

UNIVERZITA KARLOVA  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ  
KATEDRA FARMAKOGNOZIE A FARMACEUTICKÉ BOTANIKY



## DIPLOMOVÁ PRÁCA

**Alkaloidy *Papaver rhoeas* L. (Papaveraceae) a ich biologická aktivita vzťahujúca sa na Alzheimerovu chorobu IV.**

**ESZTER GERGELY**

**Vedúci diplomovej práce: doc. PharmDr. Jakub Chlebek, PhD.**

**Konzultant: RNDr. Jaroslav Jenčo, Ph.D.**

**Vedúci oddelenia: Prof. Ing. Lucie Cahlíková, Ph.D.**

**HRADEC KRÁLOVÉ, 2022**

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



## DIPLOMA THESIS

**Alkaloids of *Papaver rhoeas* L. (Papaveraceae) and their biological activity related to Alzheimer's disease IV.**

**ESZTER GERGELY**

**Supervisor: doc. PharmDr. Jakub Chlebek, PhD.**

**Consultant: RNDr. Jaroslav Jenčo, Ph.D.**

**Head of department: Prof. Ing. Lucie Cahlíková, Ph.D.**

**HRADEC KRÁLOVÉ, 2022**

## Pod'akovanie

Moje pod'akovanie patrí predovšetkým vedúcemu školiteľovi práce, doc. PharmDr. Jakubovi Chlebkovi, Ph.D. za jeho ochotu, školenie, čas, a trpezlivosť, ktorú mi venoval. Ďalej by som chcela pod'akovať konzultantovi RNDr. Jaroslavovi Jenčovi, Ph.D. tiež za jeho čas a energiu, ktorú do nás vložil, a za vykonanie meraní hmotnostných spektier, doc. PharmDr. Jiřímu Kunešovi za zmeranie a interpretáciu NMR spektier, PharmDr. Daniele Hulcovej, Ph.D. za zmeranie anticholinesterázovej aktivity, RNDr. Radimovi Havelkovi, Ph.D. za stanovenie cytotoxicity, celej Katedre farmakognozie a farmaceutickej botaniky za príjemné pracovné prostredie a spolužiačke, zároveň kolegyni Aničke Bučkovej za priateľskú a zábavnú spoluprácu.

Vďaka patrí aj finančnej podpore SVV UK 260 548 a Progres/UK Q42, bez ktorej by táto práca nemohla vzniknúť.

Prehlasujem, že táto práca je mojím pôvodným autorským dielom. Všetka literatúra a ďalšie zdroje, z ktorých som pri spracovaní čerpala, sú uvedené v zozname použitej literatúry a v práci sú riadne citované. Práca nebola použitá k získaniu iného alebo rovnakého titulu.

V Hradci Králové, 2022

.....

PODPIS

# OBSAH

1. Skratky .....	9
2. Úvod .....	11
3. Cieľ práce.....	13
4. Teoretická časť .....	14
4.1. Alzheimerova choroba .....	14
4.1.1. Patogenéza.....	14
4.1.1.1. $\beta$ -Amyloidné plaky.....	14
4.1.1.2. $\tau$ -Proteíny.....	15
4.1.1.3. Zápal.....	15
4.1.1.4. Pôsobenie na NMDA receptory .....	16
4.1.1.5. Pôsobenie na cholínernú transmisiu.....	16
4.1.1.6. BACE1.....	16
4.1.1.7. RAGE .....	17
4.1.1.8. Kinázy .....	17
4.1.1.9. Prolyloligopeptidáza .....	17
4.1.1.10. Genetika.....	18
4.1.2. Liečivá .....	18
4.1.2.1. Prechod látok do mozgu cez HEB a logBB.....	19
4.1.2.2. Zamerane na prínosy inhibície BuChE.....	19
4.2. Neuroprotektívne alkaloidy z čeľade Papaveraceae .....	20
4.2.1. Výskum metabolitov <i>P. rhoeas</i> na aktivitu vzťahujúcu sa na AD.....	21
4.3. <i>Papaver rhoeas</i> .....	22
4.3.1. Popis .....	22
4.3.2. Obsahové látky.....	23
4.3.2.1. Alkaloidy.....	24
4.3.2.2. Fenolové zlúčeniny.....	29
4.3.3. Použitie v terapii, využitie.....	31

4.3.4. Biologický účinok obsahových látok .....	31
4.3.5. Toxicita obsahových látok .....	33
5. Experimentálna časť.....	34
5.1. Materiál a vybavenie .....	34
5.1.1. Rozpúšťadlá a chemikálie .....	34
5.1.2. Pomocné materiály.....	35
5.1.3. Chromatografické adsorbenty .....	35
5.1.4. Vyvíjacie sústavy na TLC vizualizácie.....	35
5.1.5. Prístroje, softvéry .....	35
5.1.6. Kolóny a kartridže pre Flash chromatografiu .....	36
5.1.7. Rastlinný materiál.....	37
5.2. Obecné postupy .....	37
5.2.1. Príprava a skladovanie rozpúšťadiel .....	37
5.2.2. Odparovanie rozpúšťadiel a sušenie jednotlivých frakcií .....	37
5.2.3. Skladovanie extraktov .....	37
5.2.4. Príprava liatych vrstiev pre preparatívnu TLC .....	38
5.2.5. TLC detekcia .....	38
5.3. Stĺpcová flash chromatografia .....	39
5.3.1. Deaktivácia adsorbentov .....	39
5.3.2. Príprava predkolóny .....	39
5.3.3. Plnenie a kondicionovanie kolóny/HP kartridže pre flash HPLC.....	39
5.4. Štruktúrna analýza.....	40
5.4.1. GC-MS analýza .....	40
5.4.2. LC-MS analýza .....	40
5.4.3. NMR analýza .....	41
5.4.4. Meranie optickej otáčavosti .....	41
5.5. Izolácia alkaloidov.....	41
5.5.1. Príprava spojeného chloroformového výtrepku .....	41
5.5.2. Flash chromatografia na Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> .....	42
5.5.3. Flash chromatografia na SiO <sub>2</sub> .....	43

5.5.4. Izolácia alkaloidov zo spojenej frakcie 5, 6 a 7 .....	46
5.6. Stanovenie biologickej aktivity alkaloidov .....	47
5.6.1. Meranie inhibície cholínesteráz.....	47
5.6.2. Meranie inhibície prolyloligopeptidázy .....	47
5.6.3 Stanovenie cytotoxicity izolovaných látok .....	47
6. Výsledky .....	48
6.1. Štruktúrna analýza.....	48
6.1.1. (+)-Kaverín (EG-1).....	48
6.1.2. Protopín (EG-2).....	49
6.2. Biologická aktivita izolovaných alkaloidov .....	50
7. Diskusia .....	51
8. Záver .....	53
9. Abstrakt .....	54
10. Abstract .....	55
11. Zdroje.....	56

## Zoznam obrázkov

Obrázok 1: Kvet, plod a celá rastlina <i>Papaver rhoeas</i> .....	23
Obrázok 2: Alkaloidy rôznych štruktúrnych typov obsiahnuté v <i>Papaver rhoeas</i> .....	25
Obrázok 3: Chromatogram priebehu flash separácie na SiO <sub>2</sub> 60 15 µm.....	45
Obrázok 4: 10 spojených frakcií získaných z delenia na SF SiO <sub>2</sub> 60 15 µm.....	45
Obrázok 5: Štruktúra (+)-kaverínu.....	48
Obrázok 6: Štruktúra protopínu .....	49

## Zoznam tabuliek

Tabuľka 1: Prehľad alkaloidov identifikovaných v <i>P. rhoeas</i> .....	27
Tabuľka 2: Fenolové zlúčeniny v <i>P. rhoeas</i> .....	29
Tabuľka 3: Percentuálna BuChE inhibičná aktivita extraktov.....	41
Tabuľka 4: Elučný gradient MF I, SF Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> .....	42
Tabuľka 5: Elučný gradient MF II, SF Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> .....	43
Tabuľka 6: Inhibičné aktivity spojených frakcií flash HPLC delenia na Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> .....	43
Tabuľka 7: Elučný gradient, SF SiO <sub>2</sub> .....	44
Tabuľka 8: Hmotnosti 10 spojených frakcií z flash chromatografie (SiO <sub>2</sub> 60 15 µm) .....	46
Tabuľka 9: Inhibícia cholinesteráz a prolyloligopeptidázy, logBB .....	50
Tabuľka 10: Screening cytotoxicity (+)-kaverínu .....	50



## 1. SKRATKY

A $\beta$	$\beta$ -amyloid
AD	Alzheimer's disease (Alzheimerova choroba)
ACh	acetylcholín
AChE	acetylcholinesteráza
AMK	aminokyselina
ApoE	apolipoproteín E
APP	amyloidový prekursorový proteín
BACE1	$\beta$ -site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1 ( $\beta$ -sekretáza 1)
BuChE	butyrylcholinesteráza
C	koruna (označenie v kvetnom vzorci)
ČL	Český lékopis
DM	diabetes mellitus
DOX	doxorubicín
DPPH	1,1-difenyl-2-pikrylhydrazyl
DMSO	dimetylsulfoxid
EMA	European Medicines Agency
ERK	extracellular signal-regulated kinase (extracelulárnym signálom regulovaná kináza)
FDA	Food and Drug Administration
FRET assay	Fluorescence Resonance Energy Transfer assay
GC-MS	gas chromatography-mass spectrometry
GSK-3	glycogen synthase kinase-3 (glykogén-syntáza kináza 3)
<i>h</i> AChE	human acetylcholinesterase (ľudská acetylcholinesteráza)
HEB	hematoencefalická bariéra
kol.	kolektív
lat.	latinsky
logBB	pomer logaritmickej koncentrácie látky v mozgu a v plazme
LD <sub>50</sub>	koncentrácia, ktorá usmrcuje 50 % organizmov experimentu
MAPK	mitogen-activated protein kinase (mitogénom aktivovaná proteínkináza)

MEK	mitogen-activated protein kinase kinase (kináza mitogénom aktivovanej proteínkinázy)
MIC	minimálna inhibičná koncentrácia
MMM	mozgomiešny mok
NMDA	<i>N</i> -metyl-D-aspartát
POP	prolyl oligopeptidáza
p-tau	fosforylovaná forma $\tau$ proteínu
RAGE	receptor for advanced glycation end products (receptor pre konečné produkty pokročilej glykácie)
R <sub>f</sub>	retenčný faktor
ROS	reactive oxygen species (reaktívne zlúčeniny kyslíka)

## 2. ÚVOD

Rastliny sú významným priamym zdrojom liečivých látok. Navyše poskytli inšpiráciu pre mnohé zo základných, tzv. „lead“ štruktúr, ktoré pomocou rôznych chemických obmien vytvorili dôležité skupiny polosyntetických či syntetických bioaktívnych molekúl. Preto nevyhnutnou súčasťou uplatnenia rastlín vo farmácii je samotná izolácia čistých látok.

Alkaloidy, molekuly patriace najmä medzi sekundárne metabolity rastlinnej ríše, sú významnou skupinou látok, medzi ktorými nájdeme molekuly s rôznymi účinkami na ľudský organizmus. Ich výskyt prevažuje u vyšších rastlín, a v rámci nich sa nachádzajú častejšie u dvojkľúčolistových. Ukladajú sa hlavne v pletivách s rýchlym rastom, pošvách cievnych zväzkov a v mliečniciach [1]. Skúmaná rastlina, mak vlčí, spadá do kategórie týchto rastlín. Tradične sa v ľudovom liečiteľstve používali jeho korunné lístky (*Papaveris rhoeados flos*) najmä pri nespavosti, či k utlmeniu kašľa. Medzi obsahové látky vlčieho maku patria v prvom rade izochinolínové alkaloidy, flavonoidy a fenolové látky [2].

Prebiehajúci výskum na Katedre farmakognózie a farmaceutickej botaniky Farmaceutickej fakulty v Hradci Králové intenzívne skúma rastlinné metabolity z hľadiska účinnosti na rôzne terapeutické ciele týkajúce sa Alzheimerovej choroby (AD). Ide o závažné civilizačné ochorenie, ktorého incidencia so starnúcou populáciou stúpa, a predstavuje veľkú záťaž nielen pre samotného pacienta, ale aj pre rodinných príslušníkov a blízkych. V súčasnosti existuje len symptomatická liečba AD (inhibítory cholínesteráz a antagonista NMDA receptoru, memantín). Výskum katedry sa preto snaží zamerať aj na ďalšie terapeutické ciele súvisiace s patogenézou AD, ktoré patria medzi novšie prístupy v snahe o ovplyvnenie patogenézy AD. Táto práca sa zameriava na inhibíciu butyrylcholínesterázy (BuChE), ktorá podľa viacerých vedeckých publikácií hrá rolu v rozličných procesoch odohrávajúcich sa pri progresii choroby [3–5]. Ukazuje sa tiež, že existuje spojitosť medzi diabetom II. typu a aktivitou BuChE a samotným súbežným výskytom DM II. typu a AD [6].

U nejednej molekuly rastlinného pôvodu bola preukázaná aktivita na enzýmy týkajúce sa AD. Medzi zástupcov patria napr. *Narcissus pseudonarcissus*, *Galanthus woronowii*, či *Physostigma venenosum* [1]. *Papaver rhoeas* doposiaľ z hľadiska aktivity voči týmto

enzýmom nie je prebádaný (až na práce [7,8]) i keď už u niektorých druhov z čeľade Papaveraceae bolo pár vysoko aktívnych molekúl týkajúcich sa AD nájdených.

Náplňou tejto práce je izolácia alkaloidov z maku vlčieho (*Papaver rhoeas*), nadväzujúc na predošlé diplomové práce, v ktorých sa zistila významná selektívna inhibičná aktivita sumárneho extraktu voči butyrylcholinesteráze ( $IC_{50} = 3,94 \pm 0,35 \mu\text{g/ml}$ ) [7,8]. Vypracovaný postup izolácie využíva rôzne chromatografické metódy, čo sú postupy delenia látok založené na princípe ich rozličnej polarity.

### 3. CIEĽ PRÁCE

Hlavnými cieľmi sú:

1. Vypracovanie rešerše na zadanú tému.
2. Izolácia aspoň jedného čistého alkaloidu z chloroformového výtrepku *P. rhoeas* pomocou bežných chromatografických metód.
3. Podieľať sa na určení štruktúry izolovaných alkaloidov (MS, NMR, optická otáčavosť).
4. Podieľať sa na určení biologickej aktivity izolovaných látok (inhibícia BuChE, výpočet logBB).
5. Spísanie diplomovej práce.

## 4. TEORETICKÁ ČASŤ

### 4.1. Alzheimerova choroba (AD)

AD patrí medzi najskľučujúcejšie ochorenia spoločnosti 21. storočia. Ide o neurodegeneratívnu chorobu, postihujúcu ľudí najmä v seniorskom veku. Nad 85 rokov postihuje až tretinu seniorov [9]. Patrí aktuálne medzi najnákladnejšie ochorenia vo svete a predpokladá sa, že k roku 2050 sa počet pacientov s AD približne strojnásobí [10]. Medzi priority medicínskych vied patrí vynájdenie intervencie, ktorá by dokázala toto ochorenie celkom vyliečiť, keďže v súčasnosti dostupné terapeutické postupy sú zatiaľ schopné progresiu AD iba spomaliť.

#### 4.1.1. Patogenéza

Neurodegeneratívne zmeny na úrovni mozgu začínajú v ranom štádiu v blízkosti hipokampu, ktoré sa prejavujú výpadkami pamäte. Neskôr degenerácia progreduje aj do spánkového laloka a dochádza k problémom so správnym vyjadrovaním sa, či porozumením slovám. V ďalšom, tzv. miernom štádiu je postihnutý aj temenný lalok. Pacientova orientácia sa zhoršuje, zabúda ako sa jednotlivé predmety používajú, má problémy s rečou a ťažko zlučuje vnemy z okolia s vlastnými reakciami. V pokročilom štádiu pacient stráca logické myslenie, zažitú normu chovania, je agresívny alebo apatický a môže byť nebezpečný pre svoje okolie. Choroba je rozšírená aj do čelového laloka a v konečnej fáze postihuje všetky neuróny mozgovej hemisféry okrem tých, ktoré sa týkajú motorickej činnosti a zraku. V závere sú postihnuté takmer všetky časti mozgu a pacient je pripútaný k lôžku a je skoro bez reakcií [11]. Na bunkovej úrovni môžeme sledovať nižšie popísané javy.

##### 4.1.1.1. $\beta$ -Amyloidné plaky

Z transmembránového amyloidového prekursorového proteínu (APP) vznikajú štiepením  $\alpha$ -,  $\beta$ -, a  $\gamma$ -sekretázami kratšie proteíny, ktoré sa po štiepení uvoľňujú do extracelulárneho priestoru [12,13]. Tieto produkty sa nazývajú  $\beta$ -amyloidy ( $A\beta$ ) a podľa typu

proteáz majú rôzny počet aminokyselín. Pri AD je pomer týchto vzniknutých, rôzne dlhých proteínov zmenený. V extracelulárnom priestore sa tvorí viac  $A\beta_{1-42}$ , pričom množstvo  $A\beta_{1-40}$  ostáva nezmenené [14]. Formy  $A\beta_{1-40}$  a  $A\beta_{1-42}$  (vzniknuté  $\beta$ -, a  $\gamma$ -sekretázami) a  $A\beta$  obsahujúce špecifické poradie AMK disponujú vyššou schopnosťou agregácie a nie sú solubilné ako iné formy [15]. Agregujú, a hromadia sa medzi neurónmi v extracelulárnom priestore, čím vznikajú toxické, tzv. senilné plaky. Keďže nie sú solubilné a hromadia sa pri mieste vzniku, množstvo produktov štiepenia APP je v mozgomiešnom moku (MMM) nižšie ako u zdravých ľudí. Pomer  $A\beta_{1-42}$  a  $A\beta_{1-40}$  v MMM slúži ako jeden z parametrov laboratórnej diagnostiky AD. Nezhluknutý  $A\beta_{1-42}$  je v MMM oproti normálu znížený, no  $A\beta_{1-40}$  je nezmenený [13,14]. Benígne, difúzne  $A\beta$  plaky patria medzi bežné nálezy aj u starších ľudí bez demencie, ktoré sa u nich (zatiaľ?) nijako neprejavujú [3].

