

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

---

## **DIPLOMOVÁ PRÁCA**

**Biologicky aktivní metabolity rostlin**

**4. Alkaloidy *Eschscholtzia californica* CHAM. a jejich biologická aktivita**

**Biologically active metabolites of plants**

**4. Alkaloids from *Eschscholtzia californica* CHAM. and their biological activity**

**Vedúci diplomovej práce: Ing. Lucie Cahlíková, Ph.D.**

**Hradec Králové, 2011**

**Lucia Bednaříková**

Prehlasujem, že táto diplomová práca je mojím pôvodným autorským dielom, ktoré som vypracovala samostatne. Všetka literatúra a ďalšie zdroje, z ktorých som pri spracovaní čerpala, sú uvedené v zozname použitej literatúry a v práci riadne citované.

Hradec Králové

Lucia Bednaříková

Táto diplomová práca vznikla v rámci projektu Špecifického vysokoškolského výzkumu SVV – 2011 – 263002.

Moje poďakovanie patrí Ing. Lucii Cahlíkovej Ph.D. za odborné vedenie, pomoc pri vypracovaní diplomovej práce, venovaný čas a za poskytnuté materiály. Ďakujem tiež Ing. Kateřine Macákovej za stanovenie biologických aktivít izolovaných látok, celej katedre Farmaceutickej botaniky a ekológie za príjemné pracovné prostredie a mojej rodine a priateľovi za psychickú pomoc a podporu.

# OBSAH

1.	Úvod.....	7
2.	Cieľ práce.....	10
3.	Teoretická časť .....	12
3.1.	<i>Eschscholtzia californica</i> CHAM. (Papaveraceae) .....	13
3.1.1.	Názvy .....	13
3.1.2.	Taxonomické zaradenie.....	13
3.1.3.	Morfologický popis .....	14
3.1.4.	Príbuzné rastliny.....	15
3.1.5.	Výskyt .....	15
3.1.6.	Droga – <i>Eschscholtziae herba</i> – vňať slncovky kalifornskej .....	15
3.1.7.	Použitie v ľudovom liečiteľstve .....	16
3.1.8.	Obsahové látky .....	16
3.1.8.1.	Ďalšie obsahové látky.....	16
3.2.	Izochinolínové alkaloidy izolované z <i>E. californica</i> .....	17
3.2.1.	Alkaloidy .....	17
3.2.2.	Izochinolínové alkaloidy .....	18
3.2.2.1.	Pavinanový typ.....	18
3.2.2.2.	Benzofenantridínový typ .....	20
3.2.2.3.	Aporfínový typ .....	21
3.2.2.4.	Protopínový typ .....	22
3.2.2.5.	Benzylizochinolínový typ .....	23
3.2.2.6.	Protoberberínový typ.....	24
3.2.2.7.	Morfinanový typ.....	25
3.3.	Metódy používané pri extrakcii a izolácii izochinolínových alkaloidov.....	25
3.4.	Biologická aktivita izochinolínových alkaloidov izolovaných z <i>E. californica</i> ..	26
3.4.1.	Inhibičná aktivita voči AChE a BuChE.....	27
3.4.2.	Antifungálna aktivita.....	27
3.4.3.	Sedatívny a anxiolytický účinok .....	28
3.4.4.	Inhibícia CYP 3A4 .....	29
3.5.	Alzheimerova choroba.....	29
3.5.1.	Definícia .....	29
3.5.2.	Patofyziológia.....	30
3.5.3.	Rizikové faktory .....	31
3.5.4.	Klinický obraz .....	31

3.5.5.	Terapia Alzheimerovej choroby .....	32
3.5.5.1.	Farmakoterapia kognitívnych funkcií .....	33
3.5.5.1.1.	Acetylcholinergný systém.....	33
3.5.5.1.2.	Glutamátergny systém .....	33
3.5.5.1.3.	Neurónový metabolizmus .....	34
3.5.5.1.4.	Ďalšie metódy farmakoterapie .....	34
3.5.5.2.	Farmakoterapia nekognitívnych funkcií.....	35
3.5.5.3.	Nefarmakologická liečba.....	36
4.	Experimentálna časť .....	37
4.1.	Všeobecné postupy .....	38
4.1.1.	Destilácia a odparovanie .....	38
4.1.2.	Chromatografia.....	38
4.1.2.1.	Tenkovrstvová chromatografia.....	38
4.1.2.2.	Stĺpcová chromatografia .....	38
4.2.	Materiál a vybavenie .....	38
4.2.1.	Rozpúšťadlá.....	38
4.2.2.	Chemikálie .....	39
4.2.3.	Chemikálie a materiál pre stanovenie účinku erytrocytarnej AChE a BuChE .....	39
4.2.3.1.	Chemikálie .....	39
4.2.3.2.	Materiál .....	39
4.2.4.	Chemikálie a materiál pre stanovenie antioxidačnej aktivity.....	39
4.2.5.	Prístroje použité pri stanovovaní biologických vlastností izolovaných látok	40
4.2.6.	Detekčné činidlá .....	40
4.2.7.	Chromatografické adsorbenty .....	40
4.2.8.	Vyvíjacia sústava pre analytickú tenkovrstvovú chromatografiu (TLC) .....	40
4.3.	Príprava a spracovanie chloroformového výtrepku J <sub>1</sub> z <i>E. californica</i> .....	41
4.3.1.	Pôvod drogy .....	41
4.3.2.	Príprava sumárneho extraktu a jednotlivých výtrepkov.....	41
4.3.2.1.	Príprava alkaloidného výtrepku J <sub>1</sub> .....	41
4.3.3.	Stĺpcová chromatografia výtrepku J <sub>1</sub> z <i>E. californica</i> .....	41
4.3.4.	Spracovanie frakcie č. 3 .....	43
4.3.5.	Spracovanie frakcie č. 38 .....	43
4.4.	Určenie štruktúry izolovaných látok.....	44
4.4.1.	Meranie hmotnostného spektra (MS).....	44
4.4.2.	Meranie NMR spektra.....	44
4.5.	Stanovenie inhibičnej aktivity alkaloidov voči erytrocytarnej AChE a sérovej BuChE.....	44

4.5.1.	Podmienky merania.....	44
4.5.2.	Príprava erytrocytárnych púzdiar.....	44
4.5.3.	Stanovenie inhibičnej aktivity ( hodnoty IC <sub>50</sub> ) .....	45
4.6.	Stanovenie antioxidačnej aktivity získaných alkaloidov.....	45
5.	Výsledky .....	46
5.1.	Štruktúrna analýza allokryptopínu .....	47
5.1.1.	MS štúdie allokryptopínu .....	47
5.1.2.	NMR štúdie allokryptopínu.....	48
5.1.2.1.	<sup>1</sup> H-NMR spektrum allokryptopínu.....	48
5.1.2.2.	<sup>13</sup> C-NMR spektrum allokryptopínu.....	49
5.2.	Štruktúrna analýza kalifornidínu .....	50
5.2.1.	MS štúdie kalifornidínu.....	50
5.2.2.	NMR štúdie kalifornidínu .....	52
5.2.2.1.	<sup>1</sup> H-NMR spektrum kalifornidínu .....	52
5.2.2.2.	<sup>13</sup> C-NMR spektrum kalifornidínu .....	53
5.3.	Inhibičná aktivita voči HuAChE a HuBuChE.....	53
5.4.	Antioxidačná aktivita.....	54
6.	Diskusia.....	55
7.	Literatúra .....	58
8.	Zoznam skratiek.....	64

# **1. ÚVOD**

Neustály rozvoj vedy a techniky, ktorý má za následok zvyšovanie životnej úrovne, zasahuje aj do oblasti medicíny. Lekári majú k dispozícii čoraz dokonalejšie diagnostické metódy a prístroje, uplatňujú nové terapeutické postupy a celková kvalita poskytovanej zdravotnej starostlivosti rastie. Výsledkom je pokles úmrtnosti v mladom veku a predĺženie priemernej dĺžky života, čo je pre ľudstvo bezpochyby obrovským prínosom. Netreba však zabúdať aj na odvrátenú a menej príjemnú stránku tejto problematiky. Vyšší vek obyvateľstva so sebou nesie aj riziko častejšieho rozvoja mnohých chorôb. Postihnutý je najmä kardiovaskulárny systém, pohybový aparát a vo zvýšenej miere dochádza k tvorbe zhubných novotvarov. S vyšším vekom sa spája tiež častejší rozvoj neurodegeneratívnych chorôb, predovšetkým Alzheimerovej, Parkinsonovej a Huntingtonovej choroby.

Alzheimerova choroba (AD) je progresívne atroficko-degeneratívne ochorenie mozgu postihujúce prevažne osoby nad 65 rokov, jej začiatok je však možný aj v nižšom veku. Prejavuje sa syndrómom demencie a je zodpovedná za 50 – 60 % demencií vôbec<sup>1</sup>. Narušené sú hlavne kognitívne funkcie, dochádza k poruche pamäti, reči, orientácie v priestore a čase. Pridružené bývajú aj poruchy nekognitívnych funkcií, ako sú úzkosť, depresia, poruchy spánku, agresivita či niektoré psychotické príznaky. V pokročilejších štádiách choroby stráca pacient schopnosť postarať sa sám o seba a stáva sa plne závislým od pomoci druhých<sup>2,3,4</sup>.

V súčasnej dobe neexistuje kauzálna liečba AD. Sme schopní spomaliť, prípadne na určitý čas pozastaviť rozvoj choroby, nie však ju úplne vyliečiť<sup>3</sup>. V liečbe sa uplatňujú dva základné terapeutické postupy, ktorých použitie je založené na dôkazoch. Jedným prístupom je ovplyvnenie cholinergného systému liečivami zo skupiny inhibítorov cholinesteráz. Dnes používanými látkami tejto skupiny sú donepezil, rivastigmín a galantamín, ktoré sú určené predovšetkým pre liečbu ľahkých až stredne ťažkých štádií. V pokročilejších fázach choroby sa uprednostňujú inhibítory glutamátových NMDA-receptorov, z ktorých dnes jedinou používanou látkou je memantín<sup>3</sup>.

Z dôvodu nemožnosti úplného vyliečenia tejto choroby, ako aj kvôli neustálemu rastu počtu pacientov trpiacich AD, sa výskum zameriava na vývoj nových liečiv aj v tejto oblasti. Zdrojom nových liečiv môže byť chemická syntéza, či už obmena existujúcich aktívnych molekúl alebo vývoj úplne nových štrukturálnych typov. Ďalšou možnosťou je izolácia látok z prírodného materiálu<sup>5</sup>. Už od pradávna sa využívali rastliny k liečbe rôznych ochorení. Postupom času sa ich liečivé účinky začali pripisovať látkam v nich obsiahnutým a tieto látky sa začali z rastlín izolovať.

Jedným z dôvodov návratu k izolácii látok z rastlín je významné terapeutické



uplatnenie galantamínu, alkaloidu získaného z cibuliek snežienky *Galanthus woronowii* Losinsk. (Amaryllidaceae) <sup>6</sup>. Galantamín ako dlho účinkujúci, selektívny, reverzibilný a kompetitívny inhibítor acetylcholinesterázy (AChE) preukázal pozitívny efekt na pamäťové funkcie u pacientov trpiacich AD <sup>7</sup>.

Medzi najvýznamnejšie biologicky aktívne obsahové látky rastlín patria alkaloidy. Sú to dusíkaté sekundárne metabolity bázického charakteru vznikajúce premenou aminokyselín a nachádzajúce sa v rôznych častiach rastlín <sup>8</sup>. Zastúpenie jednotlivých alkaloidov je v konkrétnych rastlinných čeľadiach a druhoch rôzne. Ale aj v rámci jedného druhu sa môžu vyskytovať rozdiely v zložení či pomernom zastúpení jednotlivých alkaloidov v závislosti od lokality, podnebia, zloženia pôdy a pod <sup>9</sup>.

Alkaloidy sa vyznačujú širokou škálou biologických účinkov, niektoré z nich vykazujú dokonca aj inhibičnú aktivitu voči acetylcholinesteráze a butyrylcholinesteráze, sú teda potenciálnymi liečivami v terapii AD a predmetom ďalšieho skúmania. Látky s touto aktivitou sa na základe štruktúry radia medzi izochinolínové alkaloidy a vyskytujú sa hlavne v čeľadiach Papaveraceae, Ranunculaceae, Fumariaceae, Rutaceae, Amaryllidaceae, Berberidaceae, Menispermaceae a iných <sup>10, 11, 12</sup>.

Jednou z rastlín, ktorých obsahové látky sú v súčasnej dobe predmetom štúdií, je okrasná rastlina *Eschscholtzia californica* z čeľade Papaveraceae.

Predmetom tejto práce je izolácia jednotlivých izochinolínových alkaloidov z tejto rastliny a príprava vzoriek na stanovenie ich biologickej aktivity (inhibícia cholinesteráz, antioxidačná aktivita).

## **2. CIEĽ PRÁCE**

Cieľ diplomovej práce:

1. Spracovanie alkaloidného výtrepku kvartérnych alkaloidov z *Eschscholtzia californica*.
2. Izolácia aspoň jedného alkaloidu v čistej forme.
3. Stanovenie základných fyzikálno-chemických charakteristík izolovaných alkaloidov.
4. Príprava vzoriek pre stanovenie biologických aktivít získaných alkaloidov (inhibičná aktivita na acetylcholinesterázu, butyrylcholinesterázu, antioxidačná aktivita).

