uhličitánem sodným na pH ~ 9-10. Vyloučené

alkaloidy byly vytřepány diethyletherem. Zbylá vodná vrstva byla znovu zalkalizována hydroxidem sodným na pH ~ 12 – 12,5 a silné baze vytřepány opět do etheru. Po okyselení vodného extraktu kyselinou chlorovodíkovou a přidavku jodidu draselného byly vytvořené jodidy kvartérních bazí vytřepány CHCl_3 („jodidy kyselé“) a kyselý vodný roztok byl opět zalkalizován amoniakem a vytřepán CHCl_3 , do něhož přešly „jodidy bazické“. Etherový výtřep (výtřep A), který byl získán alkalizací uhličitanem sodným, obsahoval středně bazické alkaloidy. Poté byl dále separován přípravou pseudokyanidů (sanguinarinové baze vytvářející nerozpustné pseudokyanidy). Zbylý roztok po pseudokyanidech byl zpracován s koncentrovanou kyselinou chlorovodíkovou na chloridy rozpustné ve vodě a chloridy ve vodě nerozpustné. Nakonec byly z těchto frakcí odděleny alkaloidy fenolické od nefenolických. Alkalizací vodné fáze a vytřepáním do chloroformu se nakonec oddělily chloridy nerozpustné v chloroformu. Postup je patrně i historicky osvědčený. Bohužel se však ukázalo, že v našich podmínkách nepřináší vůbec tak snadné výsledky jako je popisuje Slavíkova skupina (jednoduchým vytřepáváním a frakční krystalizací tato skupina rozdělila látky až do čistého stavu). Zjistili jsme, že při použití naší drogy a opakování tohoto pokusu, je výsledek nereálný. Po odstranění málo bazických alkaloidů a ostatních znečištěnin z kyselého roztoku alkaloidů byly připraveny pseudokyanidy (6,01 g). Byly připraveny fenolické alkaloidy (0,35 g), alkaloidy z chloridů nerozpustných ve vodě (45,27 g), alkaloidy z chloridů rozpustných v chloroformu (3,38 g), alkaloidy z chloridů nerozpustných v chloroformu (15,91 g).

Já jsem se dále věnovala dělení alkaloidů, jejichž chloridy jsou nerozpustné v chloroformu. Zjistila jsem, že Slavíkem popisovaný postup nepřinesl tak výborné výsledky.⁵¹ Autor krystalizoval baze různým způsobem z chloroform-methanolu, přičemž získal racemát stylopinu (t. t. = 221-222 °C), dále z nati (-)-stylopin (t. t. = 201-202 °C), chelidonin (t. t. = 135-136 °C) a protopin (t. t. = 203-204 °C). α -allokryptopin získal z vodných filtrátů po srážení amoniakem a vykrytalizování z alkoholu v jehlicích (t. t. = 159-160 °C). Řadu dalších alkaloidů odlišné struktury získal stejným postupem z kořenů. V mém případě byla situace zkomplikována tím, že jsem nepoužila odděleně kořen a nat', ale celou rostlinu, protože nám byla výhodně nabídnuta zahraniční firmou (sběr v Chorvatsku) a ukázalo se, že alkaloidní spektrum je poněkud odlišné než u rostlinného materiálu zpracovávaného J. Slavíkem.

Podářilo se mi podařilo získat jeden alkaloid v čisté formě a to pomocí sloupcové chromatografie za použití A1, eluentu (směs benzín-chloroform), doba toku asi 20 minut. Dále jsem pracovala s frakcemi 38-44. Tyto spojené frakce jsem vykrytalizovala z ethanolu.

Vzniklo 2,18 g velmi jemných bílých prizmatických jehlic. T. t. této látky jsem stanovila na 162-163 °C, směsná t. t. s předpokládaným allokryptopinem byla bez deprese. T. t. oproti Slavíkovi výsledku se výrazně nelišila.⁵¹ Dále jsem provedla chromatografické srovnání se standardem protopinových alkaloidů (Kieselgel F₂₅₄, S1, komora nasycená, Dragendorffovo činidlo) Izolovaná látka odpovídala standardu allokryptopinu. Hodnota R_f byly totožné - R_f 0,38. Sumární vzorec izolované látky byl určen jako C₂₁H₂₃NO₅; molekulová hmotnost = 369,416. Zjistila jsem tedy, že izolovanou lákou je allokryptopin.