#### 4.1.1.2. $\tau$ -Proteíny

Agregáty  $A\beta$  vyvolávajú oxidatívny stres [16], a pôsobia na fosforylujúce enzýmy – proteínkinázy [17]. Dochádza k narušeniu rovnováhy fosforylácie a defosforylácie tau-proteínov mikrotubulí, ktoré upevňujú cytoskelet. Dochádza k hyperfosforylácii týchto proteínov, ktoré sa stávajú nefunkčnými. Tieto hyperfosforylované proteíny tvoria párovité heliakálne útvary, ktoré nie sú štiepatel'né žiadnym z enzýmov a preto sa podobne ako patologické množstvo  $A\beta$  hromadia, ale na rozdiel od nich vnútri neurónov, perinukleárne [13,18]. Pri tomto procese postupne dochádza k apoptóze citlivých neurónov, zániku synapsí, no nakopené útvary hyperfosforylovaných proteínov nazývaných neurofibrilárne kľbká aj po smrti bunky ostávajú v postihnutých oblastiach mozgu, a sú preukázateľne zvýšené hladiny p-tau v MMM [13,14]. Mnohé štúdie preto dochádzajú k záveru, že neurodegenerácia vyskytujúca sa u AD je indukovaná  $A\beta$  plakmi, a ich toxicita je sprostredkovaná  $\tau$ -proteínmi [17].

#### 4.1.1.3. Zápal

Oligomery aj fibrily  $A\beta_{1-42}$  sú zdrojom oxidačného stresu a vyvolávajú zápal [16,19]. Fibrily aktivujú bunky imunitného systému centrálného nervového systému (mikroglie),

pričom oligomery ich fagocytózu potláčajú (aj fagocytózu fibríl), čím sa zoslabuje imunitná odpoveď, ktorá má za cieľ škodlivé zhluky odstrániť [19]. Aktivácia mikroglií A $\beta$  prebieha priamo, cez receptory AGE (RAGE). Tento dej prispieva zápalu neurónov [20].

#### 4.1.1.4. Pôsobenie na NMDA receptory

Bunky sú nadmerne vystavované excitačnému mediátoru glutamátu, ktorý zvyšuje tok Ca<sup>2+</sup> iónov do neurónu, čo na ne pôsobí excitotoxicky [21]. Výskum našiel súvislosť medzi bunecnou smrťou neurónov spôsobenou cez NMDA receptory a A $\beta$  proteínmi. A $\beta$  aktivizuje NMDA receptory, zvyšuje intracelulárne hladiny Ca<sup>2+</sup> a extracelulárne hromadenie glutamátu [22].

#### 4.1.1.5. Pôsobenie na cholínernú transmisiu

Preukázalo sa, že agregované A $\beta$  potláčajú aktivitu cholínacetyltransferázy, ktorá produkuje acetylcholín. Hyperfosforylované  $\tau$ -proteíny, ktorých vznik podporujú agregáty A $\beta$ , narúšajú cytoskelet mimo iné aj cholínerných buniek, a tak narušujú cholínernú transmisiu medzi neurónmi. Zheng a kol. na potkanových modeloch preukázali, že septálne cholínerné neuróny patria medzi typy buniek citlivých na toxicitu sprostredkovanú agregátmi A $\beta$ , kým mnohé iné typy buniek sú relatívne odolné [17]. Acetylcholín (ACh) medzi mnohými inými úlohami pomáha udržiavať funkciu pamäte [23,24]. Zánikom neurónov v oblastiach kde sú cholínerné neuróny sa cholínerná transmisia narúša a dochádza tak k výpadkom pamäte a postupne k ďalším kognitívnym deficitom [25]. Preto sa terapia zameriava najmä na doplnenie ACh cestou inhibície enzýmov, ktoré tento neuromediátor metabolizujú.

#### 4.1.1.6. BACE1

Je enzým aktivovaný viacerými endogénnymi a environmentálnymi stresormi, ktoré sa vyskytujú aj u AD [26]. Ako aj iné enzýmy (napr.  $\gamma$ -sekrétáza), podieľa sa na katalýze vzniku A $\beta$  z APP [12]. A $\beta$  však viacerými mechanizmami (napr. ako stresor, zdroj oxidatívneho stresu)



spätne podporuje aktivitu BACE1 [16], čím vzniká pozitívna spätná väzba a vytvára sa tak neregulovaný, začarovaný kruh vedúci k vysokej aktivite BACE1 [26].

#### 4.1.1.7. RAGE

A $\beta$  peptidy patria medzi AGE (advanced glycation end products), ktoré aktivujú ich receptory RAGE (receptor for AGE). Aktivácia receptorov vedie k zvýšeniu transkripcie a teda aj aktivity BACE1, ktorý k ďalšej tvorbe A $\beta$  peptidov prispieva. Tvorí sa tak kruhový pochod, ktorý je bez negatívnej spätnej väzby [26].

#### 4.1.1.8. Kinázy

Patologicky zvýšená aktivita GSK-3 $\alpha$  a GSK-3 $\beta$  spôsobuje, že sa  $\tau$ -proteíny na mikrotubuloch nadmerne fosforylujú. Tak vznikajú vyššie spomenuté nerozpustné neurofibrilárne kľbká, a preto inhibícia tohto enzýmu sa zdá byť racionálnym spôsobom, ako proti chorobe bojovať. Relatívne vysoký výskyt GSK-3 v hipokampe môže súvisieť s priebehom patogenézy, ktorý začína práve v tejto oblasti [27]. K ďalším relevantným enzýmom k tvorbe hyperfosforylovaných  $\tau$ -proteínov radí literatúra niektoré dráhy MAPK („mitogen-activated protein kinase pathways“), ktoré sú nadmieru aktivované pôsobením oxidatívneho stresu a zvýšenej aktivácie mitogénymi signálmi [28–30]. Dokonca sa preukázalo, že v indukciách kináz (GSK-3 $\beta$  a kináz ERK, MEK z dráh MAPK) hrajú rolu do určitej miery A $\beta$ , ktoré potom - ako bolo spomenuté vyššie - vedú k  $\tau$ -fosforyláciám [17]. GSK-3 $\alpha$  sa spolupodieľa na fungovaní  $\gamma$ -sekrétázy, ktorá tvorí A $\beta$ <sub>1-40</sub> a A $\beta$ <sub>1-42</sub> peptidy tvoriace senilné plaky, preto jeho inhibícia vedie k významnému poklesu štiepenia APP na tieto toxické produkty (no GSK-3 $\beta$  antagonizuje štiepenie APP, preto inhibícia GSK-3 $\beta$  mierne zvyšuje produkciu týchto produktov) [31].

#### 4.1.1.9. Prolyloligopeptidáza

POP je enzým štiepiaci kratšie peptidy. Jej aktivita u ľudí je najvyššia v mozgu a v kostrových svaloch. U pacientov s AD bola pozorovaná významne zvýšená aktivita POP

[32]. Inhibíciou tejto peptidázy sa znižuje štiepenie neuropeptidov podporujúcich kognitívne funkcie a spomaľuje sa tiež ukladanie amyloidov, pretože POP svojou aktivitou podporuje tvorbu A $\beta$  [32,33].

#### 4.1.1.10. Genetika

Nositelia alely kódujúcej  $\epsilon$ 4 izoformu apolipoproteínu E (apoE), a to najmä homozygoti, sú v drvivej väčšine tou kohortou, u ktorej hrozí vysoké riziko vývinu AD [34]. APP je kódovaný na 21. chromozóme. Jeho trizómia, ba aj samotná triplikácia génu pre APP spôsobuje skorší nástup AD [35].

#### 4.1.2. Liečivá

Liečivá budujú svoje stratégie na základe odlišností medzi fyziologickým a patologickým stavom pri danej chorobe. Preto liečivá už používané, alebo potenciálne sa zameriavajú na vyššie spomenuté enzýmy, depozitá alebo javy. Najčastejšie sa v praxi využívajú selektívne AChE inhibítory galantamín, donepezil alebo duálny AChE, BuChE inhibítor rivastigmín. Galantamín a od fyzostygmínu odvodený rivastigmín majú pôvod v rastlinnej ríši, preto sú alkaloidy v centre pozornosti pri hľadaní nových, účinných molekúl. Čelade Amaryllidaceae či Papaveraceae a mnohé iné sa stali populárnym predmetom skúmania [36]. Často sa v tejto indikácii predpisuje aj memantín, antagonist NMDA receptorov blokujúci len nadmernú excitáciu neurónov, neinterferujúc s normálnou mierou excitácie [21]. Bohužiaľ tieto účinné látky kauzálné AD neliečia, iba spomaľujú progresiu choroby a zmierňujú jej príznaky. Cieľom súčasnosti je nájsť substancie alebo metódy, ktoré by AD mohli vyliečiť. Nádej sa vkladá do monoklonálnej protilátky aducanumabu, ktorá ale naďalej ostáva kontroverzným z hľadiska otázky, či jeho prínos prevažuje nad jeho rizikami. Jeho účinok spočíva v odstraňovaní patogénnych A $\beta$  agregátov. Európska lieková agentúra (EMA) preto zatiaľ neuznala jeho marketingovú autorizáciu, kým americká Správa potravín a liečiv (FDA) ju povolila [37,38].

#### 4.1.2.1. Prechod látok do mozgu cez HEB a logBB

Aby bola určitá látka využiteľná v terapii zameranej na centrálnu nervovú sústavu – ako to je aj u liečby AD – musí mať vlastnosti, vďaka ktorým je schopná prechádzať cez hematoencefalickú bariéru (HEB). Prechod látok do mozgu závisí od vlastností a stavu HEB a od fyzikálne-chemických vlastností a molekulárnej štruktúry študovanej molekuly. Schopnosť prechodu látky cez HEB sa dá predpovedať pomocou testu PAMPA, ktorý ale poskytuje iba približné výsledky, keďže funguje na základe umelých membrán imitujúcich HEB v laboratórnych podmienkach a chýbajú mu špecifické charakteristiky biologickej HEB [39]. Ďalšou možnosťou predikcie prechodu je výpočet logBB, čo je logaritmický pomer koncentrácie látky v mozgu a jej koncentrácie v krvi [40]. Molekuly s  $\log BB > 0,3$  ochotne prestupujú do mozgu pasívnou difúziou, kým zlúčeniny s  $\log BB < -1,0$  iba v zanedbateľnom množstve [41]. LogBB úzko súvisí s lipofilitou, ktorú vyjadruje logP [42]. Tiež hrá rolu to, či je molekula v disociovej alebo nedisociovej forme, čo je ovplyvňované pH hodnotou prostredia a pKa molekuly [43].

#### 4.1.2.2. Zamerane na prínosy inhibície BuChE

Rola BuChE v pomere k AChE s progresiou AD postupne stúpa a preto jeho inhibícia nadobúda v chorobe väčší význam a to najmä v najviac postihnutých oblastiach mozgu [25]. BuChE je kvôli rozdielnej štruktúre aktívneho miesta od AChE menej selektívnym enzýmom a jeho substrátom nie je len ACh ale aj ďalšie neuroaktívne peptidy [44]. Dôkazy naznačujú, že BuChE sa podieľa na tvorbe malígnych senilných plakov, čím zvyšuje neurotoxicitu sprostredkovanú A $\beta$  [3,4]. Inhibítory BuChE znížili kumuláciu APP [5], ktorý sa po postupnom hromadení a enzymatických premenách mení z difúzných plakov na neuritické, kompaktné senilné plaky [3]. Je možné, že sa BuChE podieľa na tvorení A $\beta$  spolupracujúc s peptidázami [3,45]. Keďže sa BuChE zapája do viacerých molekulárnych pochodov, ktoré s patogenezou AD súvisia, zameranie sa na jeho inhibíciu predstavuje sľubný cieľ v manažmente choroby. Patofyziológia BuChE okrem AD súvisí aj z diabetom mellitom II. typu. Okrem tejto spojitosti, spája AD a diabetes II. typu fakt, že u pacientov s jedným z týchto chorôb je zvýšená pravdepodobnosť výskytu aj druhého ochorenia. U oboch ochorení je typický nález zhoršujúcej sa amyloidózy, ku ktorej vzniku BuChE prispieva [6].

## 4.2. Neuroprotektívne alkaloidy z čeľade Papaveraceae

Už viac zástupcov z čeľade Papaveraceae preukázalo neuroprotektívne vlastnosti. Keďže tieto rastliny patria do jednej rodiny, majú si biosyntetické pochody a ich produkty podobnejšie ako s druhmi iných čeľadi. Papaveraceae sú typickými producentmi alkaloidov, na ktoré sa mnohé výskumy hľadajúce substancie na liečbu AD zameriavajú. Extrakty rastlín a alkaloidy z čeľade makovitých s výraznou cholinesterázovou inhibičnou aktivitou (u cholinesteráz  $IC_{50}$  okolo 20  $\mu M$  a nižšie, u ostatných enzýmov okolo 50  $\mu M$ ) voči enzýmom ovplyvňujúce patogenézu AD sú:

Alkaloidy (+)-taliktrikavín a (+)-kanadín u chochlačky dutej (*Corydalis cava*) vykazujú hodnotu  $IC_{50}$   $hAChE$  0,38  $\mu M$ , resp. 0,70  $\mu M$  a pôsobia v aktívnom centre enzýmu [39]. V ďalšej práci je ale aktivita (+)-kanadínu 12,4  $\mu M$ , (+)-kanadalínu  $IC_{50}$  20,1  $\mu M$  [46]. Kanadín má dobrý prestup cez hematoencefalickú bariéru [39]. (–)-korykavamín, (+)-korynolín sa ukázali byť aktívnymi ( $IC_{50}$ =34,40 resp. 21,91  $\mu M$ ) voči pôsobeniu BACE1 v teste typu FRET a ochotne prestupujú cez HEB [47]. Z rovnakého rodu pochádzajú: *Corydalis mucronifera* s alkaloidom mucroniferanín H s  $IC_{50}$   $hAChE$  2,31  $\mu M$ , pôsobí významne aj na BuChE [48], *Corydalis saxicola* obsahuje mnoho účinných inhibítorov AChE v rozmedzí  $IC_{50}$  1,70–14,50  $\mu M$ , a to 1-nitroapokavidín, berberín, dehydrokavidín, palmatín, nový alkaloid nitrotetrahydroprotoberberínového typu a jeho derivát, sanguinarín, dehydrokavidín, thaliktريفolín [49]. Alkaloidy berberín, palmatín, jatrorizín, koptizín, dehydrokorydalín z *Corydalis yanhusuo* silnú inhibičnú aktivitu na AChE ( $IC_{50}$  od 0,47 do 2,08  $\mu M$ ) [50]. Dva artefakty získané z izolácie látok lastovičníka väčšieho (*Chelidonium majus*) silno inhibovali AChE v koncentrácii  $IC_{50}$  0,83  $\mu M$ , resp. 3,25  $\mu M$  a BuChE v 4,20  $\mu M$  a 4,51  $\mu M$ . Chelidonín vykazoval inhibičnú aktivitu voči AChE ( $IC_{50}$  26,8  $\mu M$ ) a je aktívny aj proti BuChE [51]. Pseudodehydrokorydalín, pseudokoptizín a pseudoberberín sú najpotentnejšími inhibítormi AChE, hodnoty  $IC_{50}$  boli 5,5; 2,1 a 2,5  $\mu M$  spolu s berberínom z rastliny *Corydalis turtschaninovii* [52]. Alkaloidný extrakt *Dicranostigma franchetianum* výrazne inhiboval cholinesterázy ( $IC_{50}$   $AChE$  1,67  $\mu M$  a  $IC_{50}$   $BuChE$  3,85  $\mu M$ ). Z jeho preukázaných alkaloidov najviac inhibuje AChE berberín:  $IC_{50}$  0,71  $\mu M$  [53]. Najvýznamnejšími doposiaľ preukázanými alkaloidmi z tejto čeľade na inhibíciu prolyllooligopeptidázy sú sinaktín ( $IC_{50}$  53,0  $\mu M$ ) zo zemedymu lekárskeho (*Fumaria officinalis*) [54] a kalifornidín ( $IC_{50}$  55,6  $\mu M$ ) zo slnčovky kalifornskej (*Eschscholzia californica*) [55]. Ďalší alkaloid z čeľade makovitých s aktivitou k AD

je chelerytrín izolovaný z makovca srdcovitého (*Macleaya cordata*) [56], ktorý významne oddiaľuje  $A\beta_{1-42}$  agregáciu [57] a dokonca nielenže je duálnym inhibítorom AChE a BuChE ( $IC_{50}=1,54/10,34 \mu M$  hAChE/hBuChE) ale je schopný veľmi významne rozvoľniť už vzniknuté amyloidné plaky [58]:  $IC_{50}$   $A\beta_{1-40}$  agregácie chelerytrínu je  $4,20 \mu M$  [58]. Ďalšími zdrojmi chelerytrínu sú *Chelidonium majus*, *Sanguinaria canadensis* a *Dicranostigma lactucoides* (Papaveraceae) [59]. Berberín je taktiež významným inhibítorom AChE ( $IC_{50}=2,74 \mu M$ ) a agregácie  $A\beta_{1-42}$  ( $IC_{50}=43,84 \mu M$ ) [58]. Keďže mak vlčí patrí do čeľade Papaveraceae a má v skladbe štruktúrou podobné, či rovnaké alkaloidy, stáva sa zaujímavým subjektom s vysokým potenciálom na ovplyvnenie enzýmov, ktoré majú dopad na progresiu Alzheimerovej choroby.