### **3. TEORETICKÁ ČASŤ**

### 3.1. *Eschscholtzia californica* CHAM. (Papaveraceae)



Obr. 1: *Eschscholtzia californica* CHAM.<sup>13</sup>

#### 3.1.1. Názvy

Latinský:	<i>Eschscholtzia californica</i> CHAM.
Český:	Sluncovka kalifornská
Slovenský:	Slncovka kalifornská
Anglický:	California poppy <sup>14</sup>
Nemecký:	Kalifornisher Mohn <sup>14</sup>
Francúzsky:	Globe du soleil <sup>14</sup>

#### 3.1.2. Taxonomické zaradenie

Ríša:	Plantae (rastliny)
Podríša:	Tracheobionta (cievnaté rastliny)
Nadoddelenie:	Spermatophyta (semenné rastliny)
Oddelenie:	Magnoliophyta (magnóliorasty)
Trieda:	Magnoliopsida (magnólie)
Podtrieda:	Magnoliidae (magnóliové)
Rád:	Papaverales (makotvaré)

Čeľad': Papaveraceae (makovité)  
Rod: *Eschscholtzia* CHAM. (slncovka)  
Druh: *Eschscholtzia californica* CHAM. (slncovka kalifornská)<sup>15</sup>

### 3.1.3. Morfológický popis

*Eschscholtzia californica* je prevažne jednoročná, v teplejších oblastiach kratšie žijúca trváca rastlina dosahujúca výšky 5 - 60 cm. Stonka je priama, šedozelená, so striedavými nepárne perovito zloženými, nitkovito vykrojenými listami podobnej farby. Jednotlivé miskovité kvety vyrastajúce na dlhej stopke sú tvorené štyrmi korunnými lupienkami 2 – 6 cm dlhými a širokými, zlatožltej až oranžovej farby, na báze lupienku tmavšej; a dvoma kališnými lístkami. Plodom je podlhovastá, 3 – 9 cm dlhá pukavá tobolka, ktorá uvoľňuje množstvo malých okrúhlych tmavohnedých až čiernych semien.

V oblastiach mierneho pásma kvitne od júna do októbra, v subtropických oblastiach už od februára. V pôdach bohatých na živiny a vlhkosť produkuje viac listov a menej kvetov<sup>16, 17, 18</sup>.



Obr. 2: *E. californica*<sup>19</sup>

### 3.1.4. Príbuzné rastliny

Druh *Eschscholtzia californica* je veľmi variabilný a obsahuje množstvo ekotypov a cytotypov (líšia sa chromozómovým číslom)<sup>20</sup>. Na základe zemepisného rozšírenia sa delí na dva poddruhy *Eschscholtzia californica* subsp. *californica* GREENE rozšírená v Kalifornii a Oregone a *Eschscholtzia californica* subsp. *mexicana* GREENE, C. CLARK (syn. *E. douglasii* (HOOK. et ARN.) WALP.) vyskytujúca sa najmä v Novom Mexiku, Texase a Severnom Mexiku. Varieta *Eschscholtzia californica* CHAM. var. *peninsularis* GREENE, MUNZ. je typická pre oblasť Baja California. Pre vnútrozemie je popísaná varieta *crocea* BENTH., JEPS., v piesočných dunách od Surfú po Monterey sa vyskytuje varieta *maritima* GREENE, JEPS. Druh pestovaný v Európe od polovice 19. storočia ako okrasná rastlina pod názvom *Eschscholtzia californica* je krížencom rôznych poddruhov a variet druhu *E. californica*<sup>16</sup>.

### 3.1.5. Výskyt

*E. californica* je voľne rastúca bylina západného pobrežia Spojených Štátov Amerických od južnej časti štátu Washington cez Oregon, Kaliforniu, Nevadu, Arizonu až po západný Texas a severozápadné Mexiko. Do Európy bola privezená v polovici 19. storočia ako okrasná kvetina. Postupne sa rozšírila aj do iných subtropických oblastí sveta.

Rastie na otvorených slnečných trávnatých priestranstvách, suchých stráňach a skalách, často tiež v púštnych oblastiach v nadmorských výškach od pobrežia až po 2000 m. n. m<sup>18</sup>.

### 3.1.6. Droga – *Eschscholtziae herba* – vňať slncovky kalifornskej

Drogu predstavujú sušené nadzemné časti rastliny *E. californica* CHAM. zbierané v období kvetu. Dominujúcou zložkou drogy sú duté stonky s 8 – 12 kolenchýmovými rebrami belavej alebo žltkastej farby. Súčasťou sú tiež ľahko sa rozpadajúce šedo-zelené ochlpené listy a žlté až oranžové kvety.

Mikroskopickými znakmi monofaciálnych listov sú štrbinovité otvory, rovnomerne rozdelené na vrchnej a spodnej strane listu. Uzatvárajúce bunky majú niekedy polygonálny obrys. Vrchné palisádové pletivo je tvorené tromi radmi rovnomerných buniek. Pre kvetné stonky je typické výrazné asimilačné pletivo. V mladých stonkách sú prítomné početné mliečne trubice<sup>16</sup>.

### 3.1.7. Použitie v ľudovom liečiteľstve

Americkí Indiáni používali rastlinu ako zdroj potravy aj na liečebné účely. Rastlinu varili, pražili na horúcich kameňoch a príležitostne fajčili<sup>14</sup>. Vo forme obkladov bola používaná na hojenie rán a vredov, v zmesi s čiernym korením na liečbu zimnice, žltacky a rôznych kožných neduhov a odvar z kvetov na hubenie vší. Pre jej anxiolytické a sedatívne účinky bola používaná k navodeniu spánku u detí, ako analgetikum na tlmenie bolesti hlavy a zubov a taktiež ako spazmolytikum a emetikum. Ženy využívali peľ na kozmetické účely<sup>14, 16, 21</sup>.

### 3.1.8. Obsahové látky

Hlavnými obsahovými látkami *E. californica* sú alkaloidy izochinolínového typu vyskytujúce sa vo vyššom množstve najmä v kvitnúcich rastlinách<sup>22</sup>. Zastúpenie jednotlivých alkaloidov v rôznych častiach rastliny je značne odlišné. Napriek tomu, že vyššie koncentrácie dosahujú prevažne v koreňoch (až 2,7 %), práve nadzemné časti rastliny sa pre ich obsah (0,29 – 0,38 %) využívajú v medicíne<sup>16, 21</sup>.

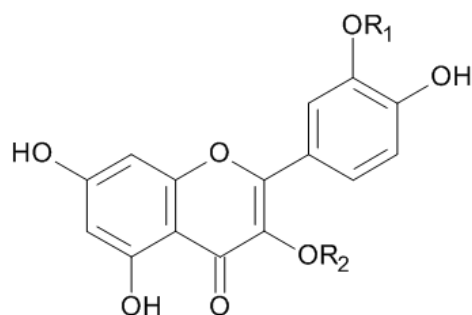
Ide o zmes terciárnych a kvartérnych alkaloidov, ktoré možno na základe štruktúry rozdeliť na niekoľko typov. Predstaviteľmi pavinanového typu sú alkaloidy kalifornidín, escholcín, karyachín, *O*-metylkaryachín, norargemonín a bisnorargemonín, protopínového typu protopín a allokryptopín. K alkaloidom benzofenantridínového typu patrí sanquinarín, chelerytrín, chelirubín, chelilutín a makarpín. Aporfínový typ je zastúpený látkami *N*-metyllaurotetanín, glaucín, korydín, izokorydín a magnoflorín. Escholamidín patrí do skupiny benzylozochinolínových alkaloidov. Zástupcami protoberberínového typu sú alkaloidy berberín, koptyzín a koryzamín. Izolovaný bol aj alkaloid morfinanového typu salutaridín<sup>22, 23, 24, 25</sup>. Izochinolínovým alkaloidom je podrobnejšie venovaná kapitola č. 3.2.

#### 3.1.8.1. Ďalšie obsahové látky

Spomedzi ďalších látok boli v rastline identifikované flavonoidy, ktoré sa vyskytujú hlavne ako glykozidy kvercetínu a izoramnetínu<sup>26</sup>. Sú to flavonolové glykozidy rutín, kvercitrín, kvercetín 3-*O*-β-glukopyranozid, kvercetín 3-*O*-[α-ramnopyranozyl-(1-4)-α-ramnopyranozyl-(1-6)-β-glukopyranozid], izoramnetín 3-*O*-β-glukopyranozid, izoramnetín 3-*O*-[α-ramnopyranozyl-(1-6)-β-glukopyranozid] a izoramnetín 3-*O*-[α-ramnopyranozyl-(1-4)-α-ramnopyranozyl-(1-6)-β-glukopyranozid], ktoré boli izolované z nadzemných častí rastliny. O izoláciu posledných piatich menovaných flavonoidov z *E. californica* sa



zaslúžili Beck a Häberlein v roku 1998. Samotné aglykony kvercetín a izoramnetín neboli v rastline detekované<sup>26</sup>. Základná štruktúra flavonolových glykozidov je znázornená na nasledujúcom obrázku (Obr. 3).



$R_1 = \text{H}$  alebo  $\text{CH}_3$ ,  $R_2 = \text{sacharidová zložka}$

Obr. 3: Základná štruktúra izolovaných flavonolových glykozidov

Ďalšími látkami zo skupiny flavonoidov vyskytujúcimi sa v rastline sú izoflavóny. Jain a kol. vyizolovali v roku 1996 dva izoflavóny: 2'-metoxyformononetín a 7-metoxy-2',4'-dihydroxyizoflavón<sup>27</sup>.

Z vodnej frakcie kvetov boli izolované antokyanidíny<sup>28</sup>.

V okvetných lístkoch rastliny boli detekované karotenoidy:  $\beta$ -karotén, escholcxantón, escholcxantín, luteín, zeaxantín, anteraxantín, mutatoxantín, violaxantín, luteoxantín, auroxantín a neoxantín<sup>29</sup>.

## 3.2. Izochinolínové alkaloidy izolované z *E. californica*

### 3.2.1. Alkaloidy

Alkaloidy sú dusíkaté látky bázického charakteru, rastlinného, výnimočne i živočíšneho pôvodu. Vznikajú premenou aminokyselín, z ktorých najdôležitejšie sú ornitín, lyzín, fenylalanín, tyrozín, tryptofán a histidín. Niektoré alkaloidy vychádzajú z kyseliny antranilovej a nikotínovej, iné vznikajú z medziproduktov pri biosyntéze terpenoidov a steroidov za prítomnosti amoniaku. Alkaloidy bez biosyntetického vzťahu k aminokyselinám sa označujú ako pseudoalkaloidy<sup>30, 31, 32</sup>.

Dusík v molekule alkaloidov je spravidla súčasťou heterocyklického systému, výnimkou sú tzv. protoalkaloidy ako napr. efedrín, muskarín či kolchicín<sup>8</sup>.

V rastlinách sa nachádzajú vo forme solí organických prípadne anorganických kyselín. Typický je výskyt konkrétneho alkaloidu v určitých, preň charakteristických, rodoch a čeľadiach. Zároveň platí, že v jednej rastline sa spravidla vyskytuje niekoľko štruktúrne podobných alkaloidov<sup>8,30</sup>.

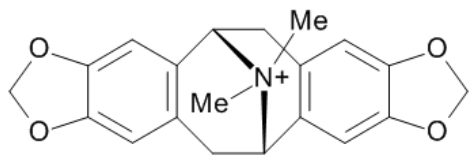
Alkaloidy majú výrazné fyziologické účinky, už v malých dávkach pôsobia ako jedy a vo vhodných koncentráciách a kombináciách sú využiteľné ako liečivá<sup>30</sup>.

### 3.2.2. Izochinolínové alkaloidy

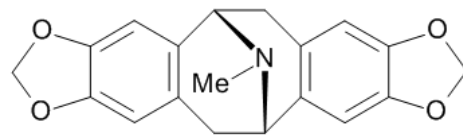
Izochinolínové alkaloidy tvoria pestrú a početnú skupinu fyziologicky aktívnych látok bohato rozšírených v prírode. Je známych viac ako tisíc zlúčenín tohto typu<sup>33</sup>. Nachádzajú sa predovšetkým v čeľadiach Papaveraceae, Ranunculaceae, Fumariaceae, Rutaceae, Amaryllidaceae, Berberidaceae, Menispermaceae a ďalších<sup>10, 11, 12</sup>. Biosyntéza vychádza z aminokyseliny tyrozínu, ktorého prekursorom je fenylalanín. Jednotlivé látky možno rozdeliť do niekoľkých štruktúrnych typov. V druhu *E. californica* sú zastúpené typy pavinanový, benzofenantridínový, aporfínový, protopínový, benzylizochinolínový, protoberberínový a morfinanový<sup>8, 24, 34</sup>.

#### 3.2.2.1. Pavinanový typ

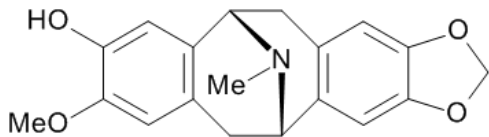
Dominantnou skupinou alkaloidov rastliny *E. californica* sú alkaloidy pavinanového typu. Unikátna a v najväčšej miere zastúpená je silne polárna kvartérna báza kalifornidín, nachádzajúca sa v koreňoch i v nadzemných častiach rastliny a vyznačujúca sa sedatívnym účinkom, a terciárna nafenolická báza escholcín, nazývaná tiež kalifornín<sup>22</sup>, ktorá je typickou zložkou nadzemných častí rastliny, z koreňov zatiaľ nebola izolovaná<sup>23, 35</sup>. Ďalšími látkami tohto štruktúrneho typu nachádzajúcimi sa v rastline v menšom množstve sú terciárne alkaloidy karyachín a neokaryachín izolované tiež z rastliny *Cryptocarya chinensis* HEMSL. (Lauraceae)<sup>36</sup>, *O*-metylkaryachín, označovaný tiež escholcidín, *N*-metylescholcidín a argemonín<sup>25</sup>. Od neho odvodené látky norargemonín a bisnorargemonín sa vyskytujú najmä v koreňoch, v nadzemných častiach sú prítomné len v malom množstve. Derivát izonorargemonín bol detekovaný tiež v dvoch druhoch rodu *Argemone* (Papaveraceae)<sup>37, 38</sup> a v *Thalictrum revolutum* DC. (Ranunculaceae)<sup>39</sup>. Z rastliny bola izolovaná aj polárna zlúčenina escholcín-*N*-oxid<sup>40</sup>. Štruktúry pavinanových alkaloidov sú uvedené na nasledujúcom obrázku (Obr. 4).