Dále pak jsem provedla test vlivu alokryptopinu na biologickou aktivitu AChE - jako zdroj acetylcholinesterázy sloužil hemolyzát lidských erytrocytů. Hemolyzát byl získán standardním, níže popsaným, postupem:

- 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.⁶³

Je známo, že cholinesterasy jsou kompetitivně inhibovány kvartérními látkami. Pokles aktivity je úměrný použité koncentraci inhibitoru. Stanovení aktivity enzymu je založeno na jeho reakci s nativním substrátem, kdy je tento štěpen na alkohol cholin a kyselinu octovou. Ukazuje se však, že tyto enzymy jsou inhibovatelné i nekvartérními látkami.

Experimenty byly prováděny za těchto podmínek: teplota 25°C, prostředí PB, pH 7,4, vlnová délka spektrofotometru 436 nm, jednorázové plastové kyvety o tloušťce 1 cm.

Do kyvety byly přidány 0,4 ml roztoku DTNB (5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoové kyseliny)) 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 délka absorbance, která je úměrná aktivitě erytrocytární acetylcholinesterasy.⁶⁷

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.

Díky známé struktuře látky a tedy i její molekulové hmotnosti bylo možno stanovit biologickou aktivitu: IC₅₀ = 0.00147 M; 95% konfidenční interval = 0.00133-0.00162 M. Z výsledku testu vyplývá, že izolovaný alkaloid je relativně málo aktivní (i v porovnání s hodnotou IC₅₀ fysostigminu (0.251 μ M)⁶⁹) a není prozatím předpoklad, že by se jeho

struktura mohla stát základem pro další studium, pokud se v následujících biologických studiích neprokáží jiné, z hlediska ovlivnění AD velmi příznivé účinky.

6 SOUHRN

Spolu s ostatními doktorandkami (Dagmar Kubincovou, Janou Nagyovou a Šárkou Bryndovou) jsme provedly extrakci 41,8 kg suché nati s kořeny z *Chelidonium majus* L.. Poté jsme tento získaný primární extrakt vyčistily a to filtrací a následným oddestilováním rozpouštědla. Z výtřepku A jsme pak postupně oddělily pseudokyanidy benzofenantridinových bazí, éterovou fázi s fenolovými alkaloidy a vodnou fázi. Z poslední, tedy vodné fáze, jsme postupně získaly chloridy nerozpustné ve vodě a chloridy rozpustné v chloroformu. Nakonec jsme připravily z vodné fáze výtřepku A vytřepáním do chloroformu chloridy nerozpustné v chloroformu.

Já jsem dále zpracovávala chloridy nerozpustné v chloroformu. Neutralizací této frakce 25% amoniakem na pH ~ 9, vytřepáním do 5x 300 ml diethyletheru a následným odpařením organické vrstvy vznikl bílý práškovitý odparek (15,91 g). Poté jsem nejdříve provedla kontrolní TLC bazí alkaloidů z chloridů nerozpustných v chloroformu za použití standardů protopinu a allokryptopinu. Zkoušená fáze obsahovala oba protopinové alkaloidy. Dělení těchto dvou protopinových alkaloidů jsem provedla pomocí sloupcové chromatografie standardním způsobem. Dále jsem pracovala pouze s frakcemi 38-44. Tyto spojené frakce ze sloupcové chromatografie jsem vykrytalizovala z ethanolu za vzniku velmi jemných bílých prizmatických jehlic.

Získala jsem tedy 2,18 g čisté látky. Jde, jak bylo zmíněno už výše, o látku krystalickou. T. t. jsem stanovila na 162-163 °C a směsná t. t. byla bez deprese. Podle t. t. a chromatografického srovnání látky se standardem allokryptopinu (Kieselgel F₂₅₄, S1, komora nasycená, Dragendorffovo činidlo, R_f 0,38), které bylo bez rozdílu R_f, jsem určila, že jde o protopinový alkaloid allokryptopin o m.h. 369,416 a o sumárním vzorci C₂₁H₂₃NO₅.