#### 4.2.1. Výskum metabolitov *P. rhoeas* na aktivitu vzťahujúcu sa na AD

Mak vlčí a jeho alkaloidy doposiaľ nebol skúmaný na aktivitu voči cholinesterázam a ďalším enzýmom týkajúcich sa Alzheimerovej choroby okrem diplomových prác z Katedry farmaceutickej botaniky Farmaceutickej fakulty Univerzity Karlovy, ktoré tvoria I. a II. časť série prác pod názvom „Alkaloidy *Papaver rhoeas* L. (Papaveraceae) a ich biologická aktivita vzťahujúca sa na Alzheimerovu chorobu“. V menovaných prácach alkaloidy (+)-rhoeagenín a LB-2 (jeho štruktúra zatiaľ presnejšie nie je určená) vykazovali k BuChE miernu inhibičnú aktivitu:  $IC_{50}$  230, resp.  $314 \mu M$  [7]. Voči AChE sú neaktívne, na POP majú miernu inhibičnú aktivitu: (+)-rhoeagenín  $IC_{50}$   $878 \mu M$ , LB-2  $IC_{50}$   $706 \mu M$ . Druhá časť preukázala miernu inhibičnú aktivitu (–)-stylopínu  $IC_{50}$  AChE  $522 \mu M$  (+)-Rhoeadín je voči cholinesterázam neaktívny. Oba alkaloidy proti POP vykazovali iba veľmi slabú aktivitu [8]. Ak porovnáme literatúru opisujúcu alkaloidy nájdené vo vlčom maku a doposiaľ popísané silno aktívne alkaloidy z čeľade Papaveraceae k enzýmom hrajúcich rolu v patogenéze AD, tak v prieniku týchto dvoch tém objavíme tieto látky: berberín, sanguinarín, koptizín, sinaktín, chelerytrín a kanadín. Pretože sumárny alkaloidný extrakt nášho materiálu preukazoval silnú aktivitu proti BuChE, je zaujímavé sa zmieniť o tom, že zo spomínaných inhibuje BuChE významne iba chelerytrín.

## 4.3. Papaver rhoeas

### 4.3.1. Popis

Mak vlčí (ľudovo divý mak) je jednoročná divo rastúca bylina. Svojím nápadným, červeným kvetom v období od mája do októbra zdobí mnohé lúky, polia, a okraje ciest spadajúce do pásma mierneho a mediteránskeho podnebia. Dosahuje výšku 30 až 90 cm. Podlhovasté, srsnaté listiny má striedavo perovito dielne až perovito strihané, typicky rastúce na dolnej polovine dlhej, chlpacej stopky. Byľ je priama, chudobne rozkonárená. Nižšie uložené listy sú na ňu pripojené krátkymi stopkami, vyššie rastúce na nej sedia priamo. Kvety má jednotlivé, najčastejšie koncové, menej často pazušné. Pred rozkvitnutím sú ovisnuté. Jeho dve zelené kališné lístky sú prchavé. Kvet tvoria štyri na dotyk jemné, žiarivo červené, okrúhle korunné lupienky so šírkou 2–4 cm, v usporiadaní C2+2. Lupienky majú na báze zvyčajne malý čierny fľak, ktoré vďaka usporiadaniu kvetného vzorca tvoria akýsi nenápadný čierny krížik v strede kvetu, viac-menej krytý pohlavnými orgánmi. Nachádza sa tu obrátene vajcovitý semenník s nápadnou lúčovitou bliznou s 8–14 lalokmi a veľké množstvo tyčiniek s nezhrubnutými nitkami a modrozelenými peľnicami. Plochý vrch blizny je pristávacím miestom pre opelujúci hmyz. Plodom je obrátene vajcovitá tobolka, nazývaná makovica. Je veľkosti 10–20 mm, 2-krát dlhšia ako široká, s približne 8-mi neúplnými priehradkami. 1-milimetrové semená bývajú tmavohnedé, obličkovitého tvaru so sieťkovaným povrchom [60–62].

Známe druhy, s ktorými by pri zbere mohlo dôjsť k zámene, sú: *Papaver strigosum* (Boenn.) Schur (mak štetinatý), *Papaver hybridum* L. (mak hybridný), *Papaver dubium* L. (mak pochybný), *Papaver agremone* L. (mak poľný). Hlavnými rozlišovacími znakmi, podľa ktorých sa dá pri identifikácii riadiť, sú nasledovné:

- *P. strigosum* má narozdiel od druhu *P. rhoeas* ochlpenie pritísnuté k stonke, pričom chlčky *rhoeas* so stonkou si sú na seba kolmé [60].
- *P. hybridus* má makovicu guľovitú a bohato štetinatú [60].
- *P. dubium* má skoro čiarkovité, lysé makovice kyjakovito predĺžené. Okraje lalokov blizny sa nekryjú, naopak u *P. rhoeas* sa prekrývajú. Zelené časti maku pochybného majú modravý nádych a nerozvinuté pupene sú širšie, menej podlhovasté [61,63].

- Vzrastom menší (10–50 cm) *P. agremone* má na spodku červených korunných lístkov - ktoré sú od lístkov druhu *P. rhoeas* menšie - vždy čiernu škvrnu. I keď malý čierny, menej výrazný fľak na báze lupienkov môžeme zbadáť aj u druhu *rhoeas*. Korunné lístky sa navzájom neprekrývajú ani nedotýkajú a sú usporiadané do vzorca C4. Tobolka je viac podlhovastá, na báze nenáhlo sa zužujúca. Semená nemá obličkovité, ale polmesiačikové [61].
- Obecne platnou charakteristikou maku vlčieho voči týmto zameniteľným druhom je väčší lupienok [61].



**Obrázok 1: Kvet, plod a celá rastlina *Papaver rhoeas* [64]**

#### 4.3.2. Obsahové látky

Hlavnými sekundárnymi metabolitmi vlčieho maku sú alkaloidy, fenolové látky. Tieto látky uvedené v jednotlivých častiach rastliny sú v tabuľkách 1–2. zoradené od najvýznamnejších po menej významné. Významnosť je daná v prvom rade množstevným zastúpením látky alebo v druhom rade početnosťou výskytu molekuly v literatúre súvisiacou s danou časťou rastliny. Ďalšie, vedľajšie metabolity v jednotlivých častiach rastliny sú uvedené nižšie.

Kvety sú liekopisnou drogou (ČL 2017). Okrem hlavných obsahových látok obsahujú v malom množstve slizy, ktoré sa môžu byť prospešne užívané pri bolestiach hrdla [64].

Listy vo viacerých krajinách konzumované ako zelenina sú zdrojom cenných nutričov. Vo významnom množstve sa v čerstvých listoch nachádzajú organické kyseliny, menovite oxálová, citrónová, jablčná, glutámová, fumarová a kyselina glycerová [65,66]. Množstvo organického kyselín sa mení v závislosti od podmienok panujúcich v prostredí rastliny. Neostáva v čerstvých listoch bez povšimnutia ani hladina vitamínu C, ktorá sa pohybuje okolo hodnoty 31 mg/100 g. V porovnaní s vitamínom C vzhľadom na dennú potrebu človeka nájdeme v listoch nižšie množstvo tokoferolov s aktivitou vitamínu E [65]. Rôzne nasýtené, nenasýtené a polynenasýtené mastné kyseliny dodávajú listom nutričnú hodnotu. Listy sú tiež zdrojom neesenciálnych aj esenciálnych aminokyselín [66]. Glutámová kyselina je zastúpená najhojnejšie a môže hrať rolu v tvorbe chuti tejto zeleniny [65,67]. Medzi mikronutrientmi môžeme spomenúť draslík, vápnik, horčík, fosfor, železo a zinok [68].

Vňať navyše obsahuje silice. Najhojnejšie v nej nájdeme napríklad acyklický diterpén fytol, alkán trikosan, v menšom zastúpení sú však obsiahnuté aj cyklické terpény ako  $\alpha$ -pinén,  $\beta$ -karyofylén,  $\alpha$ -terpineol a ďalšie. [69]. Vodný extrakt okrem zmienovaných metabolitov obsahuje aj taníny a saponiny [70]. Ďalej boli z vňate izolované prekurzory z biosyntetickej cesty izochinolínových alkaloidov: tyrozín, 4-hydroxyfenylacetaldehyd, tyramín a dopamín [71].

Semená sú okrem alkaloidov zdrojom olejov a proteínov [72].

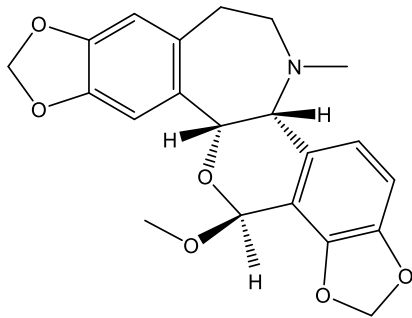
#### 4.3.2.1. Alkaloidy

Isté alkaloidy boli preukázané iba v niektorých chemotypoch druhu *Papaver rhoeas* [64]. Tie sú označené \*. Ani u ostatných alkaloidov sa zatiaľ nedá vylúčiť závislosť prítomnosti od chemotypu. Obecné platí, že kvalitatívna a kvantitatívna skladba alkaloidov vykazuje veľkú variabilitu závislú nielen od lokality zberu, ale aj od ontogenetického štádia rastliny [71].

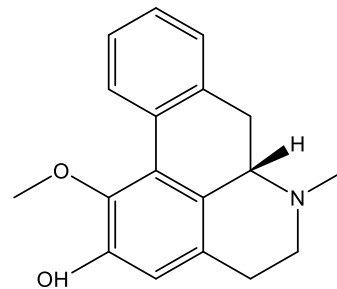
Najviac preukázaných alkaloidov má vo svojom skelete zabudovaný izochinolín. Najvýznamnejší alkaloid rhoeadín a ďalšie alkaloidy rhoeadínového typu však namiesto



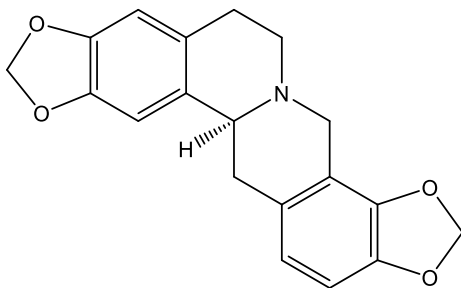
izochinolínu obsahujú sedemčlenný kruh s heteroatomickým dusíkom a ortokondenzovaným benzénom. Uvedené alkaloidy až na trigonelín patria medzi izochinolínové alkaloidy. Okrem čeľade Papaveraceae sa izochinolínové alkaloidy hojne nachádzajú aj v ďalších čeľadiach z radu Ranunculales ako napr. u Ranunculaceae či Berberidaceae [1]. Významnejšie alkaloidy zo zastupiteľov rôznych štruktúr:



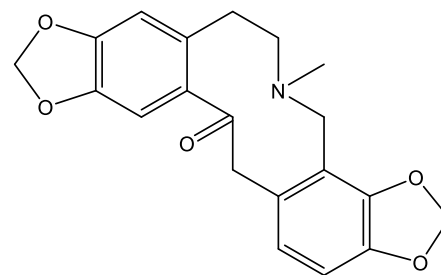
Rhoeadín (rhoeadínový typ)



*N*-metylasimilobín (aporfínový typ)

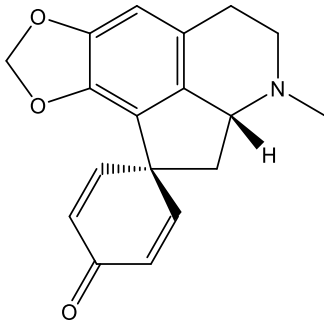


Stylopín (protoberberínový typ)

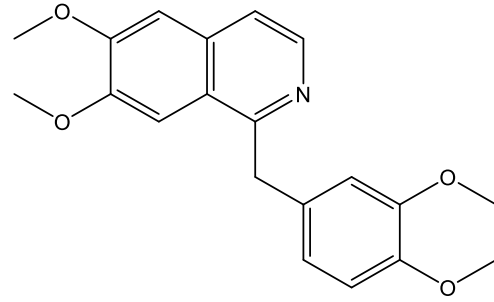


Protopín (protopínový typ)

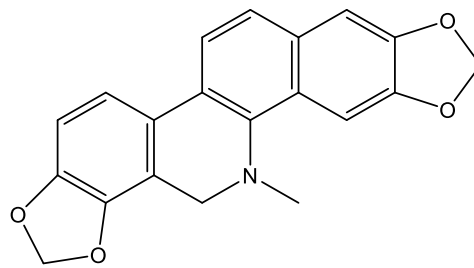
**Obrázok 2: Alkaloidy rôznych štruktúrnych typov obsiahnuté v *Papaver rhoeas***



Mekambrín (proaporfínový typ)



Papaverín (benzylzochinolínový typ)



Dihydrosanguinarín (benzofenantridinový typ)

**Obrázok 2: Alkaloidy rôznych štruktúrnych typov obsiahnuté v *Papaver rhoeas* (pokračovanie)**

**Tabuľka 1: Prehľad alkaloidov identifikovaných v *P. rhoeas***

<b>Alkaloidy</b>			
Časť rastliny	Názov molekuly	Štruktúrny typ	Literatúra, poznámky
Kvety	Rhoeadín	Rhoeadínový typ	[2,73]
	Izorhoeadín	Rhoeadínový typ	
	Rhoeagenín	Rhoeadínový typ	
	Mekambrín	Proaporfínový typ	
	Papaverín	Benzylizochinolínový typ	
	Berberín	Protoberberínový typ	
	Protopín	Protopínový typ	
Semená	Sanguinarín *	Benzofenantridínový typ	[74]
	Neuvedené	Neuvedené	[72]
Listy	Trigonelín	Pyridínový typ	[66]
Vňať	Rhoeadín	Rhoeadínový typ	[75]
	<i>N</i> -metylasimilobín	Aporfínový typ	[76], najzastúpenejší u egyptského chemotypu
	Stylopín	Protoberberínový typ	[71,77]
	Protopín *	Protopínový typ	[75]
	Koklaurín	Benzylizochinolínový typ	[71]
	Dihydrosanguinarín	Benzofenantridínový typ	
	Demetylkoklaurín	Benzylizochinolínový typ	
	Korytuberín	Aporfínový typ	
	Tetrahydroberberín *	Tetrahydroprotoberberínový typ	
	Retikulín	Benzylizochínolinový typ	
	Tetrahydrokolumbamín *	Tetrahydroprotoberberínový typ	
	Tetrahydropalmatín *	Tetrahydroprotoberberínový typ	

**Tabuľka 1: Prehľad alkaloidov identifikovaných v *P. rhoeas* (pokračovanie)**

Vňať	Berberín *	Protoberberínový typ	[75]
	Sanguinarín *	Benzofenantridínový typ	[71]
	Skoulerín *	Protoberberínový typ	
	Allokryptopín *	Protopínový typ	[64,75]
	Roemerín *	Aporfínový typ	
	Koptizín	Protoberberínový typ	
	Sinaktín	Protoberberínový typ	
	Kouleteropín *	Protopínový typ	
	Rhoeagenín	Rhoeadínový typ	
	Izokorydín	Aporfínový typ	
	Izorhoeagenín	Rhoeadínový typ	[64]
	Izorhoeadín	Rhoeadínový typ	
	Epiglaukamín	Rhoeadínový typ	
	Glaukamín	Rhoeadínový typ	
	Glaudín	Rhoeadínový typ	
	Mekambrín	Proaporfínový typ	
	Salutaridín	Promorfinanový typ	
	Papaverrubíny A, B, C, D, E	Rhoeadínový typ	[78]
	Chelerytrín	Benzofenantridínový typ	[74]
	Kryptopín	Protopínový typ	[79]
Oxysanguinarín	Benzofenantridínový typ		
Epiberberín*	Protoberberínový typ	[77], epiberberín:	
Kanadín *	Protoberberínový typ	prvýkrát preukázaný v rode <i>Papaver</i> , kanadín: prvýkrát v <i>P. rhoeas</i> možno nový chemotyp v Libanone	
Koreň	Rhoeadín	Rhoeadínový typ	[80]
	Izorhoeagenín	Rhoeadínový typ	
	Chelerytrín *	Benzofenantridínový typ	[74]

#### 4.3.2.2. Fenolové zlúčeniny

Patria sem rôzne flavonoidy, depsidy, polyfenoly, organické kyseliny, a ich estery. Medzi flavonoidy sa radí aj skupina anthokyánov, ktorá je zastúpená v kvetoch. Literatúra spomína aj výskyt kumarínu, ktorý je ale málo významný.