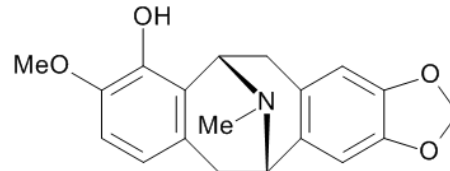
kalifornidín



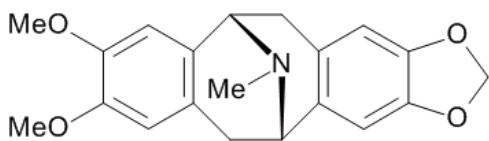
escholcín



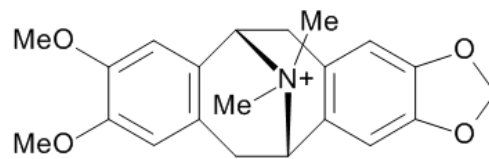
karyachín



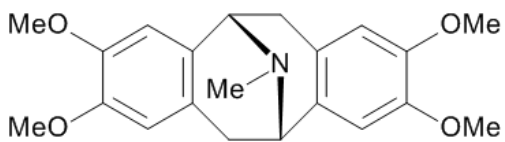
neokaryachín



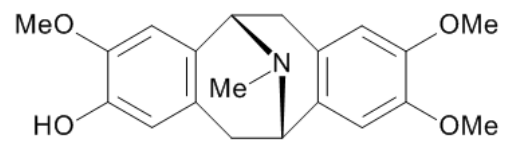
*O*-metylkaryachín



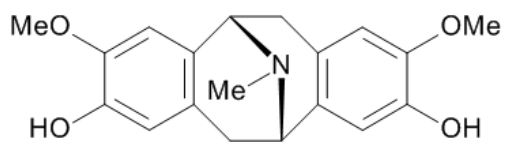
*N*-metylescholcín



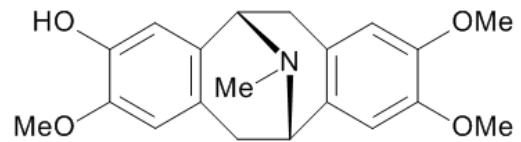
argemonín



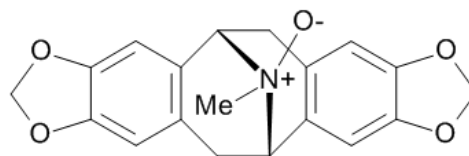
norargemonín



bisnorargemonín



izonorargemonín



escholcín-*N*-oxid

Obr. 4: Štruktúry pavinanových alkaloidov

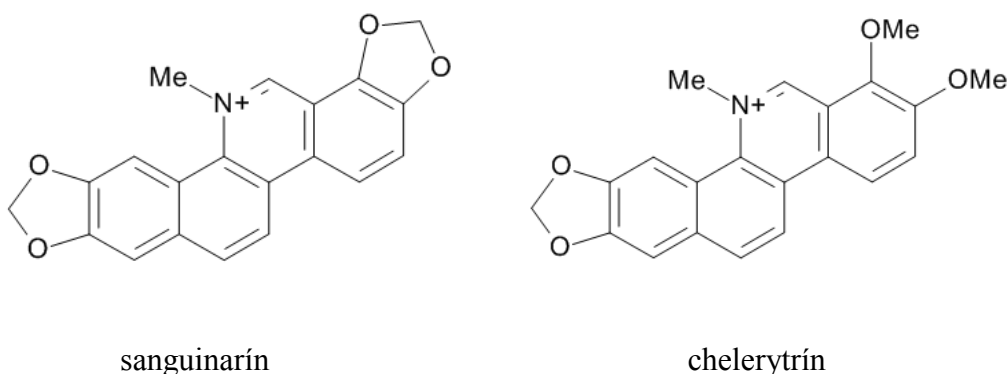
### 3.2.2.2. Benzofenantridínový typ

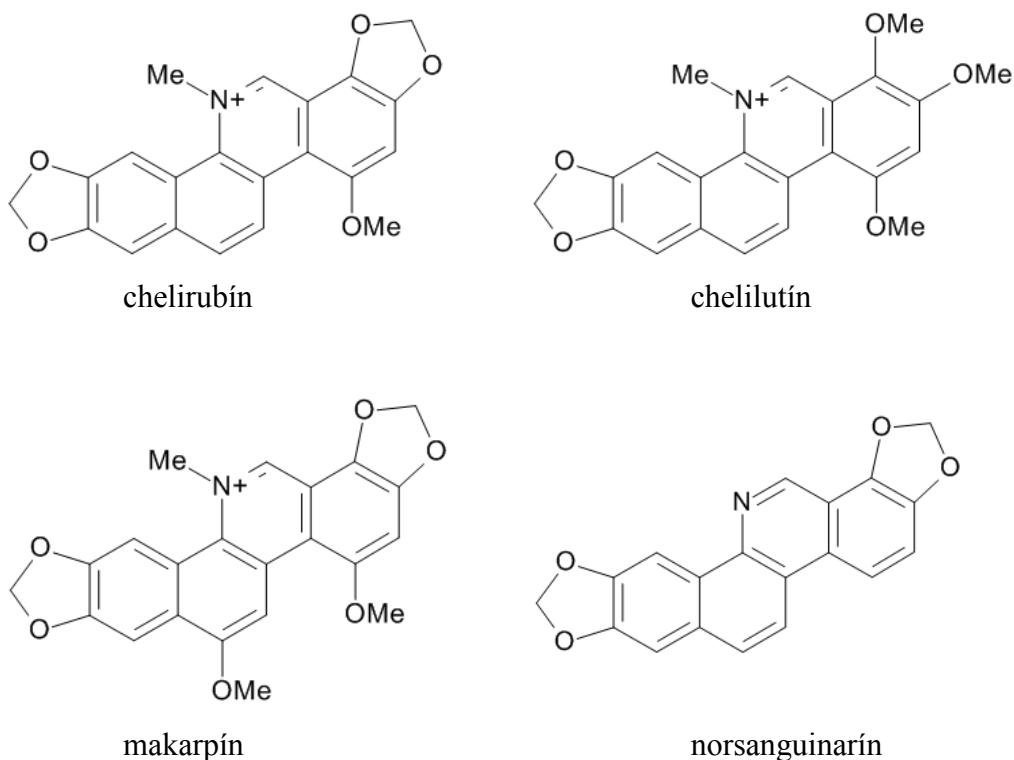
Kvartérne benzofenantridínové alkaloidy sú významnými obsahovými látkami rastlín z čeľade Papaveraceae. Základ ich štruktúry tvorí *N*-metylbenzo[*c*]fenantridínový kation. Nositeľom kladného náboja je metylsubstituovaný atóm dusíka v polohe 5. Benzofenantridíny sa vo forme tejto kvartérnej soli vyskytujú v prostredí nižšieho pH a vyznačujú sa polaritou, výrazným sfarbením a relatívne dobrou rozpustnosťou vo vode. Alkalizáciou prechádzajú do formy terciárnej redukovanej zásady, čo je sprevádzané zmenou vlastností na nepolárne, bezfarebné a vo vode málo rozpustné zlúčeniny<sup>41</sup>.

Látky tohto typu sú v *E. californica* zastúpené sanguinarínom a chelerytrínom. Sanguinarín bol prvý krát popísaný v roku 1827 Jamesom Danom ako hlavná farebná zložka *Sanguinaria canadensis* L. (Papaveraceae)<sup>42</sup> a v súčasnosti je považovaný za sľubné liečivo v terapii rakoviny<sup>43</sup>. O objav chelerytrínu ako alkaloidu *Chelidonium majus* L. (Papaveraceae) sa zaslúžil Probst v roku 1839<sup>42</sup>. Chelerytrín spôsobujúci selektívnu inhibíciu proteinkinázy C je taktiež potenciálnym antikanceróznym liečivom<sup>44</sup>. Obe látky sú vďaka ich antibakteriálnej aktivite používané ako súčasť dentálnych produktov<sup>45, 46</sup>.

Ďalšie obsahové látky chelirubín a chelilitín izoloval prvýkrát Slavík v roku 1954 z koreňa *Chelidonium majus* L. (Papaveraceae). O rok neskôr izoloval z *Macleaya microcarpa* (Papaveraceae) alkaloid makarpín<sup>42</sup>. Tieto látky boli izolované aj z nadzemných častí *E. californica*<sup>23</sup>. Z rastliny bol izolovaný aj terciárny alkaloid norsanguinarín, u ktorého bola preukázaná antifungálna aktivita<sup>47</sup>.

Benzofenantridíny sa ako minoritné alkaloidy vyskytujú aj v čeľadiach Fumariaceae, Ranunculaceae, Rutaceae, Meliaceae a Caprifoliaceae. Štruktúry izolovaných benzofenantridínových alkaloidov sú na nasledujúcom obrázku (Obr. 5).



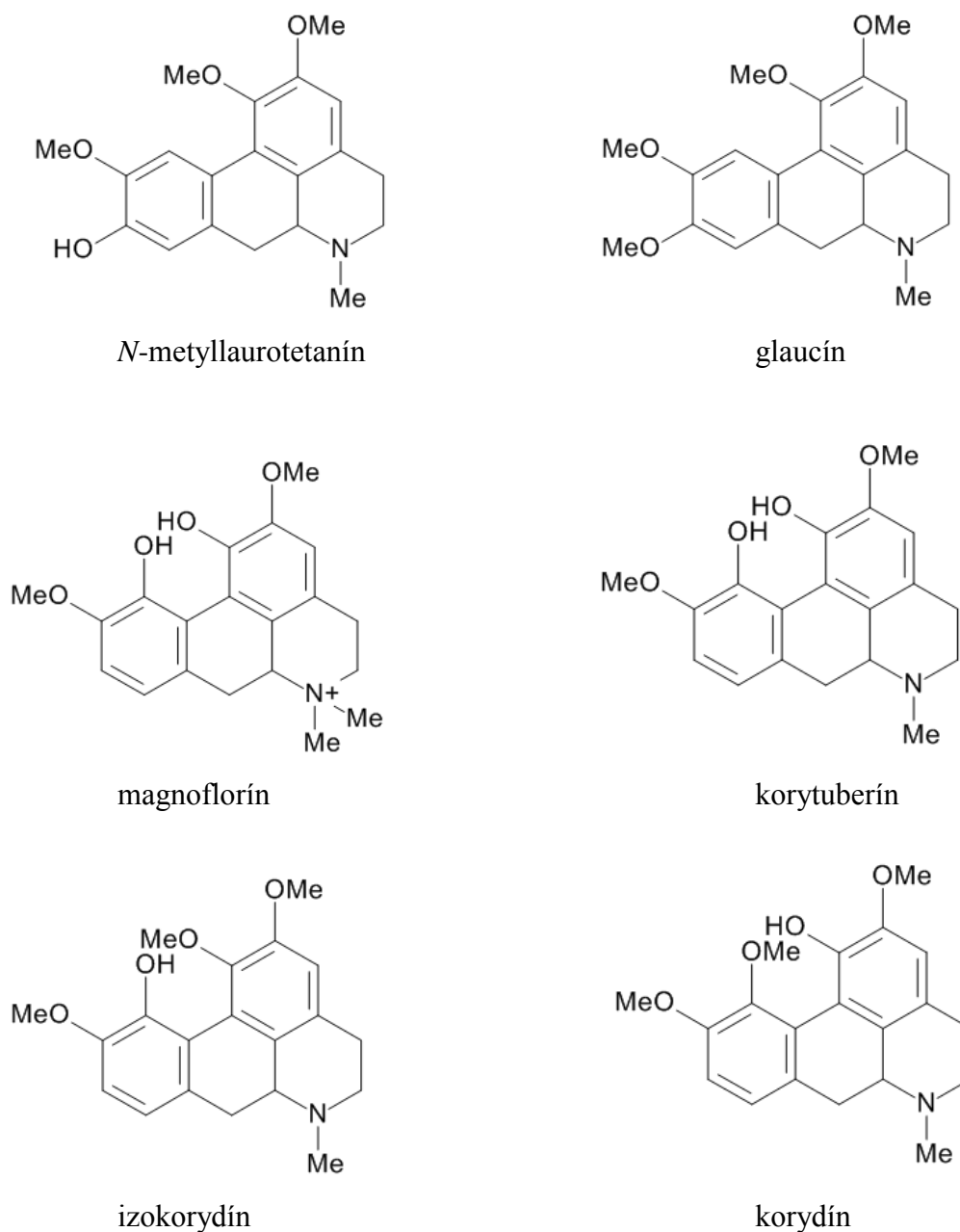


Obr. 5: Štruktúry beznofenantridínových alkaloidov

### 3.2.2.3. Aporfínový typ

Významnými obsahovými látkami *E. californica* sú alkaloidy odvodené z aporfínu. Z nadzemných častí rastliny bola izolovaná fenolická terciárna báza *N*-metyllaurotetanín, v minulosti tiež označovaná ako lauroscholcín<sup>48</sup>. Obsahová látka glaucín sa pre svoj antitusický účinok používa ako súčasť čajových zmesí proti kašľu a pri astme. Dominantnou zložkou koreňov je kvartérny alkaloid magnoflorín (escholín), ktorý sa v nadzemných častiach nachádza len v stopovom množstve. Z ďalších aporfínových alkaloidov bol z rastliny izolovaný korytuberín, izokorydín a korydín, ktorý ako prvý z tejto rastliny vyizoloval Slavík<sup>23</sup>.

Alkaloidy aporfínového typu (Obr. 6) sú obsiahnuté aj v iných zástupcoch čeľadi Papaveraceae, Ranunculaceae a Menispermaceae<sup>49</sup>.