V závěru práce byl proveden test vlivu allokryptopinu na aktivitu erytrocytární AChE. Z naměřené hodnoty IC₅₀ (= 0.00147 M) vyplývá, že izolovaný alkaloid je relativně málo aktivní (i v porovnání s hodnotou IC₅₀ fysostigminu (0.251 μM)) a není prozatím předpoklad, že by se jeho struktura mohla stát základem pro další studium, pokud se v následujících biologických studiích neprokáží jiné, z hlediska ovlivnění AD velmi příznivé účinky.

7 LITERATURA

-
- ¹ Opletalová, V., Opletal, L., Kuča, K., Jun, D.: Pokroky ve vývoji cholinergik pro léčbu Alzheimerovy choroby. Sborník abstraktů z 34. konference: Syntéza a analýza léčiv; 27, Brno 12. – 14.9.2005.
- ² Jiráček, R.: Současné trendy v biologické terapii Alzheimerovy choroby. *Psychiatrie pro praxi*, **1**, 8-11, 2006.
- ³ Silbernagl, S., Lang, F.: Atlas patofyziologie člověka; Grada Publishing, spol. s.r.o., 348-349, Praha 2001.
- ⁴ Cheng, Y., Song, Y.-H., Fu, D.-X.: Drug therapy of Alzheimer's disease; *Zhongguo Linchuang Yaolixue Zazhi*, **15**(4), 295-298, 1999.
- ⁵ Zatta, P., Suwalsky, M.: Aluminum, membranes and Alzheimer's disease: Aluminium and Alzheimer's Disease, 279-291, 2001.
- ⁶ Povýšil, C., Šteiner, I., Dušek, J. a kol.: Speciální patologie III. díl – Patologie nervového a pohybového ústrojí, endokrinního systému, kůže, smyslů a novorozence; Nakladatelství Karolinum, **24**, Praha 1999.
- ⁷ Chen, M., Fernandez, H., L.: Revisiting Alzheimer's disease from a new perspective: can "risk factors" play a key role?: *Journal of Alzheimer's Disease*, **2**(2), 97-108, 2000.
- ⁸ Holmerová, I., Janečková, H., Vaňková, H., Veleta, P.: Nefarmakologické přístupy v terapii Alzheimerovy demence a praktické aspekty péče o postižené. *Psychiatrie pro praxi*, **4**, 180, 2005.
- ⁹ 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.
- ¹⁰ Giacobini, E.: Cholinesterases: new roles in brain function and in Alzheimer's disease.: *Neurochem Res*. **28**(3-4), 515-22, 2003.
- ¹¹ Greig, 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.
- ¹² Ibach, B., Haen, E.: Acetylcholinesterase inhibition in Alzheimer's Disease. *Curr Pharm Des*. **10**(3), 231-51, 2004.
- ¹³ Gauthier, S., Emíre, M., Farlow, M. R., Bullock, R., Grossberg, G. T., Potkin, S. G.: Strategies for continued successful treatment of Alzheimer's disease: switching cholinesterase inhibitors. *Curr Med Res Opin*. **19**(8), 707-14, 2003.