**Tabuľka 2: Fenolové zlúčeniny v *P. rhoeas***

Fenolové látky			
Časť rastliny	Názov molekuly	Štruktúrny typ	Literatúra
Kvety	Cyanidín	Antokyán	[64,81]
	Malvidín	Antokyanidín	[2]
	Luteolinidín	Antokyanidín	
	Mecocyanín	Antokyán	[64]
	Hyperozid	Glykozid flavonolu	[2,82]
	Astragalín	Glykozid flavonolu	
	Izokvercitrín	Glykozid flavonolu	
	Kempferol	Flavonol	[82]
	Kvercetín	Flavonol	
	Luteolín	Flavón	
	Hypolaetín	Flavón	
	Ester 2,4,6-trihydroxyfenyloctovej kyseliny s protokatechovou kyselinou	Depsid	[2,82]
	Ester 2,4,6-trihydroxyfenyloctovej kyseliny s <i>p</i> -hydroxybenzoovou kyselinou	Depsid	
	Methylester <i>p</i> -hydroxybenzoovej kyseliny	Ester	[82]
	Protokatechová kyselina	Fenolová kyselina	

**Tabuľka 2: Fenolové zlúčeniny v *P. rhoeas* (pokračovanie)**

Kvety	2-(4-hydroxyfenyl)-etanol (syn. tyrosol)	Fenolová látka	[82]
	2-(3,4-dihydroxyfenyl)-etanol (syn. 3-hydroxytyrosol)	Fenolová látka	
	<i>p</i> -hydroxybenzoová kyselina	Fenolová kyselina	
Listy	Apigetrín (syn. cosmosiin)	Glykozid flavónu	[66]
	Luteolín-7-glykozid (syn. cynarozid)	Glykozid flavónu	
	Luteolín-7-rutinozid (syn. veronikastrozid)	Glykozid flavónu	
	Kvercetín-7-rutinozid	Glykozid flavonolu	[83]
	Kvercetín-3- <i>O</i> -rutinozid	Glykozid flavonolu	
	Izoramnetín-3- <i>O</i> -rutinozid	Glykozid flavonolu	
	Cichorová kyselina	Ester, kyselina	[66]
	Chlorogénová kyselina	Ester, kyselina	
	Kaftarová kyselina	Ester, kyselina	
	Neochlorogénová kyselina	Ester, kyselina	
Vňať	Kvercetín	Flavonol	[68]
	Kempferol	Flavonol	
	Izoramnetín	Flavonol	
	Myricetín	Flavonol	
	Apigenín	Flavón	
	Luteolín	Flavón	
	Kvercetín-3- <i>O</i> -rutinozid	Glykozid flavonolu	[83]
	Izoramnetín-3- <i>O</i> -rutinozid	Glykozid flavonolu	

#### 4.3.3. Použitie v terapii, využitie

Liekopisnou drogou (ČL 2017) je kvet vlčieho maku, lat. *Papaveris rhoeados flos*. V ľudovom liečiteľstve v Európe (Turecko) sa používal nálev z vňate vnútorne proti reumatickým chorobám [84], bolesti [64], čerstvé listy perorálne na posilnenie organizmu ako tonikum, sirup z korunných lístkov na bolesti hrdla, potlačenie kašľa, ukludnenie priedušiek, nálev zo sušených korunných lístkov (podávaný s citrónovou šťavou) vnútorne ako imunotonikum a galaktagogum, a externe pri epistaxii [84]. V Grécku bol po ópiu druhým najpoužívanejším liekom pri nespavosti vlčí mak [85]. V Maroku sú kvety a plody tradičným liekom proti osýpkam [86]. Ďalší zdroj spomína gastroprotektívny účinok koreňa, u ktorého si empiriou využívanú schopnosť overili aj *in vivo* [87]. Rastlina preukázala taktiež antidiaroidné účinky *in vivo*, pre ktoré ju tradične využíval ľud v Iráne [88]. Spomínajú sa tiež anthelmintické účinky koreňa [89]. Na území Bosny a Hercegoviny, Dalmácie a Grécka sa dodnes používajú uvarené listy ako zelenina v zmesi s ďalšími varenými listovými zeleninami [68,90,91]. Je ich ale treba konzumovať s mierou, pretože v dávkach od 250 g boli pozorované intoxikácie zrejme pre obsah alkaloidov [92]. V Maďarsku si deti často pochutnávali na korunných lístkoch [93]. Červené lupienky sa používajú k zdobeniu čajových zmesí.

#### 4.3.4. Biologický účinok obsahových látok

Mnohé výskumné skupiny preukázali rozmanité účinky rôznych extraktov z jednotlivých častí rastliny. Jedinečnou schopnosťou extraktu je znižovanie vzniku tolerance proti účinkom morfiu čím sa stáva perspektívnou látkou do budúcnosti pre ďalšie terapeutické účely. Zmierňuje príznaky abstinenčného syndrómu u morfia a môže spomaliť vznik tolerance proti jej analgetickým účinkom [88,94]. Je to fakt hodný spomenutia, pretože sa zdá, že manažment bolesti môže spomaľovať progresiu demencie u pacientov s AD [95]. Vodný extrakt z vňate podaný perorálne preukázal vyššiu protizápalovú aktivitu *in vivo* u potkanov ako indometacín. Analgetická schopnosť v dávke 400–800 mg extraktu listov/kg bola podobná morfiu v dávke 5 mg/kg. Predpokladajú sa komplexné účinky tanínov, saponínov, terpenoidov, flavonoidov a alkaloidov na bolesť, medzi ktorými môže byť aktivita podobná nesteroidným antiflogistikám, inhibícia prenosu vzruchov na synapsiách či priamy

účinok na receptory [70]. Listy vykazujú nielen protizápalovú, ale aj antioxidačnú aktivitu *in vivo* [96]. Roemerín preukázal v štúdiách vazodilatačné účinky ktoré vyplývajú najmä z afinity k  $\alpha_1$  receptorom [97]. Niektoré vazodilatátory môžu byť využívané pri hypoperfúzii mozgu, ktorá prehľbuje neurodegeneratívne zmeny a môže viesť k zhoršovaniu pamäti [98]. Rôzne chemotypy obsahujú jednotlivé typy alkaloidov v premenlivých pomeroch, v niektorých sa niektoré alkaloidy ani nepreukážu. Preto ak je účinok závislý od alkaloidov, je možné, že sa napr. u rastliny toho istého druhu ale iného miesta zberu účinok neprejaví. Roemerín môže byť podávaný perorálne, pretože má vysokú biodostupnosť [99]. Výskum preukázal koreláciu medzi silou antioxidačnej aktivity rôznych extraktov korunných lístkov a koncentráciou fenolových látok a flavonoidov. Významnejší podiel na antioxidačnej kapacite majú obsiahnuté fenolové látky. U anthokyánov sa tiež predpokladá antioxidačná aktivita, ktorá ale z dôvodu prílišnej uniformity koncentrácií anthokyánov v jednotlivých extraktoch nebola potvrdená. Najvyššia antioxidačná aktivita z testovaných extraktov bola nameraná u vodného extraktu korunných lístkov [100], no aj u vňate bola podobne ako u kvetov preukázaná schopnosť zhášania voľných radikálov a navyše dokázaná schopnosť znižovania hladín reaktívnej formy kyslíka indukovanú prooxidačným činidlom. V súvislosti s týmito poznatkami vykazuje antimutagénne a antikarcinogénne vlastnosti [101]. Extrakt z listov preukázal cytotoxicitu a genotoxicitu závislú na koncentrácii, no paradoxne v nízkej dávke vo významnej miere chráni bunky a chromozómy pred oxidačným stresom pôsobeným rádiomimetickým činidlom, čím znižuje jeho mutagénne účinky. Odvíjajúc sa od charakteru a správania vzoriek sa predpokladá, že významnú rolu v tomto fenoméne môže hrať adaptívna odpoveď, tzv. „adaptive response“ bunky. Spočíva v prvotnej nižšej dávke oxidantu, ktorý vyvíja oxidatívny stres podporujúci aktivovanie antioxidačných a opravných pochodov v bunke, ktorá pri aplikovaní mutagénu s dostatočným časovým odstupom, je pripravená čeliť škodlivým exogénnym vplyvom. Taktiež treba podotknúť, že je vždy dôležité zvážiť koncentráciu biologicky aktívnej látky, ktorá ako i v tomto prípade môže byť malom množstve prospešná, no vo vyššej koncentrácii môže ublížiť [102]. Alkaloidy stylopín, kanadín, berberín a epiberberín preukázali cytotoxickú aktivitu proti rôznym typom ľudských rakovinových buniek, ktorá bola významne vyššia, než cytotoxicita proti nerakovinovým bunkám, čo indikuje určitú selektivitu k malígnym bunkám [77]. Alkoholický extrakt vlčieho maku podaný intravenózne znížil u potkanov stres preukázaný testom „elevated plus maze“, tj. vyvýšeného bludiska v tvare kríža, pričom v súvislosti s týmto javom bol pozorovaný pokles hladín



kortikosterónu [103]. U myší bol preukázaný utlmujúci účinok vodno-etanolového extraktu kvetov na pohybovú aktivitu nesúvisiacu s alkaloidmi, ani preukázanými flavonoidmi a antokyánmi. Tým experiment potvrdzuje tradične využívaný sedatívny efekt drogy. Podľa výsledkov nezávisí od dopamínerných, cholínerných, opioidných, ani benzodiazepínových receptorov [104].

#### 4.3.5. Toxicita obsahových látok

Toxicita: LD<sub>50</sub> vodného extraktu z listov bolo podľa štúdie stanovené na myšiach v dávke 2000 mg/kg [70]. LD<sub>50</sub> vodno-etanolového extraktu kvetu v inej štúdií takisto na myšiach mala hodnotu 4000 mg/kg [104]. Je známych pár prípadov, kedy u ľudí kvôli nadmernej konzumácii vlčieho maku došlo k intoxikácii. Literatúra udáva, že k otravám došlo pri dávkach 250, až 500 g uvarenej rastliny. Prejavmi otravy boli: nevoľnosť, nekľud, dyspnoe, mióza, generalizovaný klonický záchvat; u ďalšieho pacienta kŕče v končatinách, bezvedomie, penenie z úst, zmätenosť, tachykardia, laktátová acidóza; v ďalších prípadoch sa ešte vyskytli: vracanie, trpnutie končatín, bradykardia. Za tieto účinky pravdepodobne môžu alkaloidy [92]. Niektoré izochinolínové alkaloidy, hlavne sanguinarín, spôsobujú glaukóm a edém, po početných prípadoch v rôznych krajinách nazývaný „endemic dropsy“. Tiež obilniny kontaminované rastlinami s obsahom sanguinarínu sú často krmivom pre zvieratá, ktoré potom produkujú mlieko či vajcia s obsahom tohto alkaloidu [74,105]. Vo vyšších ako terapeutických koncentráciách je extrakt z vlčieho maku slabo cyto- a genotoxický [102]. Pri väčšej konzumácii tejto rastliny ako zeleniny je si treba uvedomiť, že šťaveľová kyselina, ktorú obsahuje môže vo vyšších dávkach prispieť v obličkách k vzniku oxalátov s vápnikom (najmä u ľudí so sklonom k obličkovým kameňom) alebo znižovať biodostupnosť vápnika [65].

## 5. EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

### 5.1. Materiál a vybavenie

#### 5.1.1. Rozpúšťadlá a chemikálie

- benzín lekársky, liekopisnej kvality (Ing. Švec – Penta, Praha), (LB)
- dichlórmetán (Ing. Švec – Penta, Praha), ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ )
- etylacetát (Ing. Švec – Penta, Praha) (EtOAc)
- metanol HPLC kvality (Ing. Švec – Penta, Praha), ( $\text{CH}_3\text{OH}$ )
- isopropanol p.a. (Ing. Švec – Penta, Praha), (IPA)
- vodný roztok amoniaku 25% (Ing. Švec – Penta, Praha), ( $\text{NH}_4\text{OH}$ )
- cyklohexán p.a. (Ing. Švec – Penta, Praha) ( $\text{C}_6\text{H}_{12}$ )
- dietylamin p.a. (Ing. Švec – Penta, Praha), ( $\text{Et}_2\text{NH}$ )
- chlorid ortuťnatý p. a. (Fisher Scientific, Pardubice) ( $\text{HgCl}_2$ )
- dusičnan bizmutitý zásaditý (Lachema, Brno)
- jodid draselný č. (Lach-Ner, Neratovice)
- kyselina vínna p. a. (Balex, Pardubice)
- metanol LC-MS (VWR Chemicals, Stříbrná Skalice), (MeOH)
- kyselina mravčia  $\geq 99$ , LC-MS kvality (VWR Chemicals, Stříbrná Skalice), ( $\text{HCOOH}$ )
- deuterizovaný chloroform pre NMR analýzu (Sigma Aldrich, Praha) ( $\text{CDCl}_3$ )
- síran sodný bezvodý p. a. (Ing. Švec – Penta, Praha) ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ )
- destilovaná voda
- Dragendorffovo činidlo podľa Muniera

### 5.1.2. Pomocné materiály

- kremelina Celite C 535 (Sigma Aldrich, Praha)
- sušiace perly silikagélu (Ing. Švec – Penta, Praha)

### 5.1.3. Chromatografické adsorbenty

- analytické TLC dosky silikagél 60 F<sub>254</sub> (Merck Millipore, Praha), 20 × 20 cm, vrstva 200 μm
- silikagél 60 GF<sub>254</sub> pre preparatívnu TLC (Merck Millipore, Praha)
- silikagél 60 15 μm (Interchim, Chromservis, Praha)
- oxid hlinitý neutrálny HPLC flash grade, 32–63 μm (Alfa-Aesar, Termofisher Scientific, Pardubice)

### 5.1.4. Vyvíjacie sústavy na TLC vizualizácie

- S1 (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub> + EtOAc + Et<sub>2</sub>NH; 45:45:10)
- S2 (MeOH + NH<sub>4</sub>OH 0,1 %)
- S3 (EtOAc + IPA + MeOH s NH<sub>4</sub>OH 0,1 %)

### 5.1.5. Prístroje, softvéry

- plynový chromatograf s hmotnostnou detekciou (GC-MS) Agilent (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Systém obsahuje chromatograf Agilent 7890 A s hmotnostným detektorom Agilent 5975 C MSD pracujúcim v režime elektrónovej ionizácie pri 70 eV (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)
- Flash chromatografický systém BÜCHI Sepacore flash system X10 skladajúci sa z riadiacej jednotky Büchi C-620, zberačom frakcií Büchi C-660, detektorom UV C-640

a pumpou Büchi C-605 (Büchi, Švajčiarsko). K ovládaniu systému sa používa PC s programom SepacoreControl 1.2. (Büchi, Švajčiarsko)

- preparatívny/analytický HPLC Waters Autopurification systém (Waters Corporation, Milford, USA). Prístroj sa skladá z nasledujúceho prístrojového vybavenia: automatické dávkovacie zariadenie pripojené k zberaču frakcií Waters Sample Manager 2767, kolónový selektor System Fluidics Organizer, binárne gradientové pumpy Waters 2545, detektor s diódovým polom Waters 2998 a hmotnostným spektrometrom Waters Acquity qDa s ionizáciou elektro-sprejom. Kolóna XSelect® CSH™ C18 OBD™ (100 mm x 4,6 mm, veľ. častíc 5 µm) (Milford, USA)
- vákuová odparka Büchi Rotavapor R-114 (Büchi, Flawil, Švajčiarsko)
- spektrometer Varian VNMR S500 (Varian, Palo Alto, California, USA)
- polarimeter P 3000 (A. Krüss Opteronic, Hamburg, Nemecko)
- Merck Millipore (Milford, MA, USA)
- ultrazvukový kúpeľ Sonorex Super 10P (Bandelin, Berlin, Nemecko)
- magnetická miešačka Heidolph Mr Hei-Standard (Heidolph, Schwabach, Nemecko)
- exsikátor

#### 5.1.6. Kolóny a kartridže pre Flash chromatografiu

- PP kartridže 40 × 150 mm (Büchi, Švajčiarsko)
- sklenená predkolóna 100 × 26 mm (Büchi, Švajčiarsko)
- sklenené kolóny 15 × 150 mm a 15 × 250 mm (YMC, Chromservis, Praha)

### 5.1.7. Rastlinný materiál

Skúmaný rastlinný materiál tvoria nadzemné časti *Papaver rhoeas* s nezralými tobolkami. Celkové množstvo čerstvej drogy činilo 180 kg, ktoré po sušení vážilo 41 kg. Prípravu rastlinného materiálu a prípravu alkaloidných výtrepkov pri pH 9–10 do rôznych rozpúšťadiel popisuje diplomová práca Mgr. Simony Víchovej [106], na ktorú táto práca nadväzuje.

## 5.2. Obecné postupy

### 5.2.1. Príprava a skladovanie rozpúšťadiel

Komerčne používané rozpúšťadlá pre chromatografiu boli pred použitím čistené destiláciou, a to v prípade, že neboli HPLC kvality, či vyššej. Destilácia prebiehala podľa štandardných postupov, a hlavné frakcie boli zbierané podľa teploty varu daných rozpúšťadiel. Rozpúšťadlá sa skladovali v tmavých, uzavretých fľašiach.

### 5.2.2. Odparovanie rozpúšťadiel a sušenie jednotlivých frakcií

Odparovanie organických rozpúšťadiel z frakcií obsahujúcich alkaloidy získaných pri separácii flash, alebo prep. TLC prebiehalo za zníženého tlaku na vákuovej odparke pri teplote vodného kúpeľa 50 °C. Následne sa frakcie dosušovali v exsikátore s podtlakom cca. 1,33 kPa a desikantom – silikagélom po dobu aspoň 24 hodín.

### 5.2.3. Skladovanie extraktov

Získané suché extrakty a izolované alkaloidy boli skladované na tmavom mieste pri 2–8 °C.

#### 5.2.4. Príprava liatych vrstiev pre preparatívnu TLC

Suspensia pre nalievanie liatych dosiek pre prep. TLC sa pripravila zamiesaním homogenizáciou silikagélu (6,5 g) Kieselgel 60 GF<sub>254</sub> s destilovanou vodou (20 ml). Táto suspenzia sa naniesla na sklenené dosky (15 × 15 cm), ktoré boli pred nanesením suspenzie očistené EtOH a CHCl<sub>3</sub>. Takto pripravené TLC dosky sa nechali pred použitím schnúť 24 hodín.

#### 5.2.5. TLC detekcia

Pre zistenie prítomnosti alkaloidov vo frakciách získaných flash chromatografiou alebo čistoty izolovaných alkaloidov sa používala detekcia v oblasti UV svetla (chromatogram pozorovaný pod UV lampou pri  $\lambda = 254$  a  $366$  nm), nasledovaná postrekom Dragendorffovým činidlom podľa Muniera. Dragendorffovo činidlo podľa Muniera: zásobný roztok bol pripravený spojením roztokov A a B, v pomere 1:1. Roztok A: 1,7 g zásaditého dusičnanu bizmutitého a 20 g kyseliny vínnej sa rozpustilo v 80 ml destilovanej vody. Roztok B: 32 g jodidu draselného sa rozpustilo v 40 ml destilovanej vody. Dragendorffovo činidlo vzniklo zmiesaním 10 g kyseliny vínnej rozpustenej v 50 ml destilovanej vody a 5 ml zásobného roztoku.

## 5.3. Stĺpcová flash chromatografia

### 5.3.1. Deaktivácia adsorbentov

Pre flash chromatografiu sa obvykle používajú plne aktívne adsorbenty. Pre separáciu na silikagéli 60 15  $\mu\text{m}$  bola ale vykonaná deaktivácia adsorbentu prídavkom 25 % vody (nastavenie na stupeň aktivity IV podľa Brockmana). K odváženému množstvu adsorbentu (25 g) sa postupne pridalo vypočítané množstvo vody, a silikagél sa nechal premiešavať na magnetickej miešačke po dobu 60 minút. Podobným spôsobom prebiehala deaktivácia neutrálneho  $\text{Al}_2\text{O}_3$  32–63  $\mu\text{m}$  prídavkom 6 % vody (nastavenie na stupeň aktivity II podľa Brockmana).