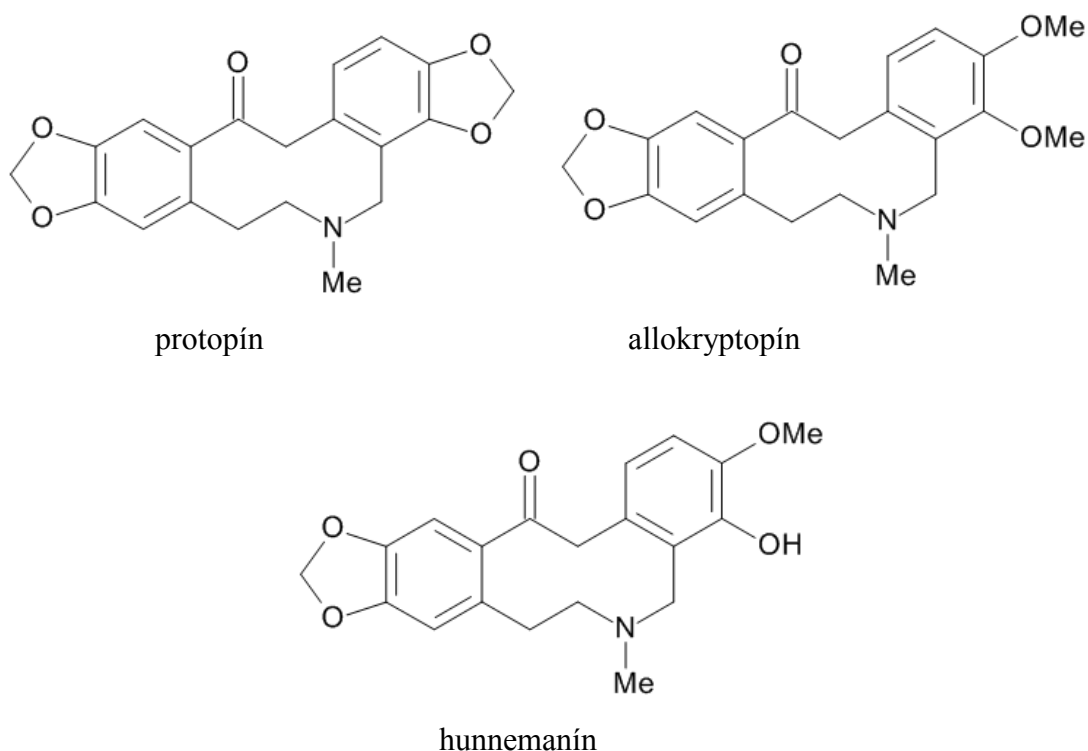
Obr. 6: Štruktúry aporfínových alkaloidov

#### 3.2.2.4. Protopínový typ

S protopínovým typom alkaloidov sa môžeme stretnúť u čeľadí Berberidaceae, Papaveraceae, Fumariaceae, Ranunculaceae a Rutaceae<sup>49</sup>. *E. californica* obsahuje dva základné alkaloidy tohto typu, terciárne nafenolické bázy protopín a allokryptopín (Obr. 7). Najvyšší obsah dosahujú v koreni, v ostatných častiach rastliny sú prítomné v menšom množstve<sup>35</sup>. Protopín je bežný alkaloid vyskytujúci sa v rôznych rastlinách čeľadí Papaveraceae a Fumariaceae<sup>22</sup> a sú mu pripisované inhibičné účinky na agregáciu krvných

doštičiek<sup>50</sup>. Allokryptopín pôsobí ako kľúčový jed, vo vyšších dávkach vedie k centrálnemu ochrnutiu alebo lokálnemu umŕtveniu<sup>51</sup>.

Z rastliny bol izolovaný aj protopínový derivát hunnemanín (Obr. 7), u ktorého bola preukázaná antifungálna aktivita<sup>47</sup>.

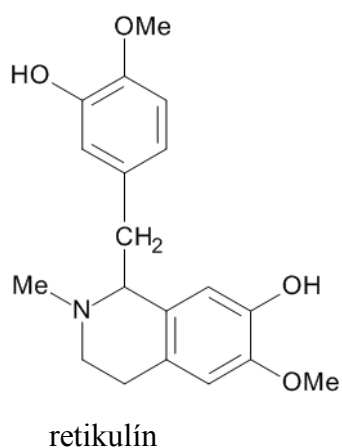
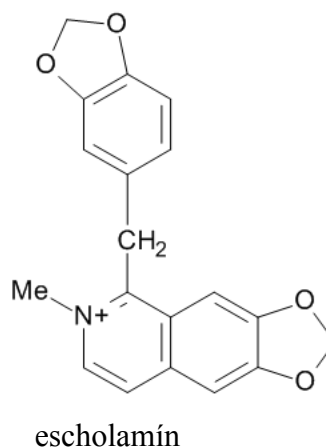
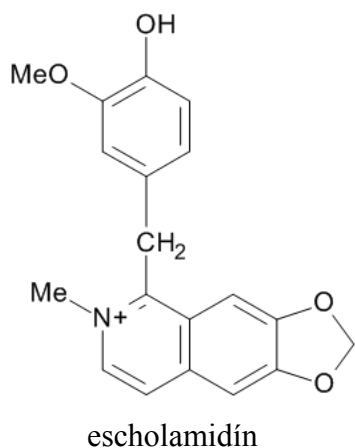


Obr. 7: Štruktúry protopínových alkaloidov

### 3.2.2.5. Benzylizochinolínový typ

Tento typ tvorí početnú skupinu alkaloidov odvodených od 1-benzylizochinolínu, resp. od 1-benzyl-1,2,3,4-tetrahydroizochinolínu. V prírode sa vyskytuje v čeľadiach Papaveraceae, Fumariaceae, Menispermaceae, Ranunculaceae a Berberidaceae.

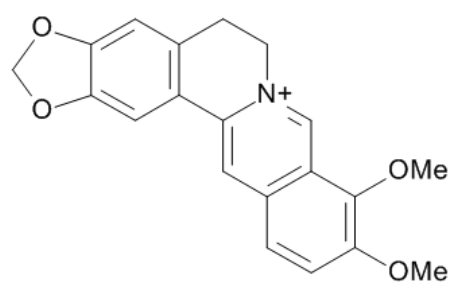
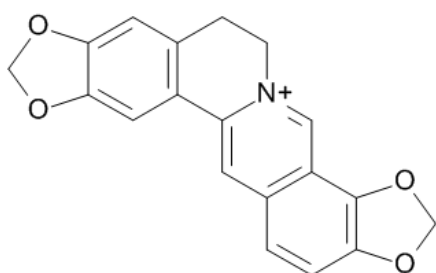
Z *E. californica* bol izolovaný kvartérny fenolický alkaloid escholamidín, predtým identifikovaný ako obsahová látka *Eschscholtzia oregana* GREEN (Papaveraceae). Jemu podobný escholamín, hlavný alkaloid druhu *E. oregana*, bol detekovaný v *E. californica* len v zanedbateľnom množstve<sup>23</sup>. Retikulín je terciárny benzylizochinolínový alkaloid bežne sa vyskytujúci v druhoch čeľade Papaveraceae. Z *E. californica* bol prvý krát izolovaný v roku 2010<sup>25</sup>. Tieto alkaloidy sú uvedené na nasledujúcom obrázku (Obr. 8).



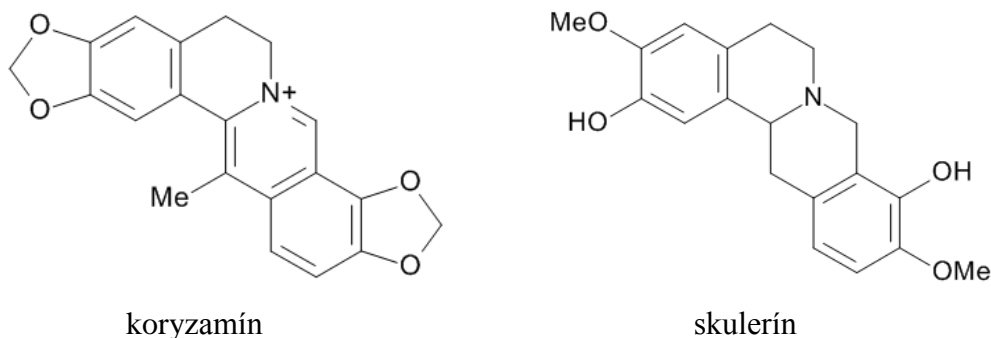
Obr. 8: Štruktúry benzylochinolínových alkaloidov

### 3.2.2.6. Protoberberínový typ

Protoberberínové alkaloidy sa v prírode vyskytujú pomerne hojne, v skúmanej rastline sú však zastúpené v menšej miere. V nadzemných častiach bolo detekované zanedbateľné množstvo kvartérnych zlúčenín koptizínu, berberínu a koryzamínu<sup>23</sup>. Z rastliny bol izolovaný tiež terciárny protoberberínový alkaloid skulerín<sup>25</sup> (Obr. 9).



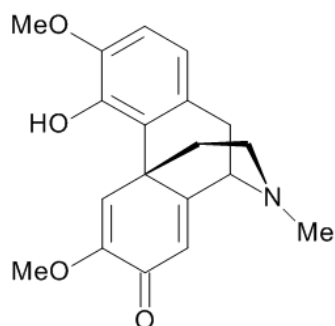




Obr. 9: Štruktúry protoberberínových alkaloidov

### 3.2.2.7. Morfinanový typ

Morfinanový typ alkaloidov je zastúpený terciárnou bázou salutaridínom (Obr. 10), prvý krát izolovanou z *E. californica* v roku 2010<sup>25</sup>.



salutaridín

Obr. 10: Štruktúra morfinanového alkaloidu

## 3.3. Metódy používané pri extrakcii a izolácii izochinolíkových alkaloidov

Na extrakciu alkaloidov z *E. californica* sa používa sušený práškový rastlinný materiál z podzemných (koreň) i nadzemných (vňat') častí rastliny. Extrakčným rozpúšťadlom je najčastejšie etanol, metanol alebo benzín. Bežne používaným prístrojom je Soxhletov extraktor<sup>35</sup>. Rozpúšťadlo je následne odparené a suchý extrakt obsahujúci zmes rôznych látok podrobený ďalšiemu spracovaniu (rozpustenie v inom rozpúšťadle,

úprava pH, filtrácia, vytrepávanie, premývanie, kryštalizácia a pod.) vedúcemu k izolovaniu čistých látok<sup>23, 24, 35</sup>.

Izolácia a čistenie alkaloidov je s výhodou uskutočňované pomocou bežných chromatografických metód. Najčastejšie používanými sú stĺpcová chromatografia a preparatívna tenkovrstvová chromatografia (TLC) s využitím SiO<sub>2</sub> a Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> ako stacionárnej fázy a zmesi rozpúšťadiel ako fázy mobilnej<sup>34</sup>.

Medzi moderné analytické separačné metódy patrí vysokoúčinná kvapalinová chromatografia (HPLC), plynová chromatografia (GC), kapilárna elektroforéza (CE)<sup>52</sup> a ich kombinácie so spektroskopickými<sup>34</sup> metódami: GC + hmotnostná spektrometria (MS)<sup>22</sup>, HPLC + MS, HPLC + MS-MS, HPLC + nukleárna magnetická rezonancia (NMR)<sup>24</sup>, CE + MS<sup>35</sup>. Tieto postupy umožňujú vedľa separácie jednotlivých zložiek zmesi zároveň určenie štruktúry izolovaných látok.

### **3.4. Biologická aktivita izochinolínových alkaloidov izolovaných z *E. californica***

*Eschscholtzia californica* je tradičná liečivá bylina Amerických Indiánov používaná vidieckym obyvateľstvom Kalifornie pre jej sedatívne a analgetické vlastnosti. V ľudovej medicíne jej boli pripisované aj účinky diaforetické, diuretické, spazmolytické a spánok navodzujúce<sup>21</sup>. Bolo uskutočnených niekoľko farmakologických štúdií skúmajúcich biologické pôsobenie extraktov z *E. californica in vitro* ako aj na rôznych živočíšnych modeloch. Tieto štúdie preukázali signifikantné sedatívne, spánok navodzujúce a anxiolytické účinky a zároveň absenciu toxických účinkov<sup>53, 54</sup>. Z týchto dôvodov sa dnes nadzemné časti rastliny používajú v Amerike aj Európe ako mierne sedatívum a k navodeniu spánku najmä v pediatrii<sup>53</sup>.

Benzofenantridínové alkaloidy, hlavne sanguinarín a chelerytrín, sa pre ich antibakteriálne pôsobenie používajú ako súčasť dentálnych produktov a sú zároveň sľubnými liečivami v terapii rakoviny<sup>43, 44, 45, 46</sup>.

U izochinolínových alkaloidov hunnemanínu a norsanguinarínu bola preukázaná antifungálna aktivita<sup>47</sup>.

Alkaloidy *E. californica* vykazujú určitú inhibičnú aktivitu voči ľudským cholinesterázam<sup>25</sup> a v súčasnosti sú predmetom ďalších štúdií zaoberajúcich sa ich možným uplatnením v terapii AD.

### 3.4.1. Inhibičná aktivita voči AChE a BuChE

Acetylcholinesteráza (AChE) a butyrylcholinesteráza (BuChE) sú enzýmy štiepiace neurotransmitter acetylcholín čím ovplyvňujú jeho hladinu v mozgu a tým sa podieľajú na regulácii cholinergnej transmisie. Inhibítory týchto enzýmov sú testované v klinických štúdiách pre liečbu AD. Na centrálnych cholinergných synapsiách zvyšujú hladinu acetylcholínu, ktorá je v dôsledku AD znížená. Tým zlepšujú pamäť a kognitívne funkcie pacientov trpiacich touto chorobou.

V zdravom mozgu je dominantným enzýmom AChE, zatiaľčo BuChE hrá len malú úlohu. Jej význam narastá u pacientov s AD, kde klesá aktivita AChE a relatívna aktivita BuChE sa zvyšuje. V liečbe AD preto nadobúdajú význam látky s duálnou enzymatickou aktivitou, teda látky inhibujúce AChE aj BuChE<sup>25</sup>.