-
- ¹⁴ 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.
- ¹⁵ Liu, Y.: Botanical drug for treatment and prevention of Alzheimer's disease. U.S. US 6486169 B1, 7 pp., 2002.
- ¹⁶ Opletal, L., Opletalová, V.; Současné uplatnění některých přírodních látek v terapii demencí Alzheimerova typu; Sborník abstraktů z 34. konference: Syntéza a analýza léčiv; Brno 12. – 14.9.2005, 26, 2005.
- ¹⁷ Kalauni, S., K.; Choudhary, M., I.; Khalid, A.; Manandhar, M., D.; Shaheen, F.; Atta-ur-Rahman; Gewali, M., B.: New cholinesterase inhibiting steroidal alkaloids from the leaves of *Sarcococca coriacea* of Nepalese origin. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, **50**(11), 1423-1426, 2002.
- ¹⁸ Chung, Y.-K., Heo, H.-J., Kim, E.-K., Kim, H.-K., Huh, T.-L., Lim, Y., Kim, S.-K., Shin, D.-H.: Inhibitory effect of ursolic acid purified from *Origanum majorana* L. on the acetylcholinesterase. *Molecules and Cells*, **11**(2), 137-143, 2001.
- ¹⁹ Otaguro, K., Shiomi, K., Yamaguchi, Y., Arai, N., Sunazuka, T., Masuma, R., Iwai, Y., Omura, S.: Arisugacins C and D, novel acetylcholinesterase inhibitors and their related novel metabolites produced by *Penicillium* sp. FO-4259-11. *J. Antibiot.*, **53**(1), 50-57, 2000.
- ²⁰ Atta-ur-Rahman, Fatima, N., Akhtar, F., Choudhary, M., I., Khalid, A.: New Norditerpenoid Alkaloids from *Aconitum falconeri*. *J. Nat. Prod.*, **63**(10), 1393-1395, 2000.
- ²¹ Kim, S., R., Hwang, S, Y., Jang, Y., P., Park, M., J., Markelonis, G., J., Oh, T., H., Kim, Y., C.: Protopine from *Corydalis ternata* has anticholinesterase and anti-amnesic activities. *Planta Med.*, **65**(3), 218-221, 1999.
- ²² Shaw, P.-Ch., Ho, M. T.-W., Fung, K.-P., Wan, D., Chi-ch.: Use of tanshinone derivatives as cholinesterase inhibitors in treating related diseases. U.S. Pat. Appl. Publ. US 2004191334 A1, 2004.
- ²³ Mills, C., Clary, B.,J., Gilmer, J.,F., Walsh, J.,J.: Inhibition of acetylcholinesterase by Tea Tree oil. *J Pharm Pharmacol.* **56**(3), 375-9, 2004.
- ²⁴ Zaheer-Ul-Haq, Z. U., Wellenzohn, B., Riedl, K. R., Rode, B. M.: Molecular docking studies of natural cholinesterase-inhibiting steroidal alkaloids from *Sarcococca saligna*. *J Med Chem.* No 6, **46**(23), 5087-90, 2003.
- ²⁵ Orhan, I., Terzioglu, S., Sener, B.: Alpha-onocerin: an acetylcholinesterase inhibitor from *Lycopodium clavatum*. *Planta Med.* **69**(3), 265-7, 2003.

-
- ²⁶ Ahmad, V., U., Hussain, J., Hussain, H., Farooq, U., Akber, E., Nawaz, S., A., Choudhary, M., I.: Two ceramides from *Tanacetum artemisioides*. *Zeitschrift fuer Naturforschung, B: Chemical Sciences*, **59**(3), 329-333, 2004.
- ²⁷ Bruehlmann, C., Marston, A., Hostettmann, K., Carrupt, P.-A., Testa, B.: Screening of non-alkaloidal natural compounds as acetylcholinesterase inhibitors. *Chemistry & Biodiversity*, **1**(6), 819-829, 2004.
- ²⁸ 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 Learn Mem.* **80**(2), 113-22, 2003.
- ²⁹ Piotrovsky, V., Van Peer, A., Van Osselaer, N., Armstrong, M., Aerssens, J.: Galantamine population pharmacokinetics in patients with Alzheimer's disease: modeling and simulations. *J Clin Pharmacol.* **43**(5), 514-23, 2003.
- ³⁰ 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.
- ³¹ 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 Behav.* **75**(3), 675-86, 2003.
- ³² Savelev, S., U., Okello, E., J., Perry, E., K.: Butyryl- and acetyl-cholinesterase inhibitory activities in essential oils of *Salvia* species and their constituents. *Phytotherapy Research*, **18**(4), 315-324, 2004.
- ³³ 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.
- ³⁴ Cordato, D. J., Mater, L. E., Herkes, G. K.: Stereochemistry in clinical medicine: a neurological perspective. *J Clin Neurosci* **10**(6), 649-54, 2003.
- ³⁵ Ulrichová, J., Walterová, D., Preininger, V., Šimánek, D.: Inhibition of Butyrylcholinesterase Activity by Some Isoquinoline Alkaloids. *Planta Med.* **48**, 174 – 177, 1983.
- ³⁶ Salles T., M., T. Vanderlan V., M., F., van de Meent, M., Rhee, I., K., Verpoorte, R.: Screening of plants with anticholinesterase activity for treatment of Alzheimer disease. *Quimica Nova*, **26**(3), 301-304, 2003.
- ³⁷ Blaschek, W., Ebel, S., Hackenthal, E., Holtzgrave, 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.