### 5.3.2. Príprava predkolóny

Dva hmotnostné diely silikagélu alebo štyri diely oxidu hlinitého pre prvú stĺpcovú chromatografiu sa zmiesili s jedným hmotnostným dielom chloroformového extraktu/frakciou rozpustenou v malom množstve rozpúšťadiel  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  a MeOH (1:1). Na prípravu rozteru („solid sample“) bol použitý adsorbent rovnakej kvality ako pre samotnú separáciu. Zmes sa miesila a sušila nad vodným kúpeľom pri 60 °C až do odparenia rozpúšťadiel, a následne sa nechala vychladiť a dosušiť v exsikátore za zníženého tlaku po dobu 24 hodín. Odparením rozpúšťadiel a stálym miešaním došlo k adsorpcii alkaloidov na adsorbenty. Hotovým rozterom sme naplnili predkolónu.

### 5.3.3. Plnenie a kondicionovanie kolóny/HP kartridže pre flash chromatografiu

Kartridže/kolóny sa plnili nasypaním požadovaného množstva daného adsorbentu za občasného sklepania. Pred samotnou separáciou bolo vykonané kondicionovanie mobilnou fázou odpovedajúcou 3-násobku kolónového objemu.

## 5.4. Štruktúrna analýza

### 5.4.1. GC-MS analýza

GC-MS analýza prebiehala pomocou plynového chromatografu Agilent 7890A GC s hmotnostným detektorom Agilent 5975. Kolónou bola DP-5 MS (30 m × 0,25 mm × 0,25 μm) od výrobcu Agilent Technologies Santa Clara, Kalifornia, USA. Teplotný program bol nasledujúci: najprv sa nastavila teplota 100 °C po dobu 1 minúty, ktorá sa postupne zvyšovala o 15 °C za minútu, pokiaľ nebola dosiahnutá teplota 180 °C, táto teplota sa udržiavala 1 minútu. Potom sa rýchlosť zvyšovania teploty spomalila na 10 °C za minútu do dosiahnutia teploty 300 °C, táto teplota sa udržiavala 12 minút. Ako nosný plyn bolo použité Hélium 5.0 s rýchlosťou prietoku 1 ml za minútu. Nástrek bol vykonaný pri teplote injektoru 270 °C a splitu v pomere 1:10. Objem vzorky (metanolový roztok alkaloidného extraktu) bol 1 μl s koncentráciou 0,2 mg/ml. Detekčné rozmedzie bolo m/z 50–500 (hmotnosť iónu lomeno jeho nábojom) pri teplote detektora 305 °C a elektrónovej ionizácii 70 eV. Analýza štruktúr alkaloidov sa porovnávala s dostupnými spektrami v komerčnej knižnici spektier NIST11 (National Institute of Standards and Technology Library, USA) a s dátami v literatúre. Pomocou GC-MS analýzy bola zisťovaná aj molekulová hmotnosť vzoriek, ktorá je dôležitá pre ďalšie objasnenie štruktúry izolovaných látok.

### 5.4.2. LC-MS analýza

Alkaloidy (0,2 mg) boli rozpustené v 1 ml MeOH (LC-MS kvality) a merané systémom Waters Autopurification™. Ako mobilná fáza (MF) bola použitá H<sub>2</sub>O s 0,1 % HCOOH (MF A) a MeOH s 0,1 % HCOOH (MF B). Prietok mobilnej fázy bol nastavený na 1 ml/min. Elučný program s gradientom bol nasledovný (v/v): 0 min. 5 % MF B; 5 min. 100 % MF B; 8,5 min. 5 % MF B; potom 1,5 minúty v počiatočných podmienkach pre ekvilibráciu. Hodnoty parametrov ESI-MS boli nasledujúce: kapilárne napätie (0,8 kV), teplota próby (600 °C), kužeľové napätie (15 V). LC-MS hmotnostné spektrá boli detegované v rozmedzí 200 – 800 m/z. Rozsah PDA detektoru bol nastavený od 190 do 700 nm. ESI-MS analýzy prebiehali v kladnom iónovom móde.



### 5.4.3. NMR analýza

NMR spektrá ( $^1\text{H}$  NMR a  $^{13}\text{C}$  NMR) boli namerané na spektrometri Varian Iniova 500 s pracovnou frekvenciou 500 MHz pre  $^1\text{H}$  a 125 MHz pre  $^{13}\text{C}$  jadrá. Meranie bolo vykonané pri teplote 25 °C v deuteriochloroforme ( $\text{CDCl}_3$ ) na Katedře organické a bioorganické chemie (doc. PharmDr. Jiří Kuneš), Ph.D. Spektrá  $^1\text{H}$  boli merané inverznou 5 mm ID PGF sondou za použitia štandardných pulzných frekvencií a pre meranie  $^{13}\text{C}$  spektier boli využité 5 mm SW širokopásmové sondy.

### 5.4.4. Meranie optickej otáčavosti

Optická otáčavosť bola meraná v MeOH na polarimetri Automatic P 3000 pri teplote 25 °C.

## 5.5. Izolácia alkaloidov

### 5.5.1. Príprava spojeného chloroformového výtrepku

Spojený chloroformový výtrepok vznikol spojením etylacetátového výtrepku (1,90 g), chloroformového výtrepku (7,62 g) a chloroformového výtrepku obsahujúceho kvartérne alkaloidy vo forme jodidov (0,45 g), pretože tieto jednotlivé extrakty vykazovali na základe LC-MS analýzy podobné zloženie látok. Takto spojená frakcia preukázala významnú inhibičnú aktivitu voči BuChE (tab. 3). Postup prípravy týchto extraktov, a sumárneho extraktu z ktorého pochádzali, je popísaný v diplomovej práci Mgr. Simony Víchovej [106], na ktorú táto práca nadväzuje. Celkový výťažok spojeného chloroformového extraktu tak činil 9,97 g.

**Tabuľka 3: Percentuálna BuChE inhibičná aktivita extraktov**

Analyzované extrakty	% inhibícia AChE (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	% inhibícia BuChE (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ )
$\text{Et}_2\text{O}$	31,48 $\pm$ 1,22	93,84 $\pm$ 0,63
$\text{CHCl}_3 + \text{EtOAc} + \text{I}^-$	41,16 $\pm$ 1,52	93,79 $\pm$ 0,41

### 5.5.2. Flash chromatografia na Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

Spojený výtrepok bol separovaný flash chromatografickým systémom BÜCHI Sepacore flash system X10 s HP kartridžou 40 × 150 mm, naplnenej 200 g neutrálnym Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> deaktivovaný prídavkom 6 % vody. Kolóna bola pred samotnou separáciou premytá (kondicionovaná) 3-násobným kolónovým objemom mobilnou fázou LB a EtOAc v pomere 9 : 1 pri prietoku 40 ml/min. Alkaloidy vo forme rozteru s Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> boli v celkovej hmotnosti 50 g prenesené do predkolóny o rozmeroch 100 mm × 26 mm. Separácia prebiehala gradientovou elúciou, s prietokom o rýchlosti 40 ml/min. Mobilnú fázu č. I tvoril spočiatku LB s postupným skokovitým pridávaním EtOAc, podľa uvedeného gradientu v tab. 4. Elúcia v tomto zložení prebiehala 1 hod. a 30 min. Následne sa mobilná fáza č. II menila na polárnejšiu v zložení EtOAc s postupným pridávaním MeOH podľa tab. 5, táto separácia trvala 1 hod a 10 min. Zber frakcií od minimálnych pík sa vykonával po 25 ml, mimo pík po 50 ml. Získalo sa tak 154 frakcií ktoré sa po vyhodnotení chromatogramu a vyvinutých TLC dosiek (na silikagéli 60 F<sub>254</sub> s vyvíjajúcou zmesou S1, počtom vyvíjaní 1x, detekciou pri UV a Dragendorff. činidlom) mohli navzájom spojiť, a to v prípade, ak vykazovali rovnaké zloženie. Týmto spôsobom, po spojení frakcií sa získalo 7 spojených frakcií.

**Tabuľka 4: Elučný gradient MF I, SF Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>**

Start %B	End %B	min	s
10	10	10	0
10	12	0	5
12	12	10	0
12	15	0	5
15	15	10	0
15	20	0	5
20	20	10	0
20	30	0	5
30	30	10	0
30	45	0	5
45	45	10	0
45	60	0	5
60	60	10	0
60	80	0	5
80	80	10	0
80	100	0	5
100	100	10	0

Total Time: 01:30:40

**Tabuľka 5: Elučný gradient MF II, SF Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>**

Start %B	End %B	min	s
98	98	10	0
98	95	0	5
95	95	10	0
95	90	0	5
90	90	10	0
90	80	0	5
80	80	10	0
80	60	0	5
60	60	10	0
60	40	0	5
40	40	10	0
40	0	0	5
0	0	10	0

Total Time: 01:10:30

### 5.5.3. Flash chromatografia na SiO<sub>2</sub>

Po vykonaní bio-guided assay, tj. zistení biologických aktivít jednotlivých spojených frakcií z delenia na Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, sa podľa miery aktivít určilo, ktoré zo 7 frakcií sa majú podrobiť ďalšiemu deleniu (tab. 6).

**Tabuľka 6: Inhibičné aktivity spojených frakcií flash HPLC delenia na Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>**

Frakcie	Spojené frakcie	% inhibícia BChE (50 µg/ml)
1	1-23 (LB+EtOAc), 2540 mg	39,40 ± 0,37
2	24-47 (LB+EtOAc), 3210 mg	63,09 ± 0,95
3	48-73 (LB+EtOAc) + 1-14 (EtOAc+MeOH), 810 mg	64,47 ± 1,54
4	15-48 (EtOAc+MeOH), 530 mg	84,90 ± 0,56
5	49-56 (EtOAc+MeOH) 100 mg	57,82 ± 1,16
6	57-81 (EtOAc+MeOH), 88 mg	82,00 ± 0,94
7	elúcia kolóny (112 mg)	70,22 ± 0,33

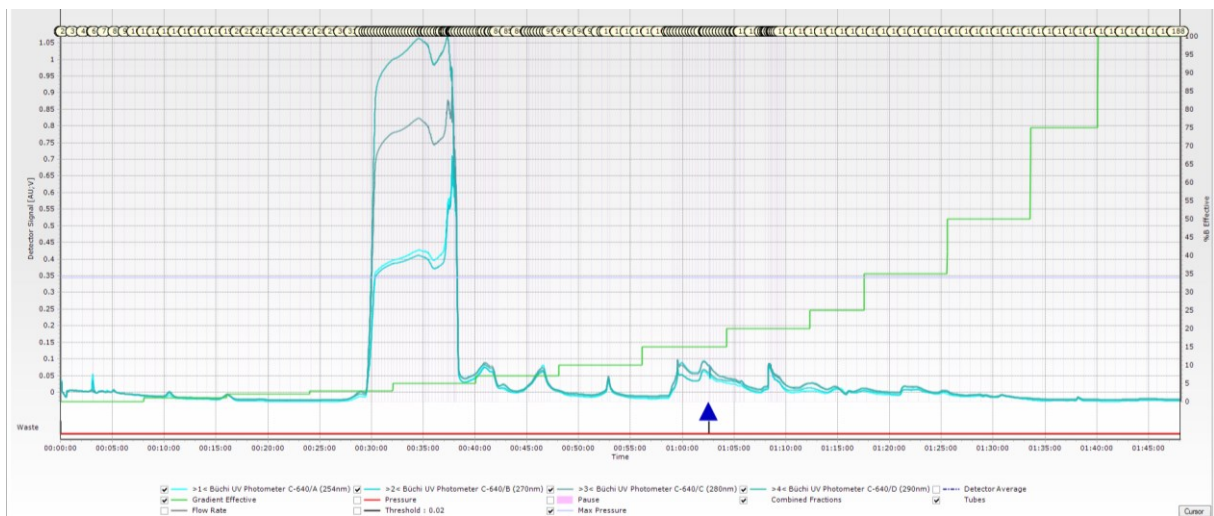
Najaktívnejšie, polárnejšie frakcie 4–7 sa preto spojili (spolu 830 mg) a delili na stacionárnej fáze (SF) silikagéli 60 15 µm (25 g), v sklenenej kolóne o rozmeroch 15 × 250 mm, deaktivovaným 25 % vody. Kondicionovanie kolóny prebiehalo 3-násobkom kolónového objemu CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> pri prietoku 10 ml/min. Delenie alkaloidov sa vykonávalo z rozteru (1,6 g) adjustovaného do predkolóny 15 × 125 mm. Separácia prebiehala z prv mobilnou fázou 100 % CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, ku ktorému bol postupne skokovito pridávaný MeOH s 0,1 % NH<sub>4</sub>OH, gradientom

podľa tab. 7, pri prietoku 10 ml/min, po dobu 1 hod. 50 min. Získavanie frakcií v píkoch, začínajúc od ich miním bolo po 3 ml, medzi píkmí po 10 ml. UV detekcia v chromatografickom systéme bola nastavená na 254 nm, 270, 280 a 290 nm. Delením vzniklo 188 prvotných frakcií. Frakcie obsahujúce totožné alkaloidy sa podobne, ako v predošlom prípade po detekciách na chromatograme, a vykonaní a vyhodnotení TLC analýzy (silikagél 60 F<sub>254</sub>, vyvíjajúca zmes S2, počet vyvíjaní 1x, detekcia UV + Dragendorff. č.) spojili do spojených frakcií, obsahujúcich jednotlivé alkaloidy. Týmto spôsobom sa získalo 10 frakcií (obr. 4).

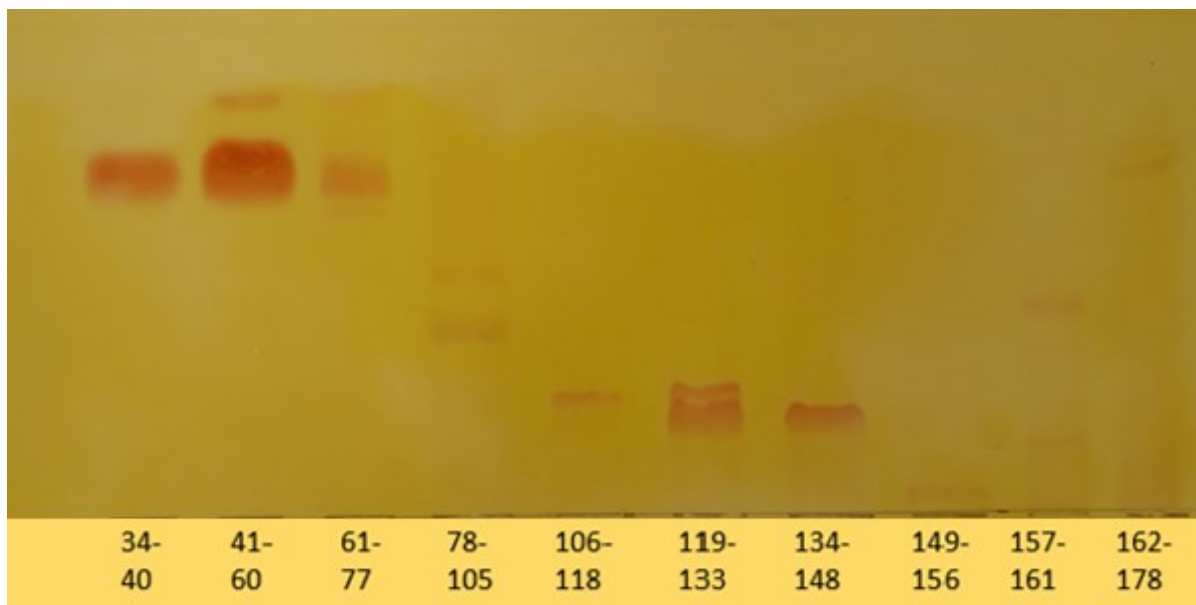
**Tabuľka 7: Elučný gradient, SF SiO<sub>2</sub>**

Start %B	End %B	min	s
0	0	8	0
0	1	0	1
1	1	8	0
1	2	0	1
2	2	8	0
2	3	0	1
3	3	8	0
3	5	0	1
5	5	8	0
5	7	0	1
7	7	8	0
7	10	0	1
10	10	8	0
10	15	0	1
15	15	8	0
15	20	0	1
20	20	8	0
20	25	0	1
25	25	8	0
25	35	0	1
35	35	8	0
35	50	0	1
50	50	8	0
50	75	0	1
75	75	8	0
75	100	0	1
100	100	8	0

Total Time: 01:52:13



**Obrázok 3: Chromatogram priebehu flash separácie na SiO<sub>2</sub> 60 15 μm**



**Obrázok 4: 10 spojených frakcií získaných z delenia na SF SiO<sub>2</sub> 60 15 μm**

**Tabuľka 8: Hmotnosti 10 spojených frakcií z flash chromatografie (SiO<sub>2</sub> 60 15 µm)**

Frakcie	Spojené frakcie	Hmotnosť mg
1	34–40	94
2	41–60	345
3	61–77	122
4	78–105	62
5	106–118	14
6	119–133	17
7	134–148	12
8	149–156	36
9	157–161	20
10	162–178	107

#### 5.5.4. Izolácia alkaloidov zo spojenej frakcie 5, 6 a 7

Purifikácia frakcií 5 (14 mg) , 6 (17 mg) a 7 (12 mg) prebiehala celkovo na 5 preparatívnych, analytických TLC doskách SiO<sub>2</sub> 60 F<sub>254</sub> 20 × 10 cm, na dráhe 8,5 cm, vo vyvíjajúcej zmesi S3 s počtom vyvíjaní 2x. Po elúcii hlavných zón z frakcií 5 a 6 zmesou CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> + MeOH v pomere 1 : 1 , a odparení rozpúšťadiel bola získaná práškovitá, jemne ružová látka EG-1 (R<sub>f</sub> 0,3) 15 mg. Z frakcií 6 a 7 (R<sub>f</sub> 0,50) bola získaná biela, práškovitá látka EG-2 v množstve 10,3 mg.