Alkaloidy izolované z *E. californica* sú považované za potenciálne inhibítory ľudských cholinesteráz. V súčasnosti sú predmetom skúmania, no u mnohých už bola zaznamenaná určitá inhibičná aktivita voči jednému či dokonca obom týmto enzýmom.

V štúdií publikovanej v roku 2010 bola sledovaná *in vitro* inhibičná aktivita voči ľudskej AChE a BuChE štrnástich izochinolínových alkaloidov izolovaných z *E. californica*. Ako zdroj AChE bol použitý hemolyzát ľudských erytrocytov, zdrojom BuChE bola ľudská plazma. Ako referenčná látka bol použitý galantamín a huperzín A<sup>25</sup>.

Najvýraznejšia inhibičná aktivita voči AChE bola zaznamenaná u terciárneho alkaloidu karyachínu ( $IC_{50} = 19,6 \pm 0,4 \mu M$ ) a kvartérneho alkaloidu kalifornidínu izolovaného vo forme jodidu ( $IC_{50} = 36,7 \pm 0,9 \mu M$ ). BuChE bola najviac inhibovaná retikulínom ( $IC_{50} = 43,9 \pm 1,1 \mu M$ ) a alkaloidom, ktorý bol z prírodného zdroja izolovaný prvýkrát ( $IC_{50} = 27,8 \pm 0,4 \mu M$ ). Žiadna z látok nepreukázala významnú inhibíciu oboch enzýmov.

### 3.4.2. Antifungálna aktivita

U niektorých izochinolínových alkaloidov (berberín, tetrahydropalmitín, bikukulín, korypalmín, chaerofylín, fuyuzifín a *l*-korydalmín) bola preukázaná inhibičná aktivita voči niektorým hubám v rôznych koncentráciách<sup>47</sup>.

V práci publikovanej v roku 2009 bolo skúmané antifungálne pôsobenie dvoch izochinolínových alkaloidov hunnemanínu a norsanguinarínu izolovaných z metanolického extraktu celej rastliny *Eschscholtzia californica*. Bola testovaná ich antifungálna aktivita

(inhibícia klíčenia výtrusov) voči fytopatogénnym hubám *Alternaria melongenae*, *A. brassicola*, *A. brassicae*, *Curvularia lunata*, *C. maculans*, *Helminthosporium pennisetii*, *H. oryzae*, *H. turbicum*, *Fusarium undum* a *F. lini*. Huby boli izolované na zemiakovo-dextrózovom agare z ich vlastných hostiteľov. Ako pozitívny štandard bola použitá antifungálna látka ditán. Hunnemanín preukázal najväčší účinok voči *A. brassicae*, *H. pennisetii* a *F. lini*, u ktorých bola inhibícia klíčenia pozorovaná vo všetkých testovaných koncentráciách. Maximálny účinok (100% inhibícia) bol dosiahnutý v koncentrácii 1000 ppm. Voči norsanguinarínu boli najcitlivejšie huby *A. brassicola* a *C. maculans*, ktorých 100% inhibícia bola zaznamenaná pri koncentrácii norsanguinarínu 1000 ppm<sup>47</sup>.

### 3.4.3. Sedatívny a anxiolytický účinok

*Eschscholtzia californica* je už dlhodobo používaná v liečiteľstve pre jej sedatívny a anxiolytický účinok. Tieto vlastnosti boli potvrdené v niekoľkých štúdiách<sup>53, 55</sup>.

Predpokladaný mechanizmus účinku zahŕňa ovplyvnenie benzodiazepínových receptorov ako aj inhibíciu degradácie katecholamínov prostredníctvom inhibície ich rozkladných enzýmov dopamín- $\beta$ -hydroxylázy a monoaminoxidázy B. Účasť jednotlivých alkaloidov nachádzajúcich sa v rastline na tomto účinku je pravdepodobná, zatiaľ však nebola potvrdená žiadnou štúdiou<sup>53</sup>.

V roku 2006 bola publikovaná práca, ktorej cieľom bolo otestovať schopnosť väzby 70% etanolického extraktu z *E. californica* na rôzne receptory uplatňujúce sa v procese sedácie a anxiolýzy a zároveň priradiť túto aktivitu jednotlivým látkam obsiahnutým v extrakte. Spomedzi testovaných receptorov boli v najväčšej miere ovplyvnené serotonínové receptory 5-HT<sub>1A</sub> a 5-HT<sub>7</sub>. Následne bolo z vodného etanolického extraktu vyizolovaných šesť alkaloidov: kalifornidín, escholcín, *N*-metyllaurotetanín, karyachín, *O*-metylkaryachín a nový pavinanový alkaloid 7-*O*-metyléter-neokaryachín-*N*-metyljodid. Tieto čisté látky vrátane komerčne dostupného protopínu boli podrobené testovaniu ich schopnosti inhibovať väzbu [<sup>3</sup>H]8-hydroxy-2-(di-*N*-propylamino)tetralínu ([<sup>3</sup>H]8-OH-DPAT) na serotonínový receptor 5-HT<sub>1A</sub><sup>56</sup>. Výsledky sú zhrnuté v nasledujúcej tabuľke (Tab. 1).

Tab. 1: Inhibícia väzby [<sup>3</sup>H]8-OH-DPAT na 5-HT<sub>1A</sub> receptor alkaloidmi z *E. californica*<sup>a 56</sup>

Látka	EC <sub>50</sub> (μM) ± SD
Kalifornidín	>100
Escholcín	11 ± 4
<i>N</i> -metyllaurotetanín	0,16 ± 0,01
Karyachín	9 ± 7
Protopín	>100

<sup>a</sup> Kompetitívna väzbová kapacita vzoriek bola počítaná v porovnaní s inhibíciou 10 μM serotonínu (100 %).

Najaktívnejšou látkou bol aporfínový alkaloid *N*-metyllaurotetanín, ktorému sa pripisuje silný účinok 70% etanolického extraktu. Ostatné testované látky preukázali len slabú inhibičnú aktivitu.

#### 3.4.4. Inhibícia CYP 3A4

V práci z roku 2006 bol 70% vodný etanolický extrakt z *E. californica* podrobený *in vitro* testovaniu jeho schopnosti inhibovať aktivitu cytochrómu P 450, resp. jeho izoenzýmu 3A4. Určitá inhibičná aktivita extraktu bola zaznamenaná (IC<sub>50</sub> = 128,6 μg/ml), preto boli ďalej testované aj jednotlivé hlavné alkaloidy a flavonoidy prítomné v extrakte. Ukázalo sa, že escholcín je silný inhibítor CYP 3A4 *in vitro* (IC<sub>50</sub> = 13,4 ± 4,7 μM), zatiaľčo ostatné zlúčeniny boli aktívne menej. Táto aktivita môže viesť k interakcii rastlina - liečivo, pretože veľká časť liečiv je metabolizovaná práve 3A4 izoenzýmom cytochrómu P 450<sup>56</sup>. Opatrnosť pri súčasnom užívaní preparátov z *E. californica* a liečiv metabolizovaných týmto enzýmom je teda na mieste.

## 3.5. Alzheimerova choroba

### 3.5.1. Definícia

Alzheimerova choroba (AD) je progresívne atroficko-degeneratívne ochorenie mozgu nejasnej etiológie prejavujúce sa syndrómom demencie. Je jednou z najčastejších príčin demencie vôbec - zodpovedá za 50 - 60 % všetkých demencií<sup>3</sup>.

V závislosti od času nástupu klinických príznakov možno rozlíšiť dva základné typy: AD so skorým začiatkom (klinické prejavy do 65 roku života) a choroba s neskorým začiatkom (nástup príznakov zvyčajne po 65 roku života)<sup>2</sup>.

V súčasnosti trpí ochorením až 5 % populácie staršej 65 rokov. Počet pacientov však neustále rastie<sup>57</sup>.

### 3.5.2. Patofyziológia

AD sa vyznačuje charakteristickými patomorfológickými prejavmi. Na makroskopickú úroveň ide predovšetkým o kortiko-subkortikálnu atrofiu mozgu, ktorá začína v mediálnych temporálnych štruktúrach a je sprevádzaná rozšírením temporálnych rohov postranných komôr mozgových. Stupeň poškodenia kognitívnych funkcií vo väčšine prípadov korešponduje so stupňom atrofie, sú však známe aj prípady, kde makroskopická atrofia úplne chýba<sup>3</sup>.

Z mikroskopických zmien je najvýraznejšie ukladanie patologických proteínov.  $\beta$ -amyloid vzniká nefyziologickým štiepením amyloidového prekursorového proteínu (APP), ktorý je prirodzenou súčasťou neurónov ako transmembránový proteín. APP je za fyziologických podmienok štiepený enzýmom  $\alpha$ -sekretázou na solubilné fragmenty. Za patologických okolností môže byť aktivita tohto enzýmu výrazne zvýšená alebo je úplne potlačená a uplatňuje sa enzým  $\beta$ -prípadne  $\gamma$ -sekretáza. Nadmerný vznik fragmentov či tvorba dlhších fragmentov vedie k ich koagulácii za vzniku  $\beta$ -amyloidu, ktorý sa kumuluje v extracelulárnom priestore a tvorí základ tzv. Alzheimerovských plakov. Objavujú sa v mozgovej kôre, ale i v podkôrovej šedi a kôre mozočku. Tieto štruktúry poškodzujú nervové tkanivo a mobilizujú neurogliové bunky. Amyloid sa ukladá aj v stenách mozgových ciev a vedie k amyloidnej angiopatii. Nadmerná koagulácia sa dáva do súvisu s výskytom apolipoproteínu E4<sup>2,4</sup>.

Ďalší patologický proteín vzniká nadmernou fosforyláciou  $\tau$ -proteínu, ktorý je súčasťou neurónových mikrotubulov. Hyperfosforylácia vedie k jeho polymerizácii a tvorbe párovo heliakálnych filamentov. Tieto dvojzávitnice sú základom intracelulárnych neurofibrilárnych uzlíčkov, tzv. tangles. Takto postihnuté neuróny podliehajú apoptóze<sup>3</sup>.

Poškodené tkanivo, napr. v oblasti plakov, vyvoláva imunitnú reakciu. Gliové bunky produkujú cytokíny a voľné radikály, výsledkom čoho je sterilný zápal prehlbujúci mozgové poškodenie<sup>2</sup>.

Ďalším patologickým mechanizmom je narušenie cholinergného systému. Klesá počet niektorých neurónov, synapsií a znižuje sa plasticita neurónov. Poškodené sú najmä

acetylcholinergné nervové vlákna vedúce z nucleus basalis Meynerti do oblasti hippocampu a asociačných kôrových oblastí. Typické je poškodenie v presynaptickej oblasti. Dochádza k poklesu hladiny cholinacetyltransferázy – enzýmu syntetizujúceho neurotransmitter acetylcholín z cholínu a acetylkoenzýmu A. Na odbúravaní acetylcholínu sa popri acetylcholinsteráze vo zvýšenej miere podieľa aj butyrylcholinesteráza, tvorená patologicky gliovými bunkami v oblasti plakov<sup>3</sup>.

Zaznamenaný je aj nedostatok iných neurotransmiterov a neuromodulátorov, ako napr. somatostatínu, v menšej miere serotonínu, dopamínu a ďalších<sup>2</sup>.

V patogenéze AD sa uplatňuje aj oxidačný stres a tvorba voľných kyslíkových radikálov. Tieto vysoko chemicky aktívne látky poškodzujú množstvo enzýmov a väzbou na lipidy neuronálnej membrány vedú k odumieraniu nervových buniek<sup>2</sup>.

Ďalším faktorom je hyperexcitácia iónotropných NMDA (N-metyl-D-aspartátových) receptorov spojených s otváraním kalciových kanálov. Nadmerný influx kalcia do neurónov spôsobuje ich smrť, následné uvoľnenie excitačných aminokyselín a opätovnú aktiváciu NMDA-receptorov. Výsledkom je kaskádovitá reakcia poškodzujúca mozgové tkanivo<sup>3</sup>.

U pacientov s AD je tiež zaznamenaná porucha mozgového metabolizmu na úrovni mitochondrií. Znížená oxidácia glukózy je úmerná stupňu demencie<sup>3</sup>.

Z ďalších faktorov sa môže uplatňovať vysoký obsah monoaminoxidázy B, nedostatok nervových rastových faktorov a niektorých biofaktorov ako napr. vit. B12<sup>2</sup>.

### 3.5.3. Rizikové faktory

Medzi základné rizikové faktory patrí vyšší vek, genetické predispozície (mutácie na dlhom ramienku chromozómu 21 a na chromozómoch 1 a 14, výskyt Downovho syndrómu u príbuzných 1. generácie, vzťah s výskytom apolipoproteínu E4)<sup>58</sup>, ženské pohlavie, abúzus alkoholu, fajčenie, poranenie hlavy, depresie, sklon k infekciám a chronickým zápalom, poruchy imunity (imunodeficiencia, autoimunitné choroby), metabolické a hormonálne poruchy, nízka hladina antioxidantov v krvi a nedostatočný prísun živín<sup>59</sup>.

### 3.5.4. Klinický obraz

Prvé príznaky AD sa u väčšiny pacientov začínajú prejavovať vo veku 65 až 80 rokov. V prípade choroby so skorým nástupom zväčša medzi 40 - 65 rokmi. Typickým

znakom Alzheimerovskej demencie je pozvoľný nástup klinických symptómov a väčšinou lineárny rozvoj choroby, prípadne s obdobiami určitého spomalenia priebehu<sup>2</sup>.