³⁸ <http://www.faf.cuni.cz/daidalea/PlantSpecies.asp?id=10172>

³⁹ <http://encyklopedie.seznam.cz/heslo/441934-chelidonium-majus>

⁴⁰ Hejný, S., Slavík, B.: Květena České republiky 1, 2.vydání, Academica, 493, Praha 1997.

⁴¹ 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.

⁴² Bruneton, J.: Pharmacognosy, phytochemistry, medicinal plants; Intercept limited, 744, Andover, England UK, 1995.

⁴³ Tomko, J. a kolektiv: Farmakognózia, učebnica pre farmaceutickej fakulty; Vydavateľstvo Osveta, 2. opravené vydanie, 344, Martin 1999.

⁴⁴ Then, M., Szentmihályi, K., Sarkózi, A., Illes, V., Forgács, E.; Effect of sample handling on alkaloid and mineral content of aqueous extracts of greater celandine (*Chelidonium majus* L.). J. Chromatogr., A 889(1+2), 69-74; 2000.

⁴⁵ Kuczynski, J., Golkiewicz, W., Jusiak, L.: Method of isolating quaternary and tertiary alkaloid bases from plant extracts. Pol. PL 170461 B1, 3 pp., 1996.

⁴⁶ Kadan, G., Gozler, T., Shamma, M.; (-)-Turkiyenine, a new alkaloid from *Chelidonium majus*. J. Nat. Prod., **53**(2), 531-2, 1990.

⁴⁷ Slavík, J., Slavíková, L.: Alkaloidy rostlin makovitých (*Papaveraceae*) II.. Dělení chelerythrinu a sanguinarinu a nález dvou nových alkaloidů ve vlaštovičniku (*Chelidonium majus* L.): Chem. listy **48**, 1382 – 1386, 1954.

⁴⁸ Slavík, J., Slavíková, L.: Minor alkaloids from *Chelidonium majus* L.: Collection Czechoslov. Chem. Commun. **42**, 2686 – 2693, 1977.

⁴⁹ Rompala, A., Matysik, G., Jusiak, L.: Method for isolating quaternary base alkaloids from plants extracts. Pol. PL 185396 B1, 3 pp, 2003.

⁵⁰ Shafiee, A., Jafarabadi, A. H.: Corydine and norcorydine from the roots of *Chelidonium majus*. Planta Med. **64**(5), 489, 1998.