## 5.6. Stanovenie biologickej aktivity alkaloidov

### 5.6.1. Meranie inhibície cholínesteráz

Meranie inhibície cholínesteráz bolo vykonané PharmDr. Danielou Hulcovou, Ph.D. (Katedra farmakognozie a farmaceutické botaniky), tieto merania neboli náplňou diplomovej práce. Podmienky pri meraní týchto biologických aktivít boli totožné s podmienkami popísanými v publikácii [107].

### 5.6.2. Meranie inhibície prolyloligopeptidázy

Meranie inhibície prolyloligopeptidázy bolo vykonané RNDr. Martinou Hrabínovou, Ph.D. (Univerzita Obrany, Hradec Králové). Určenie inhibície POP nebolo náplňou tejto diplomovej práce. Podmienky merania sú popísané v uvedenej práci [107].

### 5.6.3 Stanovenie cytotoxicity izolovaných látok

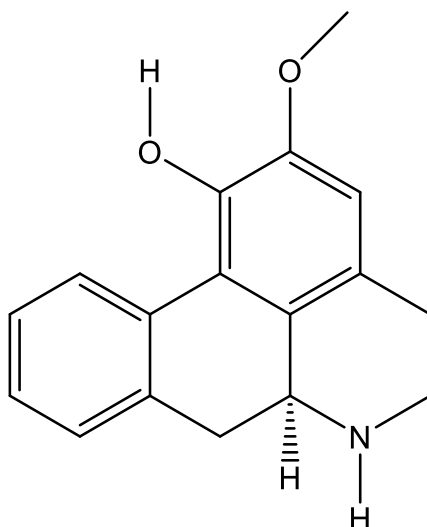
Aby bola látka využiteľná v terapii, musí sa preukázať, že nepôsobí cytotoxicky na zdravé bunky pacienta. Okrem zdravej bunkovej línie fibroblastov MRC-5 boli látky screeningovo testované aj na 9 druhoch nádorových línií pre zistenie, či látka nedisponuje cytotoxickými vlastnosťami. Testovanými nádorovými líniami boli: Jurkat, MOLT-4, A549, HT-29, PANC-1, A2780, SH-SY5Y, MCF-7 a SAOS-2. Bunkové línie boli vystavené testovanému (+)-kaverínu v koncentrácii 10  $\mu$ M po dobu 48 hodín. Pre značnú nestabilitu molekuly sa pred testovaním previedol na hydrobromid, čím sa zvýšila jeho stabilita. Jednotlivé merania boli vykonané trikrát, z výsledkov sa vypočítal priemer a smerodajná odchýlka. Samotný screening cytotoxicity nebol náplňou tejto diplomovej práce, stanovenie cytotoxicity bolo vykonané RNDr. Radimom Havelkom, Ph.D. (Lékařská fakulta UK, Ústav lékařské biochemie, Hradec Králové). Presný priebeh a podmienky screeningu opisuje uvedená práca [108].

## 6. VÝSLEDKY

### 6.1. Štruktúrna analýza

#### 6.1.1. (+)-Kaverín (EG-1)

Sumárny vzorec: C<sub>17</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>2</sub>.



Obrázok 5: Štruktúra (+)-kaverínu

- **NMR analýza**

Alkaloid bol identifikovaný na základe porovnaní spektier uvedených v literatúre [109].

- **ESI-MS**

ESI-MS [M + H]<sup>+</sup> *m/z* (%) = 268,4

- **GC-MS**

EI-MS *m/z* (%) = 267(56), 266(100), 265(9), 251(11), 250(14), 238(11), 237(7), 207(17)

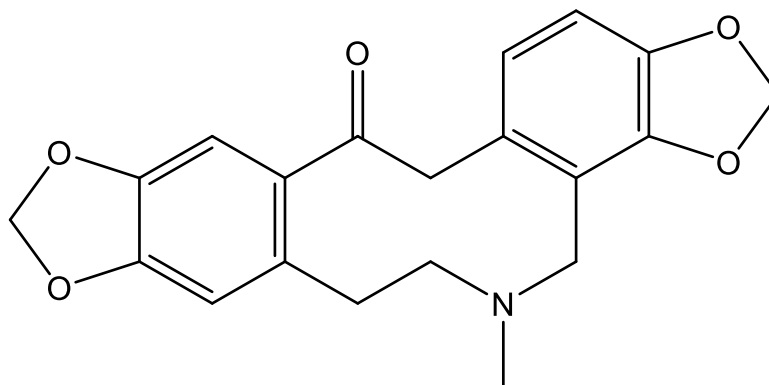
- **Optická otáčavosť**

$[\alpha]_D^{25} = +33^\circ$  (c = 0,10; MeOH)



### 6.1.2. Protopín (EG-2)

Sumárny vzorec: C<sub>20</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>5</sub>



Obrázok 6: Štruktúra protopínu

- **NMR analýza**

Alkaloid bol identifikovaný na základe porovnaní spektier uvedených v literatúre [54].

- **ESI-MS**

ESI-MS [M + H]<sup>+</sup> *m/z* (%) = 354,4

- **GC-MS**

EI-MS *m/z* (%) = 353, 281(5), 267(5), 207(5), 190(10), 163(20), 149(11), 148(100), 134(8), 91(8), 89(9)

- **Optická otáčavosť**

U EG-2 nebola meraná pre neprítomnosť chirálneho atómu v molekule.

## 6.2. Biologická aktivita izolovaných alkaloidov

U izolovaných alkaloidov sa merali inhibičné aktivity voči ľudskej AChE, BuChE a POP.

**Tabuľka 9: Inhibícia cholinesteráz a prolyloligopeptidázy, logBB**

Alkaloid	AChE (IC <sub>50</sub> μM)*	BuChE (IC <sub>50</sub> μM) *	POP (IC <sub>50</sub> μM) *	LogBB**
EG-1 ((+)-kaverín)	>100	4,09 ± 0,50	369 ± 15	0,372
EG-2 (protopín)	>100	>100	>1000	-
Huperzín A	33,0 ± 1,0 x 10 <sup>-3</sup>	>1000	-	-0,250
Rivastigmín	37,0 ± 1,00 x 10 <sup>-3</sup>	33,0 ± 0,3 x 10 <sup>-3</sup>	-	0,213
Berberín	0,71 ± 0,10	30,7 ± 3,5	142 ± 21	0,420

\* IC<sub>50</sub> – koncentrácia inhibítora, pri ktorej klesne aktivita enzýmu o 50 %; smerodajná odchýlka vypočítaná z troch nezávislých meraní v triplikáte; \*\* predikcia prechodu cez HEB, logBB: <http://www.way2drug.com/geb/>

### Screening cytotoxicity

Hodnoty uvedené v tabuľke reprezentujú bunkovú viabilitu po pôsobení látky po dobu 48 hodín, a sú vyjadrené v percentách vzťahujúcich sa ku kontrole (100 %). Bunky boli vystavované (+)-kaverínu v koncentrácii 10 μM a doxorubicínu 1 μM (štandard). Výsledky sú znázornené ako aritmetický priemer z troch nezávislých meraní ± smerodajná odchýlka.

**Tabuľka 10: Screening cytotoxicity (+)-kaverínu**

Bunkové línie	Kontrola	Kaverín (10 μM)*	DOX (1 μM)**
Jurkat	100	84 ± 7	2 ± 0
MOLT-4	100	93 ± 3	1 ± 1
A549	100	103 ± 6	12 ± 4
HT-29	100	97 ± 4	36 ± 2
PANC-1	100	103 ± 7	60 ± 11
A2780	100	93 ± 6	10 ± 9
SH-SY5Y	100	99 ± 4	8 ± 6
MCF-7	100	104 ± 2	31 ± 3
SAOS-2	100	89 ± 4	13 ± 1
MRC-5	100	104 ± 15	43 ± 13

\*aritmetický priemer z troch nezávislých meraní; \* štandard

## 7. DISKUSIA

Alkaloidy zo spojeného chloroformového výtrepku (9,97 g) boli separované na frakcie flash chromatografiou na dvoch rozdielnych adsorbentoch: najprv na neutrálnom  $\text{Al}_2\text{O}_3$  32-63  $\mu\text{m}$  (deaktivovaný prídavkom 6 % vody) a následne na silikagéli (15  $\mu\text{m}$ , deaktivovaný prídavkom 25 % vody). Pre flash chromatografiu sa používajú najčastejšie plne aktívne adsorbenty [110]. Pre separáciu bol vybraný najprv oxid hlinitý, lebo ide o polárny adsorbent, avšak je menej polárny než silikagél. Deaktivácia prídavkom vody bola vykonaná z dôvodu, že spojená frakcia 4–7 obsahovala podľa elučnej sily rozpúšťadiel stredne polárne, až polárnejšie alkaloidy (tab. 6.). Na základe vykonanej purifikácie flash chromatografiou na vyššie zmienených adsorbentoch bola izolácia alkaloidov zameraná na frakcie, ktoré vykazovali najvyššiu percentuálnu inhibíciu BuChE (tab. 6, bio-guided esej). Bio-guided prístup predstavuje efektívny spôsob izolácie aktívnych molekúl [111]. Na základe získaných dát bola spojená frakcia 4–7 podrobená prep. TLC, ktorá viedla za použitia rôznych vyvíjajúcich zmesí k izolácii alkaloidu (+)-kaverínu a protopínu. Ich štruktúrna analýza bola vykonaná na základe použitia spektroskopických a spektrometrických metód (EI-MS, LC-MS, NMR, optickej otáčavosti).

Izolovaný alkaloid protopín je bežnou molekulou nachádzajúcou sa v čeľadi Papaveraceae [1,2]. Jeho inhibičná aktivita voči cholínesterázam a prolyloligopeptidáze už bola skúmaná [54]. Kým komerčne dostupnú AChE získanú z elektrického úhora v značnej miere inhibuje ( $\text{IC}_{50} = 16,1 \mu\text{M}$ ), voči ľudskému enzýmu je neaktívny ( $\text{IC}_{50} = 423 \pm 10 \mu\text{M}$ ) [112]. Podobne ako naše výsledky, aj literatúra potvrdzuje nevýznamnú aktivitu protopínu voči cholínesterázam a POP [54,112]. Druhý získaný alkaloid (+)-kaverín, doposiaľ nebol v skúmanej rastline *Papaver rhoeas* izolovaný, ani skúmaný ohľadom aktivít voči enzýmom týkajúcich sa AD. Z izolovaných alkaloidov preukázal voči hBuChE najvyššiu, výraznú inhibičnú aktivitu  $\text{IC}_{50} = 4,09 \pm 0,50 \mu\text{M}$ . V chloroformovom extrakte je zastúpený síce v malom množstve 15 mg, no ukázalo sa, že v celkovej rastline sa ho nachádza viac, keďže je významnejšie zastúpený aj v dietyléterovom extrakte [106]. Do budúca sa plánuje aj príprava jeho semisyntetických derivátov. Prítomnosť (+)-kaverínu bola skôr preukázaná v rastline *Liriodendron tulipifera* (ľaliovník tulipánokvetý) z čeľade Magnoliaceae [113]. Pozitívami

(+)-kaverínu je pravdepodobná ochota prestupovať HEB pasívnou difúziou, a tiež skutočnosť, že nevykazoval cytotoxicitu voči vybraným bunkám.

Cieľom výskumov zameraných na hľadanie inhibítorov cholínesteráz je nájsť molekulu, ktorá by súčasne mohla ovplyvniť aj ďalšie enzýmy s rolou v patogenéze AD, alebo nájsť inhibítory, ktoré majú významný inhibičný vplyv aj na BuChE. Keďže význam tohto enzýmu v priebehu progresie choroby postupne rastie, jej nové inhibítory by teoreticky mohli byť nádejnými substanciami aj v snahách nájsť látky, ktoré by boli prínosné aj u závažných foriem, pretože konvenčné liečivá typu inhibítorov cholínesteráz sú zatiaľ prínosné iba v miernych až stredne ťažkých štádiách ochorenia. Keďže AD má komplexnú patogenézu, bolo by racionálne využívať liečivá, ktoré by boli schopné ovplyvniť viac patologických dejov súčasne (tzv. multi-target directed ligands). Preto sa izolované látky testovali aj na aktivitu voči POP, ktorá sa u (+)-kaverínu ukázala byť miernou  $IC_{50} = 369 \pm 15$  v porovnaní so štandardom – berberínom ( $IC_{50} = 142 \pm 21$ ), protopín sa ukázal byť neaktívnym  $IC_{50} > 1000$ . Inhibícia aj samotnej BuChE je z hľadiska multi-targetingového prístupu zaujímavá, keďže okrem zvýšenia cholínergnej transmisie priaznivo zasahuje aj do dejov spojených s ukladaním patologických A $\beta$  a štiepenia ďalších neuroaktívnych peptidov. Navyše je BuChE spojkou medzi patogenézou Alzheimerovej choroby a diabetom mellitom II. typu (DM II), a pozoruhodným je aj fakt, že tieto dve civilizačné ochorenia sa často vyskytujú u pacientov súbežne [6].

Berúc do úvahy významnosť BuChE v patogenéze AD (ale i DM II.), výraznú inhibičnú aktivitu izolovaného alkaloidu (+)-kaverínu k tomuto enzýmu, jeho netoxicitu, a pravdepodobnú schopnosť pasívnej difúzie cez HEB, sa táto látka javí byť perspektívna pre ďalšie štúdium.

## 8. ZÁVER

Z maku vlčieho (*Papaver rhoeas*) v rámci tejto práce boli izolované a identifikované 2 izochinolínové alkaloidy, menovite: (+)-kaverín a protopín, z ktorých (+)-kaverín doposiaľ v maku vlčom nebol identifikovaný. (+)-Kaverín doposiaľ tiež nebol testovaný na aktivitu voči enzýmom týkajúcich sa Alzheimerovej choroby. (+)-kaverín vykazuje výraznú selektívnu inhibičnú aktivitu voči *h*BuChE ( $IC_{50} = 4,09 \pm 0,50 \mu M$ ). Inhibičná aktivita (+)-kaverínu voči POP je mierna ( $IC_{50} = 369 \pm 15 \mu M$ ). Protopín nevykazoval významnú inhibičnú aktivitu ani k jednému zo sledovaných enzýmov ( $IC_{50} > 100 \mu M$ , resp.  $IC_{50} > 1000 \mu M$  u POP).

## 9. ABSTRAKT

Gergely, E.: Alkaloidy *Papaver rhoeas* L. (Papaveraceae) a ich biologická aktivita vzťahujúca sa na Alzheimerovu chorobu IV. Diplomová práca, Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra farmakognózie a farmaceutické botaniky, Hradec Králové 2022, počet strán 61.

Spojený chloroformový alkaloidový extrakt vňate *Papaver rhoeas* L. (Papaveraceae) vykazoval významnú inhibičnú aktivitu voči ľudskej butyrylcholinesteráze ( $IC_{50}hBuChE = 3,94 \pm 0,35 \mu\text{g/ml}$ ) [7,8]. *hBuChE* je jedným z kľúčových enzýmov hrajúcich rolu v patogenéze Alzheimerovej choroby. Hlavnými cieľmi tejto práce bola izolácia čistých alkaloidov pomocou tzv. bio-guided assay, využitím flash chromatografie a preparatívnej TLC, objasnenie ich štruktúr (pomocou MS, NMR a optickou otáčavosťou) a určenie ich biologickej aktivity pomocou Ellmanovej spektrofotometrickej metódy. Bola vypočítaná pravdepodobnosť prechodu izolovaných molekúl cez hematoencefalickú bariéru (HEB) pomocou  $\log BB$ . Potenciálna cytotoxicita najaktívnejšej molekuly bola preverená na deviatich rakovinových bunkových líniiach a jednej nerakovinovej línii MRC-5. Izolovaný identifikovaný alkaloid (+)-kaverín vykazoval sľubnú selektívnu inhibičnú aktivitu voči *hBuChE* ( $IC_{50}hBuChE = 4,09 \pm 0,50 \mu\text{M}$  a  $IC_{50}hAChE > 100 \mu\text{M}$ ) a mal by ochotne prechádzať pasívnou difúziou cez HEB ( $\log BB = 0,372$ ). Skúmaná zlúčenina nevykazovala žiaden cytotoxický efekt voči vybraným nádorovým líniiach a jednej kontrolnej nenádorovej bunkovej línii ( $IC_{50}$  hodnoty  $> 10 \mu\text{M}$ ). Ďalší izolovaný alkaloid, protopín nepreukázal významnú inhibičnú aktivitu ani k jednému zo sledovaných enzýmov.

## 10. ABSTRACT

Gergely, E.: Alkaloids of *Papaver rhoeas* L. (Papaveraceae) and their biological activity related to Alzheimer's disease IV. Diploma thesis, Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Department of Pharmacognosy and Pharmaceutical Botany, Hradec Králové 2022, 61 pages.

A chloroform alkaloid extract of aerial parts of *Papaver rhoeas* L. (Papaveraceae) showed a significant inhibitory activity on human butyrylcholinesterase ( $IC_{50}hBuChE = 3,94 \pm 0,35 \mu\text{g/ml}$ ) [7,8]. *hBuChE* represents a key enzyme playing an important role in the pathogenesis of Alzheimer's disease. The main aim of this study was to isolate pure alkaloids by bio-guided assay using flash chromatography and preparative TLC, elucidate their structures (MS, NMR, and optical rotation) and cholinesterase inhibitory activity with Ellman's spectrophotometric method. Prediction of possibility of the molecules' crossing through blood-brain barrier (BBB) via  $\log_{BB}$  was calculated. Potential non-cytotoxicity of the most active compound was screened on selected nine cancer cell lines and one non-cancer cell line MRC-5. The identified isolated alkaloid (+)-caaverine showed a promising and selective *hBuChE* inhibition ( $IC_{50}hBuChE = 4,09 \pm 0,50 \mu\text{M}$  and  $IC_{50}hAChE > 100 \mu\text{M}$ , respectively) and should be able to cross the BBB ( $\log_{BB} = 0,372$ ) by passive diffusion. Finally, the compound had no cytotoxic effect against the tested cancerous cell lines, nor against the control non-cancerous cell line ( $IC_{50}$  values  $> 10 \mu\text{M}$ ). The other isolated alkaloid, protopine did not show any significant inhibitory activity against the tested enzymes.