Prvým príznakom býva porucha recentnej epizodickej slovnej pamäti prejavujúca sa zabúdaním bežných denných udalostí. K nej sa postupne pridáva aj porucha reči. Tá je síce plynulá, no jednoduchá a často obsahovo prázdna. Pre toto štádium choroby sú typické poruchy vizuospeciálnych funkcií. Klesá schopnosť orientácie v priestore a čase, pacienti zabúdajú cestu domov a začínajú blúdiť na dobre známych miestach. Zhoršená je tiež schopnosť plánovať a dodržiavať poradie jednotlivých činností, prejavujú sa poruchy súdnosti a logického myslenia. Pacienti sa osobnostne menia, pomerne skoro dochádza k redukcii záujmov a záľub<sup>2,4</sup>.

Asi u 40 % pacientov sa začínajú postupne prejavovať aj poruchy nekognitívnych funkcií ako sú úzkosť, depresia, agresivita, psychotické príznaky typu paranoidných bludov a paranoidne-halucinatórneho syndrómu a poruchy spánku. Pacienti strácajú nadhľad nad svojou chorobou, myslia si, že sú zdraví, a preto liečbu často odmietajú.

Klesá schopnosť pacientov postarať sa o seba a dodržiavať osobnú hygienu. V pokročilej fáze choroby prestávajú komunikovať s okolím, nespoznávajú svojich príbuzných, bývajú afatickí a zmätení. Prejavujú sa poruchy príjmu potravy, vylučovania moču a stolice, telesné a duševné chátranie.

Priemerná doba prežitia od nástupu klinických symptómov je 3 až 7 rokov, existujú však veľké individuálne rozdiely. Pacienti umierajú predovšetkým na interkurentné choroby<sup>2,4</sup>.

### 3.5.5. Terapia Alzheimerovej choroby

Liečba AD by mala byť komplexná a mala by zahŕňať jednak farmakoterapiu kognitívnych funkcií, liečbu pridružených somatických ťažkostí ako aj nefarmakologickú liečbu (psychoterapia, rehabilitácia, spolupráca s rodinami pacientov)<sup>2</sup>.

V súčasnosti nie sme schopní liečiť AD kauzálne. Cieľom tzv. kognitívnej terapie je aspoň zlepšiť alebo na určitý čas stabilizovať priebeh choroby vychádzajúc z doteraz známych etiopatogenetických procesov. Existujú dva postupy založené na dôkazoch (evidence based medicine): užitie liečiv, tzv. kognitív, ktoré zvyšujú centrálnu acetylcholinergnú transmisiu a liečiv pôsobiacich na NMDA-iónotropné receptory glutamátergného systému<sup>3</sup>.



### 3.5.5.1. Farmakoterapia kognitívnych funkcií

#### 3.5.5.1.1. Acetylcholinergný systém

Ovplyvnenie acetylcholinergného systému je možné niekoľkými spôsobmi. Najviac osvedčenými sú liečivá zo skupiny inhibítorov cholinesteráz (IChE). Mechanizmom ich účinku je inhibícia enzýmu acetylcholinesterázy, eventuálne aj butyrylcholinesterázy, čím sa znižuje biodegradácia neurotransmitera acetylcholínu. Jeho zvýšená ponuka v neuronálnej štrbine upravuje cholinergný prenos na nervových synapsiách v CNS, čo má za následok zlepšenie pozornosti a pamäťových schopností. Podmienkou účinku je dobrý prestup látok hematoencefalickou bariérou (HEB) a preferenčná inhibícia mozgových foriem cholinesteráz<sup>60</sup>. Je dokázaný aj zásah IChE do neurodegeneratívnych mechanizmov AD v zmysle zníženia toxicity a tvorby  $\beta$ -amyloidu. Tieto látky sa uplatňujú najmä v liečbe ľahkých až stredne ťažkých štádií choroby<sup>1, 61</sup>. Prvými používanými látkami boli fyzostigmín a akridínové deriváty takrín a velnacrín vyznačujúce sa závažnými hepatotoxickými účinkami. Z tohto hľadiska sú výhodnejšie neskôr zavedené reverzibilné inhibítory AChE. Piperidínový derivát donepezil má pomerne dlhý biologický polčas, čo umožňuje jeho podávanie 1-krát denne<sup>60</sup>. Karbamátový derivát rivastigmín je pseudoireverzibilný cholinergný dualista, inhibuje AChE aj BuChE<sup>1</sup>. Pomerne selektívny reverzibilný inhibítory galantamín má na rozdiel od oboch vyššie uvedených liečiv potlačené účinky na periférny parasympatický nervový systém a tým zmiernené nežiaduce gastrointestinálne účinky ako sú nauzea, bolestivé spazmy tráviaceho traktu a hnačky. Galantamín zároveň zvyšuje účinok acetylcholínu alosterickou moduláciou nikotínových receptorov<sup>3, 61</sup>.

Možnosťou pôsobenia na cholinergný nervový systém je aj podávanie cholínu alebo sójového lecitínu ako prekursorov acetylcholínu. Prechod lecitínu a jeho derivátov HEB je však značne obmedzený, preto sa musia podávať vo vysokých denných dávkach (rádovo až desiatky gramov). Použitie týchto látok nie je založené na dôkazoch<sup>3, 61</sup>.

Ďalšími možnými mechanizmami je zvýšené uvoľňovanie acetylcholínu (hydergíny, nicergolín, propentofylín), uľahčenie vstupu prekursoru acetylcholínu do neurónu (acetyl-*L*-karnitín) či priama stimulácia muskarínových (xanomelín, arekolín, pilokarpín) a nikotínových receptorov (nikotín, epibatidín, galantamín). Ani tieto postupy zatiaľ nenašli významné klinické uplatnenie<sup>3, 61</sup>.

#### 3.5.5.1.2. Glutamátergny systém

Na liečbu stredných až ťažkých foriem AD sa dnes používa jediný parciálny inhibítory

glutamátergných NMDA-receptorov memantín. Čiastočnou blokádou týchto receptorov sa znižuje nadmerný vstup kalcia do nervových buniek a tým aj ich zánik apoptózou, zlepšuje sa synaptický prenos v CNS a je zaznamenaný aj pozitívny vplyv na kognitívne funkcie. Používanie memantínu je v súlade s medicínou založenou na dôkazoch (EBM)<sup>3</sup>.

#### 3.5.5.1.3. Neurónový metabolizmus

Kortikálny hypometabolizmus upravujú látky nazývané nootropiká, teda látky zvyšujúce mozgový metabolizmus. Za fyziologických i patologických podmienok dobre prestupujú hematoencefalickou bariérou a zlepšujú metabolizmus glukózy v mozgových bunkách a okysličovanie neurónov. Napriek absencii priameho vazodilatačného účinku odstraňujú lokálne vazospazmy v mikrocirkulácii mozgu a niektoré z nich tiež upravujú reologické vlastnosti červených krviniek. Ku klasickým zástupcom nootropných liečiv patrí meklofenoxát, derivát vitamínu B6 pyritinol, cyklický derivát GABA piracetam a jeho deriváty pramiracetam, oxiracetam a aniracetam. Pre dosiahnutie žiadaného terapeutického účinku je nutné dlhodobé podávanie v perorálnej alebo injekčnej forme. Do tejto skupiny liečiv sa radia aj vazodilatanciá mozgových ciev ako naftidrofuryl, pentoxifylín, flunarizín, cinarizín, dihydroergotoxín a vinpocetín<sup>2,3,61</sup>.

#### 3.5.5.1.4. Ďalšie metódy farmakoterapie

Ďalšou možnosťou zásahu do priebehu AD je použitie antioxidantov, teda vychytávačov (scavengerov) voľných kyslíkových radikálov, ktoré pri tomto ochorení vznikajú vo zvýšenej miere<sup>60</sup>. Sú to napr. vitamíny  $\alpha$ -tokoferol (vit. E), kyselina askorbová (vit. C) a retinol (vit. A). Scavengerový efekt vykazuje aj hormón epifýzy melatonín, nootropiká pyritinol a meklofenoxát, extrakt z *Ginkgo biloba* a lazaroidy – látky odvodené od steroidných hormónov s 21 uhlíkmi. Likvidovať voľné kyslíkové radikály pomáhajú aj látky s obsahom selénu, ktorý je súčasťou prirodzeného mozgového enzýmu glutationperoxidázy. Taktiež inhibítory monoaminoxidázy B selegilín a rasagilín čiastočne prispievajú k tomuto efektu blokádou odbúravania dopamínu, pri ktorom voľné radikály vznikajú. Medzi antioxidantmi patrí aj látka obsiahnutá v červenom víne resveratrol. Táto metóda liečby patrí skôr medzi preventívne a pomocné postupy, jej používanie nie je založené na dôkazoch<sup>2,3</sup>.

Sľubnou metódou zasahujúcou do patogenetického mechanizmu AD je tzv. antiamyloidná farmakoterapia, ktorá je založená na blokáde tvorby  $\beta$ -amyloidu moduláciou funkcie enzýmov  $\beta$ - a  $\gamma$ -sekretázy. Nádejným liečivom je nesteroidné antiflogistikum tarenflurbil (R-enantiomér flurbiprofenu). Perspektívnym postupom je stimulácia

$\alpha$ -sekretázovej aktivity s využitím niektorých látok zo skupiny statínov (simvastatín, atorvastatín). Overované sú aj látky zvyšujúce rozpustnosť  $\beta$ -amyloidu (glykosamíntramiprosát), látky brániace agregácii či antiamyloidná imunoterapia využívajúca monoklonálne protilátky proti  $\beta$ -amyloidu<sup>1,3</sup>.

Doposiaľ nie úplne prebádanou oblasťou je využitie nervových rastových faktorov. Predpokladá sa, že ich množstvo je v priebehu AD znížené. Možným zásahom je substitúcia v podobe podania hydrolyzátov bravčových mozgov, avšak žiadna štúdia zatiaľ jednoznačne nepotvrdila ich účinok v liečbe AD. Predmetom skúmania sú tiež nízkomolekulárne látky prechádzajúce HEB, viažuce sa na trk-receptory a uvoľňujúce nervové rastové faktory bez súčasného imunosupresívneho pôsobenia<sup>3</sup>.

#### 3.5.5.2. Farmakoterapia nekognitívnych funkcií

U väčšiny pacientov sa v priebehu choroby vyvinú aj poruchy nálady, spánku a psychiatrické symptómy. Psychofarmaká sú indikované len u závažných, pretrvávajúcich porúch správania a to vždy za súčasného uplatňovania nefarmakologických opatrení. Dávky liečiv sú čo najnižšie a ich zvyšovanie je len veľmi pomalé<sup>1</sup>.

Na liečbu agitovanosti, agresivity a psychotických symptómov sa používajú antipsychotiká druhej generácie, najčastejšie tiaprid a melperon. Až v prípade neúspechu sa prechádza na butyrofenónový derivát haloperidol. Pri výskyte bludov alebo halucinácií je indikovaný risperidon, prípadne ďalšie atypické antipsychotiká: olanzapín, kvetiapín alebo ziprasidon. Liečivá sú u pacientov s demenciou užívané v dávkach nižších než u pacientov s psychózou. Použitie benzodiazepínových derivátov sa neodporúča pre ich anticholinergný účinok prostredníctvom ovplyvnenia GABA systému<sup>1,2</sup>.

Úzkostné stavy u pacientov s AD sú liečené látkami zo skupiny anxiolytík, predovšetkým benzodiazepínmi s krátkym biologickým polčasom. Používa sa oxazepam, lorazepam, alprazolam a v prípade akútnych stavov parenterálne podávaný diazepam. Dlhodobé užívanie týchto látok nie je vhodné z dôvodu negatívneho vplyvu na kognitívne funkcie vyššie uvedeným mechanizmom. Alternatívou pri nutnosti dlhodobej liečby je antidepresívum trazodon, prípadne malé dávky antipsychotík<sup>1</sup>.

Liekmi voľby u pridružených depresií sú antidepresíva typu SSRI (selektívne inhibítory spätného vychytávania serotonínu) citalopram, sertralín, fluvoxamín a fluoxetín a dualisticky pôsobiace antidepresíva typu SNRI (inhibítory spätného vychytávania serotonínu a noradrenalínu) venlafaxín, milnacipran a mirtazapín. Osvedčený je tiež reverzibilný inhibítor monoaminoxidázy moklobemid. Klasické tricyklické antidepresíva

nie sú vhodné, pretože prehlbujú už prítomný cholinergný deficit, zhoršujú kognitívne funkcie a môžu vyvolávať krátke delirantné stavy<sup>1,2</sup>.

Krátkodobé poruchy spánku sú korigované nebenzodiazepínovými hypnotikami zolpidemom a zopiklonom. Pri dlhodobej liečbe sa uprednostňujú antidepresíva trazodon, mirtazapín alebo amitriptylín. Antipsychotiká melperon a tiaprid sú indikované pri poruchách cyklu spánok – bdenie<sup>1</sup>.

### 3.5.5.3. Nefarmakologická liečba

Nefarmakologická liečba je dôležitou súčasťou komplexnej starostlivosti o pacientov s AD. Psychoterapeutický prístup závisí od vážnosti poškodenia kognitívnych i nekognitívnych funkcií pacienta, od úrovne degradácie jeho osobnosti a zachovania nadhľadu nad chorobou. Často používaná je kognitívna rehabilitácia, ktorú uskutočňuje psychológ, prípadne ďalší odborníci. Výhodným postupom je reedukačná terapia, teda precvičovanie funkcií, ktoré zostali zachované a nie snaha nadobudnúť funkcie už zabudnuté, a tiež kontrola realitou. Tá spočíva v pripomínaní základných faktov (označenie dverí jednotlivých miestností, kalendár pre zorientovanie sa v čase atď.)

Veľký význam má práca s rodinou pacienta, ktorá môže výrazne ovplyvniť priebeh choroby. Príbuzní by mali byť poučení, ako správne jednať s pacientom a mali by byť oboznámení so štandardným vývojom choroby a možnosťami terapie, aby od nej nemali nadmerné očakávania<sup>2</sup>.