-
- ⁵¹ Slavík, J.: Alkaloidy rostlin makovitých (*Papaveraceae*) V. Isolace stylopinu z vlaštovičnicku (*Chelidonium majus* L.): Chem. listy **48**, 1557 - 1559, 1954.
- ⁵² 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.
- ⁵³ Slavík, J.: Alkaloidy rostlin makovitých (*Papaveraceae*) I.; Látky z vlaštovičnicku (*Chelidonium majus* L.). Českosl. Farm. **1**, 15 - 17, 1954.
- ⁵⁴ Sarkozi, A., Then, M., Szentmihályi, K.: Mineral element content of greater celandine (*Chelidonium majus* L.). Acta Alimentaria **34**(2), 113-120, 2005.
- ⁵⁵ Szentmihályi, 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.
- ⁵⁶ Buzyk, G. N., Lovkova, M., Ya., Sokolova, S. M., Tyutekin, Yu. 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), 690-693, 2001.
- ⁵⁷ Zhang, Y., Zhao, D., Bai, C., Chen, W.: Force spectroscopy between acetylcholinesterase molecule and its natural substrate to study the effects of inhibitors and reactivators on enzyme activity. Life Sci., **65**(21), PL253-PL260, 1999.
- ⁵⁸ Zhang, Y., Bai, C., Wang, C., Zhao, D., Su, M., Lin, Z., Tian, F.: Intermolecular forces between acetylcholine and acetylcholinesterases studied with atomic force microscopy. Sci. China, Ser. B: Chem., **42**(5), 449-457, 1999.
- ⁵⁹ Marston, A., Kissling, J., Hostettmann, K.: A rapid TLC bioautographic method for the detection of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors in plants. Phytochemical Analysis, **13**(1), 51-54, 2002.
- ⁶⁰ Opletal, L., ústní sdělení.
- ⁶¹ Demarque, D., Jouanny, J., Poitevin, B., Saint-Jean, Y.: Farmakologie a materia medica homeopatica; Boiron-CEDH, 116-117, 2. české vydání, Praha, 2002.
- ⁶² Jang, Seon, II; Kim, Byung Hee; Lee, Woo-Yiel; An, Sang Jin; Choi, Han Gil; Jeon, Byung Hun; Chung, Hun-Taeg; Rho, Jung-Rae; Kim, Young-Jun; Chai, Kyu-Yun; Stylopine from *Chelidonium majus* inhibits LPS-induced inflammatory mediators in RAW 264.7 cells. Archives of Pharmacal Research **27**(9), 923-929, 2004.

-
- ⁶³ Bajgar J.: Stanovení aktivity cholinesteráz v lidské krvi – možná modifikace pro polní použití. Vojenské zdravotnické listy **XLI** (2), 78-80, 1972.
- ⁶³ Stahl, E.: Thin-layer Chromatography, A Laboratory Handbook; Springer – Verlag Berlin, Heidelberg, New York, 873, 1969.
- ⁶⁵ Slavík, J., Slavíková, L.: Alkaloide der Mohngewäse (*Papaveraceae*) XVII. Über neue Alkaloide aus *Sanguinaria canadensis* L.. Coll. Commun. **25**, 1667-1675, 1960.
- ⁶⁶ Český lékopis 2005 Doplněk 2006, elektronická verze, Grada Publ. A. s., Praha 2006.
- ⁶⁷ 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.
- ⁶⁸ Bores, G. M., Kosley, R. W., Jr.; Galanthamine derivatives for treatment of Alzheimer's disease. Drugs Fut. **21** (6), 621-635, 1996.
- ⁶⁹ Tang, X.C., He, X.C., Bai, D.L.: Huperzine A: a novel acetylcholinesterase inhibitor. Drugs of the Future **24**(6), 647-663, 1999.
- ⁷⁰ Habermehl, D., Kammerer, B., Handrick, R., Eldh, T., Gruber, Ch., Cordes, N., Daniel, P., T., Plasswilm, L., Bamberg, M., Belka, C., Jendrossek, V.: Proapoptotic activity of Ukrain is based on Chelidonium majus L. alkaloids and mediated via a mitochondrial death pathway. BMC Cancer, No 6, 2006.
- ⁷¹ Vavrecková, 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.
- ⁷² Kuznetsova, L. P., Nikol'skaya, E. B., Solichina, E. E., Fadeeva, 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.
- ⁷³ Shafiee, A.: Alkaloids of Papaveraceae (XIX) [1]. Alkaloids of Glaucium paucilobum population [of] Golestan forest. Iran. Journal of Sciences, **10**(4), 229-232, 1999.
- ⁷⁴ Jelen, B.: Therapeutic composition for the treatment of HIV-1 and HIV-2. 6 pp., U.S. Pat. Appl. Publ. USXXCO US 2003203045 A1 20031030, 2003.
- ⁷⁵ Satou, T., Akao, N., Matsuhashi, R., Koike, K., Fujita, K., Nikaido, T.: Inhibitory effect of isoquinoline alkaloids on movement of second-stage larvae of *Toxocara canis*. Biol. Pharm. Bull. **25**(12), 1651-1654, 2002.