## 11. ZDROJE

1. Spilková, J.; Martin, J.; Siatka, T.; Tůmová, L.; Kašparová, M. *Farmakognozie*; Charles University in Prague, Karolinum Press, 2016; ISBN 978-80-246-3264-3.
2. Nagy, M.; Mučaji, P.; Grančai, D. *Farmakognózia*; Herba, 2017; ISBN 978-80-89631-64-3.
3. Mesulam, M.M.; Geula, C. Butyrylcholinesterase Reactivity Differentiates the Amyloid Plaques of Aging from Those of Dementia. *Ann. Neurol.* **1994**, *36*, 722–727, doi:10.1002/ana.410360506.
4. Guillozet, A.L.; Smiley, J.F.; Mash, D.C.; Mesulam, M.M. Butyrylcholinesterase in the Life Cycle of Amyloid Plaques. *Ann. Neurol.* **1997**, *42*, 909–918, doi:10.1002/ana.410420613.
5. Greig, N.; Shaw, K.; Yu, Q.-S.; Holloway, H.; Utsuki, T.; Soncrant, T.; Ingram, D.; Brossi, A.; Giordano, A.; Powers, G.; et al. Agents Useful for Reducing Amyloid Precursor Protein and Treating Dementia and Methods of Use Thereof 2014.
6. Allam, A.R.; Sridhar, G.R.; Thota, H.; Suresh Babu, C.; Siva Prasad, A.; Divakar, C. Alzheimer's Disease and Type 2 Diabetes Mellitus: The Cholinesterase Connection? *Lipids Health Dis.* **2006**, *5*, 28, doi:10.1186/1476-511X-5-28.
7. Bulvová, L. Alkaloidy Papaver rhoeas L. (Papaveraceae) a jejich biologická aktivita vztažená k Alzheimerově chorobě I. Diplomová práce, Univerzita Karlova: Hradec Králové, 2017.
8. Čakurdová, M. Alkaloidy Papaver rhoeas L. (Papaveraceae) a jejich biologická aktivita vztažená k Alzheimerově chorobě II. Diplomová práce, Univerzita Karlova: Hradec Králové, 2017.
9. *2022 Alzheimer's Disease Facts and Figures; Special Report*; Alzheimers Dement 2022;18; Alzheimer's Association: Chicago, 2022; p. 118;.
10. Global Dementia Cases Forecasted to Triple by 2050 | AAIC 2021 Available online: [//www.alz.org/aaic/releases\\_2021/global-prevalence.asp](http://www.alz.org/aaic/releases_2021/global-prevalence.asp) (accessed on 24 March 2022).
11. Callone, P.R.; Kudlacek, C.; Vasiloff, B.C.; Manternach, J.; Brumback, R.A. *Alzheimer's Disease 300 Tips for Making Life Easier*; Demos Medical Publishing: NY 10016, USA, 2006; ISBN 978-80-247-2320-4.
12. Vassar, R.; Bennett, B.D.; Babu-Khan, S.; Kahn, S.; Mendiaz, E.A.; Denis, P.; Teplow, D.B.; Ross, S.; Amarante, P.; Loeloff, R.; et al.  $\beta$ -Secretase Cleavage of Alzheimer's Amyloid Precursor Protein by the Transmembrane Aspartic Protease BACE. *Science* **1999**, doi:10.1126/science.286.5440.735.
13. Gmitterová, Mud.K. *ANALÝZA MOZGOVOMIEŠNEHO MOKU V DIAGNOSTIKE NEURODEGENERATÍVNYCH OCHORENÍ*; 1. vydanie, publikované online.; Univerzita Komenského v Bratislave, Vydavateľstvo UK, 2018; ISBN 978-80-223-4595-8.
14. Rosa-Neto, P.; Hsiung, G.-Y.; Masellis, M.; CCTD4 participants Fluid Biomarkers for Diagnosing Dementia: Rationale and the Canadian Consensus on Diagnosis and Treatment of Dementia Recommendations for Canadian Physicians. *Alzheimers Res. Ther.* **2013**, *5*, S8, doi:10.1186/alzrt223.
15. Pike, C.J.; Burdick, D.; Walencewicz, A.J.; Glabe, C.G.; Cotman, C.W. Neurodegeneration Induced by Beta-Amyloid Peptides in Vitro: The Role of Peptide Assembly State. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **1993**, *13*, 1676–1687.
16. Tamagno, E.; Bardini, P.; Guglielmotto, M.; Danni, O.; Tabaton, M. The Various Aggregation States of Beta-Amyloid 1-42 Mediate Different Effects on Oxidative Stress, Neurodegeneration, and BACE-1 Expression. *Free Radic. Biol. Med.* **2006**, *41*, 202–212, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2006.01.021.
17. Zheng, W.-H.; Bastianetto, S.; Mennicken, F.; Ma, W.; Kar, S. Amyloid  $\beta$  Peptide Induces Tau Phosphorylation and Loss of Cholinergic Neurons in Rat Primary Septal Cultures. *Neuroscience* **2002**, *115*, 201–211, doi:10.1016/S0306-4522(02)00404-9.
18. Králová, M. *Demencie*; Univerzita Komenského Bratislava: Bratislava, 2017; ISBN 978-80-223-4307-7.
19. Pan, X.; Zhu, Y.; Lin, N.; Zhang, J.; Ye, Q.; Huang, H.; Chen, X. Microglial Phagocytosis Induced by Fibrillar  $\beta$ -Amyloid Is Attenuated by Oligomeric  $\beta$ -Amyloid: Implications for Alzheimer's Disease. *Mol. Neurodegener.* **2011**, *6*, 45, doi:10.1186/1750-1326-6-45.



20. Yan, S.D.; Chen, X.; Fu, J.; Chen, M.; Zhu, H.; Roher, A.; Slattery, T.; Zhao, L.; Nagashima, M.; Morser, J.; et al. RAGE and Amyloid-Beta Peptide Neurotoxicity in Alzheimer's Disease. *Nature* **1996**, *382*, 685–691, doi:10.1038/382685a0.
21. Lipton, S.A. Paradigm Shift in NMDA Receptor Antagonist Drug Development: Molecular Mechanism of Uncompetitive Inhibition by Memantine in the Treatment of Alzheimer's Disease and Other Neurologic Disorders. *J. Alzheimers Dis. JAD* **2004**, *6*, S61-74, doi:10.3233/jad-2004-6s610.
22. Harkany, T.; Abrahám, I.; Timmerman, W.; Laskay, G.; Tóth, B.; Sasvári, M.; Kónya, C.; Sebens, J.B.; Korf, J.; Nyakas, C.; et al. Beta-Amyloid Neurotoxicity Is Mediated by a Glutamate-Triggered Excitotoxic Cascade in Rat Nucleus Basalis. *Eur. J. Neurosci.* **2000**, *12*, 2735–2745, doi:10.1046/j.1460-9568.2000.00164.x.
23. Hasselmo, M.E. The Role of Acetylcholine in Learning and Memory. *Curr. Opin. Neurobiol.* **2006**, *16*, 710–715, doi:10.1016/j.conb.2006.09.002.
24. Ferreira-Vieira, T.H.; Guimaraes, I.M.; Silva, F.R.; Ribeiro, F.M. Alzheimer's Disease: Targeting the Cholinergic System. *Curr. Neuropharmacol.* **2016**, *14*, 101–115, doi:10.2174/1570159X13666150716165726.
25. Perry, E.K.; Tomlinson, B.E.; Blessed, G.; Bergmann, K.; Gibson, P.H.; Perry, R.H. Correlation of Cholinergic Abnormalities with Senile Plaques and Mental Test Scores in Senile Dementia. *Br. Med. J.* **1978**, *2*, 1457–1459.
26. Chami, L.; Checler, F. BACE1 Is at the Crossroad of a Toxic Vicious Cycle Involving Cellular Stress and  $\beta$ -Amyloid Production in Alzheimer's Disease. *Mol. Neurodegener.* **2012**, *7*, 52, doi:10.1186/1750-1326-7-52.
27. Hanger, D.P.; Hughes, K.; Woodgett, J.R.; Brion, J.P.; Anderton, B.H. Glycogen Synthase Kinase-3 Induces Alzheimer's Disease-like Phosphorylation of Tau: Generation of Paired Helical Filament Epitopes and Neuronal Localisation of the Kinase. *Neurosci. Lett.* **1992**, *147*, 58–62, doi:10.1016/0304-3940(92)90774-2.
28. Zhu, X.; Lee, H.; Raina, A.K.; Perry, G.; Smith, M.A. The Role of Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways in Alzheimer's Disease. *Neurosignals* **2002**, *11*, 270–281, doi:10.1159/000067426.
29. Raina, A.K.; Zhu, X.; Rottkamp, C.A.; Monteiro, M.; Takeda, A.; Smith, M.A. Cyclin' toward Dementia: Cell Cycle Abnormalities and Abortive Oncogenesis in Alzheimer Disease. *J. Neurosci. Res.* **2000**, *61*, 128–133, doi:10.1002/1097-4547(20000715)61:2<128::AID-JNR2>3.0.CO;2-H.
30. Reynolds, C.H.; Betts, J.C.; Blackstock, W.P.; Nebreda, A.R.; Anderton, B.H. Phosphorylation Sites on Tau Identified by Nano-electrospray Mass Spectrometry: Differences in Vitro between the Mitogen-Activated Protein Kinases ERK2, c-Jun N-Terminal Kinase and P38, and Glycogen Synthase Kinase-3beta. *J. Neurochem.* **2000**, *74*, 1587–1595, doi:10.1046/j.1471-4159.2000.0741587.x.
31. Phiel, C.J.; Wilson, C.A.; Lee, V.M.-Y.; Klein, P.S. GSK-3 $\alpha$  Regulates Production of Alzheimer's Disease Amyloid- $\beta$  Peptides. *Nature* **2003**, *423*, 435–439, doi:10.1038/nature01640.
32. Wilson, J.; Hayes, M.; Carney, B. Angiotensin-I-Converting Enzyme and Prolyl Endopeptidase Inhibitory Peptides from Natural Sources with a Focus on Marine Processing by-Products. *Food Chem.* **2011**, *129*, 235–244, doi:10.1016/j.foodchem.2011.04.081.
33. Shinoda, M.; Toide, K.; Ohsawa, I.; Kohsaka, S. Specific Inhibitor for Prolyl Endopeptidase Suppresses the Generation of Amyloid Beta Protein in NG108-15 Cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1997**, *235*, 641–645, doi:10.1006/bbrc.1997.6730.
34. Raber, J.; Huang, Y.; Ashford, J.W. ApoE Genotype Accounts for the Vast Majority of AD Risk and AD Pathology. *Neurobiol. Aging* **2004**, *25*, 641–650, doi:10.1016/j.neurobiolaging.2003.12.023.
35. Wiseman, F.K.; Pulford, L.J.; Barkus, C.; Liao, F.; Portelius, E.; Webb, R.; Chávez-Gutiérrez, L.; Cleverley, K.; Noy, S.; Sheppard, O.; et al. Trisomy of Human Chromosome 21 Enhances Amyloid- $\beta$  Deposition Independently of an Extra Copy of APP. *Brain* **2018**, *141*, 2457–2474, doi:10.1093/brain/awy159.
36. Kamran, M.; Kousar, R.; Ullah, S.; Khan, S.; Umer, M.F.; Rashid, H.U.; Khan, Z.; Khattak, M.I.K.; Rehman, M.U. Taxonomic Distribution of Medicinal Plants for Alzheimer's Disease: A Cue to Novel Drugs. *Int. J. Alzheimerx2019s Dis.* **2020**, *2020*, e7603015, doi:10.1155/2020/7603015.

37. BUCKINGHAM, L. Aduhelm: Pending EC Decision Available online: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/summaries-opinion/aduhelm> (accessed on 8 January 2022).
38. Research, C. for D.E. and Aducanumab (Marketed as Aduhelm) Information. *FDA* **2021**.
39. Chlebek, J.; Korabecny, J.; Dolezal, R.; Stepankova, S.; Perez, D.I.; Hostalkova, A.; Opletal, L.; Cahlikova, L.; Macakova, K.; Kucera, T.; et al. In Vitro and In Silico Acetylcholinesterase Inhibitory Activity of Thalictricavine and Canadine and Their Predicted Penetration across the Blood-Brain Barrier. *Molecules* **2019**, *24*, 1340, doi:10.3390/molecules24071340.
40. Muehlbacher, M.; Spitzer, G.M.; Liedl, K.R.; Kornhuber, J. Qualitative Prediction of Blood–Brain Barrier Permeability on a Large and Refined Dataset. *J. Comput. Aided Mol. Des.* **2011**, *25*, 1095–1106, doi:10.1007/s10822-011-9478-1.
41. Abraham, M.H.; Takács-Novák, K.; Mitchell, R.C. On the Partition of Ampholytes: Application to Blood–Brain Distribution. *J. Pharm. Sci.* **1997**, *86*, 310–315, doi:10.1021/js960328j.
42. Hosoya, K.; Yamamoto, A.; Akanuma, S.; Tachikawa, M. Lipophilicity and Transporter Influence on Blood-Retinal Barrier Permeability: A Comparison with Blood-Brain Barrier Permeability. *Pharm. Res.* **2010**, *27*, 2715–2724, doi:10.1007/s11095-010-0272-x.
43. Gaohua, L.; Miao, X.; Dou, L. Crosstalk of Physiological PH and Chemical PKa under the Umbrella of Physiologically Based Pharmacokinetic Modeling of Drug Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion, and Toxicity. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **2021**, *17*, 1103–1124, doi:10.1080/17425255.2021.1951223.
44. Taylor, P.; Radic, Z. The Cholinesterases: From Genes to Proteins. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **1994**, *34*, 281–320, doi:10.1146/annurev.pa.34.040194.001433.
45. Darvesh, S.; Kumar, R.; Roberts, S.; Walsh, R.; Martin, E. Butyrylcholinesterase-Mediated Enhancement of the Enzymatic Activity of Trypsin. *Cell. Mol. Neurobiol.* **2001**, *21*, 285–296, doi:10.1023/A:1010947205224.
46. Chlebek, J.; Macakova, K.; Cahlikova, L.; Kurfuerst, M.; Kunes, J.; Opletal, L. Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase Inhibitory Compounds from *Corydalis Cava* (Fumariaceae). *Nat. Prod. Commun.* **2011**, *6*, 607–610.
47. Application of BACE1 Immobilized Enzyme Reactor for the Characterization of Multifunctional Alkaloids from *Corydalis Cava* (Fumariaceae) as Alzheimer’s Disease Targets. *Fitoterapia* **2016**, *109*, 241–247, doi:10.1016/j.fitote.2016.01.008.
48. Zhang, J.; Zhang, C.; Xu, F.-C.; Quesheng, null; Zhang, Q.-Y.; Tu, P.-F.; Liang, H. Cholinesterase Inhibitory Isoquinoline Alkaloids from *Corydalis Mucronifera*. *Phytochemistry* **2019**, *159*, 199–207, doi:10.1016/j.phytochem.2018.11.019.
49. Huang, Q.-Q.; Bi, J.-L.; Sun, Q.-Y.; Yang, F.-M.; Wang, Y.-H.; Tang, G.-H.; Zhao, F.-W.; Wang, H.; Xu, J.-J.; Kennelly, E.J.; et al. Bioactive Isoquinoline Alkaloids from *Corydalis Saxicola*. *Planta Med.* **2012**, *78*, 65–70, doi:10.1055/s-0031-1280126.
50. Xiao, H.-T.; Peng, J.; Liang, Y.; Yang, J.; Bai, X.; Hao, X.-Y.; Yang, F.-M.; Sun, Q.-Y. Acetylcholinesterase Inhibitors from *Corydalis Yanhusuo*. *Nat. Prod. Res.* **2011**, *25*, 1418–1422, doi:10.1080/14786410802496911.
51. Cahlíková, L.; Opletal, L.; Kurfürst, M.; Macáková, K.; Kulhánková, A.; Hošťálková, A. Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase Inhibitory Compounds from *Chelidonium Majus* (Papaveraceae). *Nat. Prod. Commun.* **2010**, *5*, 1934578X1000501, doi:10.1177/1934578X1000501110.
52. Tran, M.H.; Phuong, T.T.; Nguyen, T.N.; Nguyen, T.T.M.; Tran, L.Q.; Jae, S.Ch.; Mi, H.W.; Byung, S.M.; KiH, w. B. Cholinesterase Inhibitory Activities of Alkaloids from *Corydalis Tubert*. *Nat. Prod. Sci.* **2011**, *17*, 108–112.
53. WIJAYA, V.; KOHELOVÁ, E.; OPLETAL, L.; JENČO, J.; ŠAFRATOVA, M. PHYTOCHEMICAL INVESTIGATION OF THE DICRANOSTIGMA FRANCHETIANUM HOOK F. ET THOMSON (PAPAVERACEAE) HERB: PRELIMINARY STUDY.; (bez editora): online, Faculty of Pharmacy in Hradec Kralove, 28. 01 2021; p. PG10.