## **4. EXPERIMENTÁLNÁ ČASŤ**

## **4.1. Všeobecné postupy**

### 4.1.1. Destilácia a odparovanie

Rozpúšťadlá boli pred použitím prečistené destiláciou. Najskôr bol zachytený predok (asi 5 %, väčšinou s vodným azeotropom), potom bolo vydestilovaných zvyšných približne 90 % rozpúšťadla. Rozpúšťadlá boli uchovávané v hnedých nádobách.

Odparovanie chromatografických frakcií bolo uskutočňované na vákuovej odparke Büchi Rotavapor R 114 vybavenej vodným kúpeľom Büchi Waterbath B-480 pri teplote 40 °C za zníženého tlaku.

### 4.1.2. Chromatografia

#### 4.1.2.1. Tenkovrstvová chromatografia

Pre chromatografiu na tenkej vrstve bol použitý systém normálnych komôr, ktoré boli nasýtené mobilnou fázou. Sýtenie komôr trvalo 30 minút. Chromatografia bola uskutočňovaná vzostupne.

#### 4.1.2.2. Stĺpcová chromatografia

Stĺpcová chromatografia bola uskutočňovaná systémom gradientovej elúcie na oxide hlinitom neutrálnom. Stĺpec bol naplnený obvyklým spôsobom - naliatím suspenzie adsorbentu v rozpúšťadle. Na pripravený stĺpec bola nanosená vzorka rozpustená v malom množstve rozpúšťadla.

## **4.2. Materiál a vybavenie**

### 4.2.1. Rozpúšťadlá

Dietylamín, p.a., Lachner

Etanol 95%, denaturovaný metanolom, p.a., PENTA

Chloroform, p.a., PENTA

n-Hexán, p.a., PENTA

Toluén, p.a., PENTA

#### 4.2.2. Chemikálie

Dusičnan bizmutitý zásaditý, p.a., RNDr. Jan Kulich, s.r.o.

Jodid draselný, p.a., PENTA

Kyselina vínna, p.a., RNDr. Jan Kulich, s.r.o.

#### 4.2.3. Chemikálie a materiál pre stanovenie účinku erytrocytarnej AChE a BuChE

##### 4.2.3.1. Chemikálie

10 mM acetylthiocholín jodid, Sigma - Aldrich

10 mM butyrylthiocholín jodid, Sigma - Aldrich

0,1 M fosfátový pufor, pH 7,4

5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina,  $\geq 98\%$ , Sigma - Aldrich

Dihydrát dihydrogenfosforečnanu sodného, p.a., Lachema

Dodekahydrát hydrogenfosforečnanu disodného, p.a., Lachema

Huperzín A, TAZHONGHUI – Tai'an zhonghui Plant Biochemical Co., Ltd., China

Galantamín hydrobromid, Changsha Organic Haerb Inc., China

Dimetylsulfoxid, Sigma - Adrich

##### 4.2.3.2. Materiál

Ako zdroj acetylcholinesterázy bol použitý hemolyzát ľudských erytrocytov. Plná krv bola odstredená za čas 15 minút pri 10000 ot./min., získaná erytrocytárna masa bola trikrát premytá 0,1M fosfátovým pufrom, pH 7,4, aby boli odstránené zvyšky plazmy. 10% (v/v) hemolyzát bol pripravený vo vode.

Zdrojom butyrylcholinesterázy bola ľudská plazma.

Meranie bolo uskutočnené v jednorázových semimikro-polystyrénových kvetách 1,5 ml PLASTIBRAND<sup>®</sup>

#### 4.2.4. Chemikálie a materiál pre stanovenie antioxidantnej aktivity

2,2'-difenyl-1-pikrylhydrazyl radikál, Sigma - Adrich

Kvercetín, Sigma - Adrich

Trolox, Sigma - Adrich

#### 4.2.5. Prístroje použité pri stanovovaní biologických vlastností izolovaných látok

Centrifúga typ MPW-340 (Mechanika precyzyjna, Varšava, Polsko)

pH meter  $\Phi$  72 METER (Beckmann, USA)

Spektrofotometer UV-1601 CE SHIMADZU

FIA lab 3000 analyser (FIALab Instruments Inc., Bellevue, WA, USA)

USB 2000-UV/VIS spektrofotometer so zdrojom svetla LS-1 (Ocean Optics, USA)

CMA-Z prietoková cela (dĺžka 1 cm)

#### 4.2.6. Detekčné činidlá

D1: Dragendorffovo činidlo modifikované podľa Muniera<sup>62</sup>

Slúži k detekcii alkaloidov a iných zlúčenín obsahujúcich dusík.

Roztok A bol pripravený rozpustením 1,7 g zásaditého dusičnanu bizmutitého a 20 g kyseliny vínnej v 80 ml vody.

Roztok B bol pripravený rozpustením 16 g jodidu draselného v 40 ml vody.

Zásobný roztok bol získaný zmiešaním zásobných roztokov A a B v pomere 1:1.

Činidlo pre analýzu bolo pripravené rozpustením 5 ml kyseliny vínnej v 50 ml vody a pridaním 5 ml zásobného roztoku.

#### 4.2.7. Chromatografické adsorbenty

A1: Kieselgel 60 F<sub>254</sub>, Merck, 5 × 10 cm, hliníková doska s vrstvou silikagelu pre tenkovrstvovú chromatografiu, hrúbka vrstvy 0,2 mm.

A2: Oxid hlinitý 60 F<sub>254</sub>, Merck, neutrálny, 5 × 10 cm, hliníková doska s vrstvou Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> pre tenkovrstvovú chromatografiu.

#### 4.2.8. Vyvíjacia sústava pre analytickú tenkovrstvovú chromatografiu (TLC)

S1: Toluén + Et<sub>2</sub>NH (95:5)

S2: CHCl<sub>3</sub> + EtOH (97:3)

S3: CHCl<sub>3</sub> + EtOH + Et<sub>2</sub>NH (97:3:2)



### **4.3. Príprava a spracovanie chloroformového výtrepku J<sub>1</sub> z *E. californica***

#### 4.3.1. Pôvod drogy

Dodávateľom drogy bola firma Planta Naturalis (Markvartice u Sobotky). Droga tvorená sušenou vňaťou s koreňmi bola získaná zberom z introdukovanej kultúry (komerčné osivo).

#### 4.3.2. Príprava sumárneho extraktu a jednotlivých výtrepkov

Príprava sumárneho extraktu a alkaloidných výtrepkov nebola súčasťou tejto diplomovej práce a bola uskutočnená Jakubom Doležalom a Doc. RNDr. L. Opletalom CSc. na Katedre farmaceutickej botaniky a ekológie v roku 2007. Je možné ju nájsť v diplomovej práci Jakuba Doležala<sup>63</sup>.

##### 4.3.2.1. Príprava alkaloidného výtrepku J<sub>1</sub>

Pre priblíženie uvádzam prípravu jodidov kvartérnych alkaloidov uskutočnenú v roku 2007 Doc. RNDr. L. Opletalom CSc.

Vodný zvyšok bol zneutralizovaný 25% kyselinou chlorovodíkovou na pH 3. K nemu bol pridaný roztok 410 g jodidu draselného v 400 ml vody a po poriadnom pretrepaní bol ponechaný v pokoji pri izbovej teplote 2 dni. 1200 ml tohto roztoku bolo vytrepných 5 × 300 ml chloroformu. Chloroformový roztok bol následne odparený za vzniku 188 g tmavo hnedého vysoko viskózneho odparku jodidov.

##### 4.3.3. Stĺpcová chromatografia výtrepku J<sub>1</sub> z *E. californica*

25,3 g odparku alkaloidov vo forme jodidov bolo rozpustených v chloroforme a nanesených na kolónu (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) za účelom chromatografovania a získania čistých alkaloidov. Jednotlivé alkaloidné frakcie boli podrobené tenkovrstvovej chromatografii a frakcie obsahujúce zhodné alkaloidy boli následne spojené. Priebeh stĺpcovej chromatografie je zhrnutý v nasledujúcich tabuľkách (Tab. 2, Tab. 3).

Tab. 2: Stĺpcová chromatografia výtrepku J<sub>1</sub> z *E. californica*

Označenie vzorky	J <sub>1</sub> (alkaloidy vo forme jodidov)
Hmotnosť a popis vzorky	25,3 g, hnedá, pevná
Druh a množstvo adsorbentu	Oxid hlinitý neutrálny, 0,1 – 0,2 mm, 600 g, deaktivovaný 5 % vody
Vrstva s extraktom	5,3 × 8 cm
Deliaca vrstva	5,3 × 34 cm
Frakcia (ml) / doba prietoku (min.)	250 ml / 20 minút
Mŕtvy objem	600 ml

Tab. 3: Výsledky stĺpcovej chromatografie

Spojené frakcie	Frakcia	Elučný systém	Popis	Hmotnosť odparku (g)
1 – 2	1 – 2	CHCl <sub>3</sub>	Číra, neobsahuje alkaloidy	0 g
3	3	CHCl <sub>3</sub>	Žltoranžová olejovitá hmota	0,7670 g
4 – 7	4 – 7	CHCl <sub>3</sub>	Žltoranžová olejovitá hmota	0,2616 g
8	8	CHCl <sub>3</sub>	Žltoranžová olejovitá hmota	0,2093 g
9	9	CHCl <sub>3</sub>	Žltoranžová olejovitá hmota	0,0796 g
10 – 12	10 – 12	CHCl <sub>3</sub>	Žltá olejovitá hmota	0,1563 g
13 – 15	13 – 15	CHCl <sub>3</sub>	Žltá olejovitá hmota	0,5672 g
16 – 20	16 – 20	CHCl <sub>3</sub>	Žltá olejovitá hmota	0,8759 g
21 – 24	21 – 24	CHCl <sub>3</sub>	Žltá olejovitá hmota	0,7937 g
25 – 37	25 – 35	CHCl <sub>3</sub>	Žltá olejovitá hmota	2,2930 g
	36 – 37	CHCl <sub>3</sub> + EtOH (95:5)		
38	38	CHCl <sub>3</sub> + EtOH (95:5)	Oranžová olejovitá hmota	6,7494 g
39 – 44	39 – 42	CHCl <sub>3</sub> + EtOH (95:5)	Oranžovohnedá olejovitá hmota	2,3341 g
	43 – 44	CHCl <sub>3</sub> + EtOH (90:10)	Hnedá olejovitá hmota	

Spojené frakcie	Frakcia	Elučný systém	Popis	Hmotnosť odparku (g)
	45	CHCl <sub>3</sub> + EtOH (80:20)	Hnedá olejovitá hmota	
45 – 49	46	CHCl <sub>3</sub> + EtOH (75:25)	Hnedočervená olejovitá hmota	0,0930 g
	47 – 49	CHCl <sub>3</sub> + EtOH (70:30)	Hnedá olejovitá hmota	

#### 4.3.4. Spracovanie frakcie č. 3

Frakcia č. 3 bola vyvinutá na TLC. Odparok frakcie č. 3 bol podrobený kryštalizácii za zníženej teploty zo zmesi chloroform – hexán. Vzniknuté kryštáliky boli oddekantované, matečný lúh bol uložený pod označením L/26 pre prípadné ďalšie spracovanie.

Kryštáliky boli niekoľkokrát premyté etanolom, rozpustené v CHCl<sub>3</sub> a prefiltrované cez vrstvičku Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> za účelom odstránenia mechanických nečistôt. Rekryštalizáciou z etanolu vnikli kryštáliky bielej farby, ktoré boli oddekantované a vysušené v exsikátore. Čistota vyizolovanej látky bola overená na TLC za použitia mobilnej fázy S1. Kryštáliky čistej látky o hmotnosti 0,2236 g boli uložené pod označením 5/022. Následne bola uskutočnená NMR a MS analýza za účelom štruktúrnej identifikácie izolovanej látky.

#### 4.3.5. Spracovanie frakcie č. 38

Frakcia č. 38 bola vyvinutá na TLC. Odparok frakcie č. 38 bol za tepla rozpustený v CHCl<sub>3</sub> a podrobený kryštalizácii pridaním etanolu. Vzniknuté kryštáliky boli niekoľkokrát premyté etanolom, opätovne rozpustené v CHCl<sub>3</sub> a prefiltrované cez vrstvičku Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> za účelom odstránenia mechanických nečistôt. Kryštály získané rekryštalizáciou z etanolu boli oddekantované a vysušené v exsikátore. Látka o hmotnosti 3,25 g bola podrobená štruktúrnej analýze, na základe nej identifikovaná a uložená pod označením 3/006.

## 4.4. Určenie štruktúry izolovaných látok

### 4.4.1. Meranie hmotnostného spektra (MS)

Spektrá boli merané na LC/MS Thermo Finningan LCQDuo, iónová pasca, ionizácia elektrosprejom v kladnom móde (ESI+). MS/MS spektrá boli merané pri kolíznej energii 40 eV.

### 4.4.2. Meranie NMR spektra

Spektrá boli merané na spektrometre Varian Inova 500 s pracovnou frekvenciou 499,9 MHz pre  $^1\text{H}$  a 125,7 MHz pre  $^{13}\text{C}$  jadrá.  $^{13}\text{C}$  NMR spektrá boli merané v 5mm SW širokopásmovej sonde,  $^1\text{H}$  a všetky  $^2\text{D}$  spektrá v inverznej 5mm ID PFG sonde s využitím štandardných pulzných sekvencií. Merania boli uskutočňované v deuteriochloroforme pri 25 °C.

Hodnoty chemických posunov sú v ppm a sú vzťahované k vnútornému štandardu (hexametyldisilan, 0,04 ppm, v  $^1\text{H}$  spektrách) alebo k signálu solventu (76,99 ppm, v  $^{13}\text{C}$  spektrách). (Dr. M. Kurfürst, Ph.D., Ústav chemických procesů, AV ČR, Praha).