54. Chlebek, J.; Novák, Z.; Kassemová, D.; Šafratová, M.; Kostelník, J.; Malý, L.; Ločárek, M.; Opletal, L.; Hošťálková, A.; Hrabínová, M.; et al. Isoquinoline Alkaloids from *Fumaria Officinalis* L. and Their Biological Activities Related to *Alzheimer*'s Disease. *Chem. Biodivers.* **2016**, *13*, 91–99, doi:10.1002/cbdv.201500033.
55. Cahlíková, L.; Hulová, L.; Hrabínová, M.; Chlebek, J.; Hošťálková, A.; Adamcová, M.; Šafratová, M.; Jun, D.; Opletal, L.; Ločárek, M.; et al. Isoquinoline Alkaloids as Prolyl Oligopeptidase Inhibitors. *Fitoterapia* **2015**, *103*, 192–196, doi:10.1016/j.fitote.2015.04.004.
56. Pi, G.; Ren, P.; Yu, J.; Shi, R.; Yuan, Z.; Wang, C. Separation of Sanguinarine and Chelerythrine in *Macleaya Cordata* (Willd) R. Br. Based on Methyl Acrylate-Co-Divinylbenzene Macroporous Adsorbents. *J. Chromatogr. A* **2008**, *1192*, 17–24, doi:10.1016/j.chroma.2008.03.039.
57. Marasco, D.; Vicidomini, C.; Krupa, P.; Cioffi, F.; Huy, P.D.Q.; Li, M.S.; Florio, D.; Broersen, K.; De Pandis, M.F.; Roviello, G.N. Plant Isoquinoline Alkaloids as Potential Neurodrugs: A Comparative Study of the Effects of Benzo[c]Phenanthridine and Berberine-Based Compounds on  $\beta$ -Amyloid Aggregation. *Chem. Biol. Interact.* **2021**, *334*, 109300, doi:10.1016/j.cbi.2020.109300.
58. Brunhofer, G.; Fallarero, A.; Karlsson, D.; Batista-Gonzalez, A.; Shinde, P.; Gopi Mohan, C.; Vuorela, P. Exploration of Natural Compounds as Sources of New Bifunctional Scaffolds Targeting Cholinesterases and Beta Amyloid Aggregation: The Case of Chelerythrine. *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20*, 6669–6679, doi:10.1016/j.bmc.2012.09.040.
59. Miao, F.; Yang, X.-J.; Zhou, L.; Hu, H.-J.; Zheng, F.; Ding, X.-D.; Sun, D.-M.; Zhou, C.-D.; Sun, W. Structural Modification of Sanguinarine and Chelerythrine and Their Antibacterial Activity. *Nat. Prod. Res.* **2011**, *25*, 863–875, doi:10.1080/14786419.2010.482055.
60. Kresánek, J.; Krejča, J. *Atlas Liečivých Rastlín a Lesných Plodov*; 2.; Vydavateľstvo Osveta: Martin, 1982;
61. Dostál, J.; Červenka, M. *Veľký Kľúč Na Určovanie Vyšších Rastlín I*; Prvé vydanie.; Slovenské pedagogické nakladateľstvo: Bratislava, 1991; ISBN 80-08-00273-5.
62. Ujhelyi, P.; Molnár, V.A. *A Kárpát-Medence Gombái És Növényei*; Élővilág enciklopédia; Kossuth Kiadó: Budapest, 2006; ISBN 963-09-4851-6.
63. *Papaver Rhoëas and Papaver Dubium*. *Bot. Scotl.* 2020.
64. Çoban, İ.; Toplan, G.G.; Özbek, B.; Güreer, Ç.U.; Sariyar, G. Variation of Alkaloid Contents and Antimicrobial Activities of *Papaver Rhoëas* L. Growing in Turkey and Northern Cyprus. *Pharm. Biol.* **2017**, *55*, doi:http://dx.doi.org/10.1080/13880209.2017.1340964.
65. Morales, P.; Ferreira, I.C.F.R.; Carvalho, A.M.; Sánchez-Mata, M.C.; Cámara, M.; Fernández-Ruiz, V.; Pardo-de-Santayana, M.; Tardío, J. Mediterranean Non-Cultivated Vegetables as Dietary Sources of Compounds with Antioxidant and Biological Activity. *LWT - Food Sci. Technol.* **2014**, *55*, 389–396, doi:10.1016/j.lwt.2013.08.017.
66. Grauso, L.; Emrick, S.; Bonanomi, G.; Lanzotti, V. Metabolomics of the Alimurgic Plants *Taraxacum Officinale*, *Papaver Rhoëas* and *Urtica Dioica* by Combined NMR and GC-MS Analysis. *Phytochem. Anal. PCA* **2019**, *30*, 535–546, doi:10.1002/pca.2845.
67. Brosnan, J.T.; Brosnan, M.E. Glutamate: A Truly Functional Amino Acid. *Amino Acids* **2013**, *45*, 413–418, doi:10.1007/s00726-012-1280-4.
68. Trichopoulou, A.; Vasilopoulou, E.; Hollman, P.; Chamalides, Ch.; Foufa, E.; Kaloudis, Tr.; Kromhout, D.; Miskaki, Ph.; Petrochilou, I.; Poulima, E.; et al. Nutritional Composition and Flavonoid Content of Edible Wild Greens and Green Pies: A Potential Rich Source of Antioxidant Nutrients in the Mediterranean Diet. *Food Chem.* **2000**, *70*, 319–323, doi:10.1016/S0308-8146(00)00091-1.
69. Doğan, G.; Bağcı, E. Essential Oil Composition of *Papaver Rhoëas* L. (Corn Poppy) (*Papaveraceae*) from Turkey. 5.
70. Hajjaj, G.; A, B.; Sayah, K.; Cherrah, Y.; A, Z. Analgesic and Anti-Inflammatory Effects of *Papaver Rhoëas* L. A Traditional Medicinal Plant of Morocco. **2018**, *2*, doi:10.23880/jonam-16000150.
71. Oh, J.-H.; Ha, I.J.; Lee, M.Y.; Kim, E.-O.; Park, D.; Lee, J.-H.; Lee, S.-G.; Kim, D.-W.; Lee, T.-H.; Lee, E.-J.; et al. Identification and Metabolite Profiling of Alkaloids in Aerial Parts of *Papaver Rhoëas* by Liquid Chromatography Coupled with Quadrupole Time-of-Flight Tandem Mass Spectrometry. *J. Sep. Sci.* **2018**, *41*, 2517–2527, doi:10.1002/jssc.201701402.

72. Earle, F.R.; Jones, Q. Analyses of Seed Samples from 113 Plant Families. *Econ. Bot.* **1962**, *16*, 221–250, doi:10.1007/BF02860181.
73. Rey, J.-P.; Levesque, J.; Pousset, J.-L.; Roblot, F. Analytical Studies of Isorhoeadine and Rhoegenine in Petal Extracts of *Papaver Rhoëas* L. Using High-Performance Liquid Chromatography. *J. Chromatogr. A* **1992**, *596*, 276–280, doi:10.1016/0021-9673(92)85017-N.
74. Hakim, S.A.E.; Mijović, V.; Walker, J. Distribution of Certain Poppy-Fumaria Alkaloids and a Possible Link with the Incidence of Glaucoma. *Nature* **1961**, *189*, 198–201, doi:10.1038/189198a0.
75. Kalav, Y.; Sariyar, G. Alkaloids from Turkish *Papaver Rhoëas*. *Planta Med.* **1989**, *55*, 488–488, doi:10.1055/s-2006-962072.
76. El-Masry, S.; El-Ghazooly, M.; Omar, A.; Khafagy, S.; Phillipson, J. Alkaloids from Egyptian *Papaver Rhoëas*. *Planta Med.* **1981**, *41*, 61–64, doi:10.1055/s-2007-971675.
77. Hijazi, M.A.; Aboul-Ela, M.; Bouhadir, K.; Fatfat, M.; Khalife, H.; Ellakany, A.; Gali-Muhtasib, H. Cytotoxic Activity of Alkaloids from *Papaver Rhoëas* Growing in Lebanon. *Rec. Nat. Prod.* **2017**, *11*, 211–216.
78. *The Alkaloids: Chemistry and Pharmacology*; Academic Press, 1986; ISBN 978-0-08-086552-2.
79. Němečková, A.; Šantavý, F.; Walterová, D. Alkaloids of the *Papaveraceae*. LII. Alkaloids from Some Plant Species of the Section *Orthorhoeades*. *Collect. Czechoslov. Chem. Commun.* **1970**, *35*, 1733–1744, doi:10.1135/cccc19701733.
80. Slavik, J. Characterization of Alkaloids from the Roots of *Papaver Rhoëas* L. *Collect. Czechoslov. Chem. Commun.* **1978**, doi:https://doi.org/10.1135/cccc19780316.
81. Golkar-Narenji, A.; Eimani, H.; Samadi, F.; Hasani, S.; Shahverdi, A.-H.; Eftekhari-Yazdi, P.; Kamalinejad, M. Effect of *Papaver Rhoëas* Extract on in Vitro Maturation and Developmental Competence of Immature Mouse Oocytes. *Reprod. Med. Biol.* **2010**, *9*, 211–215.
82. Hillenbrand, M.; Zapp, J.; Becker, H. Depsides from the Petals of *Papaver Rhoëas*. *Planta Med.* **2004**, *70*, 380–382, doi:10.1055/s-2004-818956.
83. Saleh, N. a. M.; Maksoud, S.A.; N, E.H. didi M.; Amer, W.M.M. A Comparative Study of Flavonoids in Some Members of the *Papaveraceae*. *Biochem. Syst. Ecol.* **1987**, *15*, 673–676, doi:10.1016/0305-1978(87)90044-5.
84. Kültür, Ş. Medicinal Plants Used in Kırklareli Province (Turkey). *J. Ethnopharmacol.* **2007**, *111*, 341–364, doi:10.1016/j.jep.2006.11.035.
85. Mathianaki, K.; Tzatzarakis, M.; Karamanou, M. Poppies as a Sleep Aid for Infants: The “Hypnos” Remedy of Cretan Folk Medicine. *Toxicol. Rep.* **2021**, *8*, 1729–1733, doi:10.1016/j.toxrep.2021.10.002.
86. Bellakhdar, J.; Claisse, R.; Fleurentin, J.; Younos, C. Repertory of Standard Herbal Drugs in the Moroccan Pharmacopoea. *J. Ethnopharmacol.* **1991**, *35*, 123–143, doi:10.1016/0378-8741(91)90064-K.
87. Gürbüz, I.; Ustün, O.; Yesilada, E.; Sezik, E.; Kutsal, O. Anti-Ulcerogenic Activity of Some Plants Used as Folk Remedy in Turkey. *J. Ethnopharmacol.* **2003**, *88*, 93–97, doi:10.1016/s0378-8741(03)00174-0.
88. Pourmotabbed, A.; Rostamian, B.; Manouchehri, G.; Pirzadeh-Jahromi, G.; Sahraei, H.; Ghoshooni, H.; Zardooz, H.; Kamalnegad, M. Effects of *Papaver Rhoëas* Extract on the Expression and Development of Morphine-Dependence in Mice. *J. Ethnopharmacol.* **2004**, *95*, 431–435, doi:10.1016/j.jep.2004.08.022.
89. Ozcelik, H. The Names and Methods of Using Some Plants Which Are Growing Naturally in and around Akseki. *Turk. J. Bot.* **1987**, 316–321.
90. Łuczaj, Ł.; Dolina, K. A Hundred Years of Change in Wild Vegetable Use in Southern Herzegovina. *J. Ethnopharmacol.* **2015**, *166*, 297–304, doi:10.1016/j.jep.2015.02.033.
91. Łuczaj, Ł.; Zovkokončić, M.; Miličević, T.; Dolina, K.; Pandža, M. Wild Vegetable Mixes Sold in the Markets of Dalmatia (Southern Croatia). *J. Ethnobiol. Ethnomedicine* **2013**, *9*, 2, doi:10.1186/1746-4269-9-2.

92. Günaydın, Y.K.; Dündar, Z.D.; Çekmen, B.; Akıllı, N.B.; Köylü, R.; Cander, B. Intoxication Due to Papaver Rhoëas (Corn Poppy): Five Case Reports. *Case Rep. Med.* **2015**, *2015*, e321360, doi:10.1155/2015/321360.
93. Dénes, A.; Papp, N.; Babai, D.; Czúcz, B.; Molnár, Z. Wild Plants Used for Food by Hungarian Ethnic Groups Living in the Carpathian Basin. *Acta Soc. Bot. Pol.* **2012**, *81*, 381–396, doi:10.5586/asbp.2012.040.
94. Shams, J.; Sahraei, H.; Faghih-Monzavi, Z.; Salimi, S.; Fatemi, S.; Ali, P.; Ghoshooni, H.; Kamalinejad, M. Effects of Papaver Rhoëas Extract on the Tolerance Development to Analgesic Effects of Morphine in Mice. *Iran. J. Pharm. Res.* **2008**, *7*.
95. Cao, S.; Fisher, D.W.; Yu, T.; Dong, H. The Link between Chronic Pain and Alzheimer's Disease. *J. Neuroinflammation* **2019**, *16*, 204, doi:10.1186/s12974-019-1608-z.
96. Conforti, F.; Sosa, S.; Marrelli, M.; Menichini, F.; Statti, G.A.; Uzunov, D.; Tubaro, A.; Menichini, F. The Protective Ability of Mediterranean Dietary Plants against the Oxidative Damage: The Role of Radical Oxygen Species in Inflammation and the Polyphenol, Flavonoid and Sterol Contents. *Food Chem.* **2009**, *112*, 587–594, doi:10.1016/j.foodchem.2008.06.013.
97. Valiente, M.; D'Ocon, P.; Noguera, M.A.; Cassels, B.K.; Lugnier, C.; Ivorra, M.D. Vascular Activity of (-)-Anonaine, (-)-Roemerine and (-)-Pukateine, Three Natural 6a(R)-1,2-Methylenedioxyaporphines with Different Affinities for Alpha1-Adrenoceptor Subtypes. *Planta Med.* **2004**, *70*, 603–609, doi:10.1055/s-2004-827181.
98. Toda, N.; Okamura, T. Cerebral Blood Flow Regulation by Nitric Oxide in Alzheimer's Disease. *J. Alzheimers Dis. JAD* **2012**, *32*, 569–578, doi:10.3233/JAD-2012-120670.
99. Liu, Y.-Q.; He, G.-H.; Li, H.-L.; He, J.-C.; Feng, E.-F.; Bai, L.; Wang, C.-Y.; Xu, G.-L. Plasma Pharmacokinetics and Tissue Distribution Study of Roemerine in Rats by Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS). *J. Chromatogr. B* **2014**, *969*, 249–255, doi:10.1016/j.jchromb.2014.08.031.
100. Velickovic, J.M.; Mitic, S.S.; Mitic, M.N.; Zarubica, A.R.; Dordevic, A.S.; Randelovic, S.S.; Kostic, D.A. Phenolic Contents, Antioxidant and Antimicrobial Activity of Papaver Rhoëas L. Extracts from Southeast Serbia. *J. Med. Plants Res.* **2010**, 1727–1732, doi:10.5897/JMPR10.121.
101. Todorova, T.; Pesheva, M.; Gregan, F.; Chankova, S. Antioxidant, Antimutagenic, and Anticarcinogenic Effects of Papaver Rhoëas L. Extract on *Saccharomyces Cerevisiae*. *J. Med. Food* **2015**, *18*, 460–467, doi:10.1089/jmf.2014.0050.
102. Gateva, S.; Jovtchev, G.; Stankov, A.; Gregan, F. ANTIGENOTOXIC CAPACITY OF PAPAVER RHOËAS L. **2014**, *6*, 7.
103. Hosseini, A. The Effects of Alcoholic Extract of Red Poppy (Papaver Rhoëas) on Anxiety Induced by Elevated plus Maze and the Plasma Corticosterone Levels in Adult Male Wistar Rats (accessed on 22 November 2021).
104. Soulimani, R.; Younos, C.; Jarmouni-Idrissi, S.; Bousta, D.; Khalouki, F.; Laila, A. Behavioral and Pharmacotoxicological Study of Papaver Rhoëas L. in Mice. *J. Ethnopharmacol.* **2001**, *74*, 265–274, doi:10.1016/S0378-8741(00)00383-4.
105. Phillipson, J.D.; Roberts, M.F.; Zenk, M.H. *The Chemistry and Biology of Isoquinoline Alkaloids*; Springer Science & Business Media, 2012; ISBN 978-3-642-70128-3.
106. Víchová, S. Využití separačních technik ve fytochemické analýze. Diplomová práce, Univerzita Karlova: Hradec Králové, 2022.
107. Vrabec, R.; Maříková, J.; Ločárek, M.; Korábečný, J.; Hulcová, D.; Hošťálková, A.; Kuneš, J.; Chlebek, J.; Kučera, T.; Hrabínová, M.; et al. Monoterpene Indole Alkaloids from *Vinca Minor* L. (Apocynaceae): Identification of New Structural Scaffold for Treatment of Alzheimer's Disease. *Phytochemistry* **2022**, *194*, 113017, doi:10.1016/j.phytochem.2021.113017.
108. Breiterová, K.; Koutová, D.; Maříková, J.; Havelek, R.; Kuneš, J.; Majorošová, M.; Opletal, L.; Hošťálková, A.; Jenčo, J.; Řezáčová, M.; et al. Amaryllidaceae Alkaloids of Different Structural Types from *Narcissus* L. Cv. Professor Einstein and Their Cytotoxic Activity. *Plants* **2020**, *9*, 137, doi:10.3390/plants9020137.

109. Hatjimanoli, M.; Favre-Bonvin, J.; Kaouadji, M.; Mariotte, A.-M. Monohydroxy- and 2,5-Dihydroxy Terephthalic Acids, Two Unusual Phenolics Isolated from *Centaurium erythraea* and Identified in Other Gentianaceae Members. *J. Nat. Prod.* **1988**, *51*, 977–980, doi:10.1021/np50059a030.
110. Bickler, B. Why Does My Silica Flash Chromatography Column Get Hot? Available online: <https://selekt.biotage.com/blog/why-does-my-silica-flash-chromatography-column-get-hot> (accessed on 14 May 2022).
111. Cox, P.A. Pharmacology, Biodiversity And. In *Reference Module in Life Sciences*; Elsevier, 2021 ISBN 978-0-12-809633-8.
112. Vaněčková, N.; Hošťálková, A.; Šafratová, M.; Kuneš, J.; Hulcová, D.; Hrabínová, M.; Doskočil, I.; Štěpánková, Š.; Opletal, L.; Nováková, L.; et al. Isolation of Amaryllidaceae Alkaloids from *Nerine bowdenii* W. Watson and Their Biological Activities. *RSC Adv.* **2016**, *6*, 80114–80120, doi:10.1039/C6RA20205E.
113. Ziyaev, R.; Abdusamatov, A.; Yunusov, S.Yu. D-Caaverine and a New Alkaloid - Lirinidine — From *Liriodendron tulipifera*. *Chem. Nat. Compd.* **1973**, *9*, 727–729, doi:10.1007/BF00565796.