## 4.5. Stanovenie inhibičnej aktivity alkaloidov voči erytrocytarnej AChE a sérovej BuChE

### 4.5.1. Podmienky merania

Experimenty boli uskutočnené za týchto podmienok:

- pri teplote 25 °C
- v prostredí PB
- pri pH 7,4
- pri vlnovej dĺžke spektrometra 436 nm
- v jednorázových plastových kyvetách o hrúbke 1 cm

### 4.5.2. Príprava erytrocytárnych puzdier

Puzdrá boli pripravené z čerstvo odobratej krvi, ku ktorej bol pridaný 1 ml citrátu sodného na 10 ml krvi podľa mierne modifikovanej metódy Stecká a Kanta<sup>64</sup>. Plazma

(HuBuChE) bola odstránená z plnej krvi centrifugáciou pri rýchlosti 4000 otáčok za minútu za použitia centrifúgy Boeco U-32R s rotorom Hettich 1611. Erytrocyty boli premiestnené do 50ml skúmaviek a trikrát premyté 5mM fosfátovým pufrom (pH 7,4) obsahujúcim 150 ml chloridu sodného (12000 ot./min., Avanti J-301, rotor JA-30.50). Premyté erytrocyty boli zmiešané s 5mM fosfátovým pufrom (pH 7,4) na dobu 10 minút, aby bol zaistený ich rozpad. Dezintegrované bunky boli 10 min. centrifugované rýchlosťou 20000 ot./min. a následne boli puzdrá (HuAChE) trikrát premyté fosfátovým pufrom<sup>25</sup>.

#### 4.5.3. Stanovenie inhibičnej aktivity ( hodnoty IC<sub>50</sub>)

Hodnoty IC<sub>50</sub> boli stanovené Ellmanovou spektrofotometrickou metódou s použitím 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoovej kyseliny (DTNB). Ako substráty boli použité estery thiocholínu, ktoré sú cholinesterázami štiepené na thiocholín a príslušnú kyselinu. SH-skupina thiocholínu sa naviaže na DTNB za vzniku žltu sfarbeného produktu, ktorý sa stanovuje spektrofotometricky pri vlnovej dĺžke 436 nm. Sleduje sa nárast absorbancie za jednu minútu. Hodnoty IC<sub>50</sub> boli vypočítané z nameraných hodnôt poklesu aktivity acetylcholinesterázy alebo butyrylcholinesterázy nelineárnou regresiou v programe GraphPaD Prism (verzia 3.02 pre Windows; výrobca Graph PaD Software, San Diego, CA, USA). Výsledky boli porovnané s hodnotami IC<sub>50</sub> známych inhibítorov cholinesteráz: galantamínom (IC<sub>50</sub> HuAChE = 6,898 µM, HuBuChE = 156 µM) a huperzínom A (IC<sub>50</sub> HuAChE = 0,25 µM, HuBuChE >1000 µM)<sup>34</sup>.

#### 4.6. Stanovenie antioxidačnej aktivity získaných alkaloidov

Antioxidačná aktivita bola testovaná *in vitro* DPPH testom. Metóda je založená na reakcii stabilného 2,2'-difenyl-1-pikrylhydrazylu (DPPH) so vzorkou. Zníženie absorbancie DPPH meranej pri 525 nm je závislé od koncentrácie antioxidantu v sledovanej vzorke. Bol použitý software FIALab pre Windows, analyzátor FIALab 3000 (FIALab Instruments Inc., Bellevue, WA, USA), 2,5ml injekčná pumpa, USB2000-UV/VIS spektrofotometer so zdrojom svetla LS-1 (Ocean Optics, USA) a SMA-Z prietoková cela (dĺžka 1 cm). Antiradikálová aktivita vzoriek bola vyjadrená ako 50% účinná koncentrácia (EC<sub>50</sub>), ktorá bola vypočítaná pomocou programu GraphPad Prism 3.02 a bola porovnaná so známymi antioxidantmi: kvercetínom EC<sub>50</sub> = 25,3 µM a troloxom EC<sub>50</sub> = 27,8 µM<sup>34</sup>.

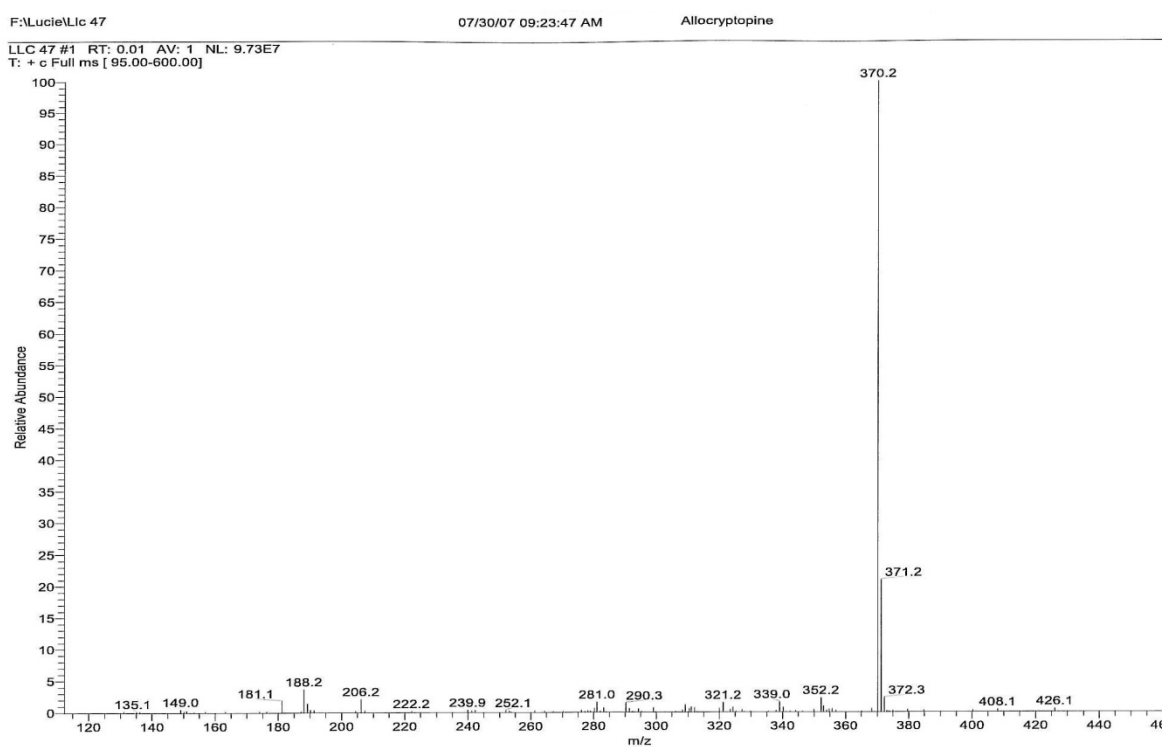
## **5. VÝSLEDKY**

Na základe MS a NMR štúdií a porovnania dát s literatúrou boli izolované látky identifikované ako allokryptopín a kalifornidín.

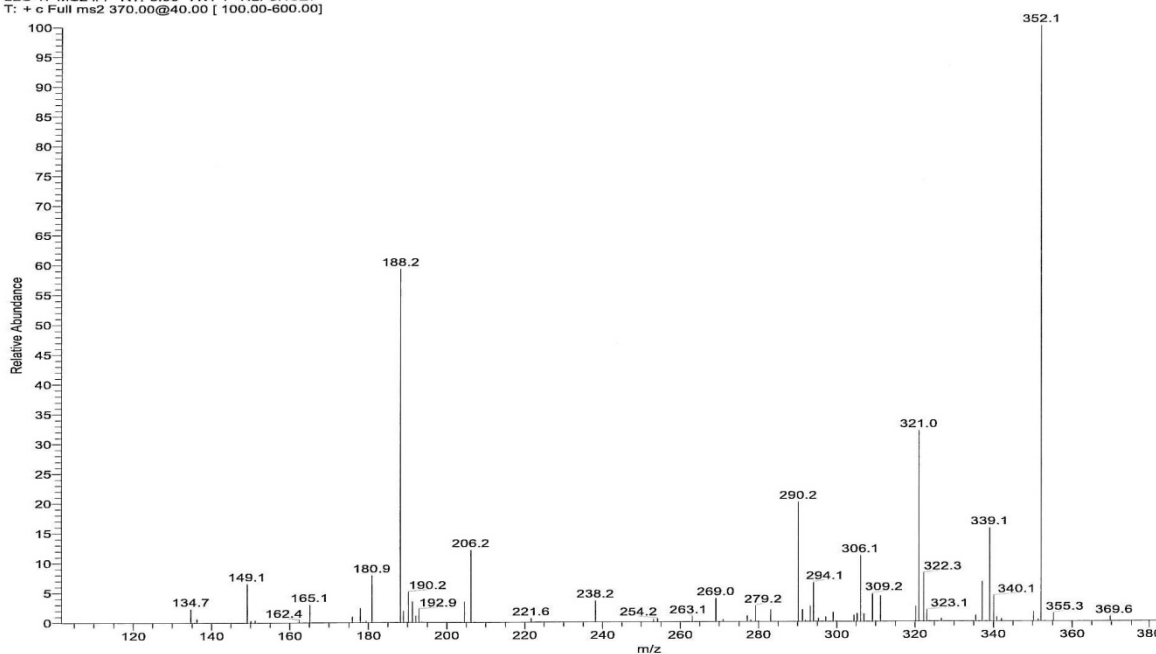
## 5.1. Štruktúrna analýza allokryptopínu

### 5.1.1. MS štúdie allokryptopínu

ESI-MS  $m/z$  370.2  $[M+H]^+$  (100). MS/MS  $m/z$  352.1 (100), 339.1 (14), 321.0 (33), 290.2 (20), 188.2 (60).



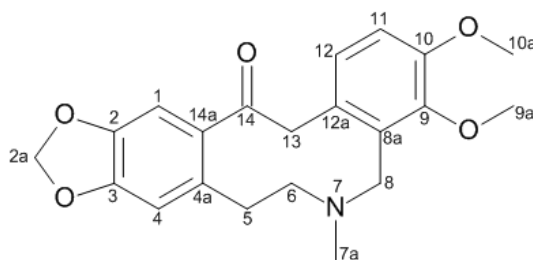
LLC 47 MS2 #1 RT: 0.00 AV: 1 NL: 3.18E7  
T: + e Full ms2 370.00@40.00 [ 100.00-600.00]



Obr. 11: MS a MS/MS spektrum allokryptopínu

### 5.1.2. NMR štúdie allokryptopínu

Štruktúra izolovanej látky bola určená na základe interpretácie  $^1\text{H}$ - a  $^{13}\text{C}$ -NMR spektier a ich porovnania s dátami v literatúre<sup>63</sup>.



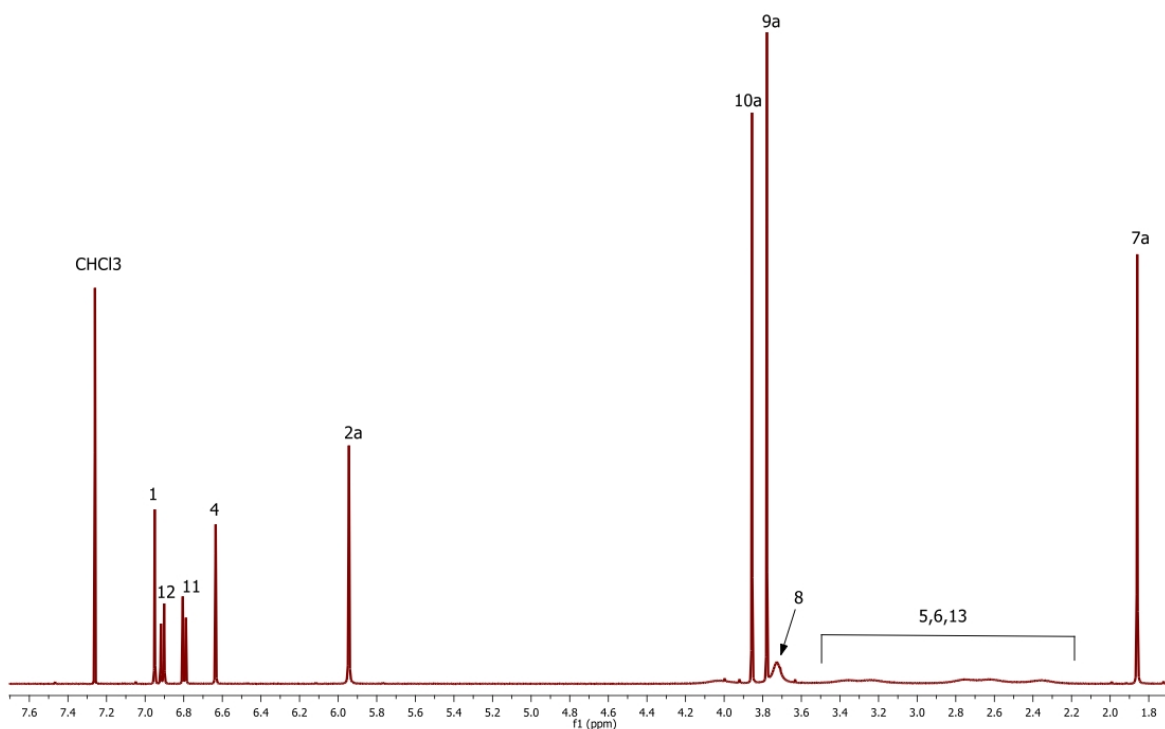
Obr. 12: Štruktúra allokryptopínu

#### 5.1.2.1. $^1\text{H}$ -NMR spektrum allokryptopínu

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ,  $25^\circ\text{C}$ ):

1.86 s, 3H, H-7; 2.2-3.5 br, H-5, H-6, H-13 veľmi široké signály, nie je možné spoľahlivo priradiť; 3.72 br s, 2H, H-8; 3.78 s, 3H, H-9a; 3.86 s, 3H, H-10a; 5.94 s, 2H, H-2a; 6.63 s, 1H, H-4; 6.80 d ( $^3J_{\text{H}}=8,24$  Hz), 1H, H-11; 6.91 d, 1H, H-12; 6.95 s, 1H, H-1.



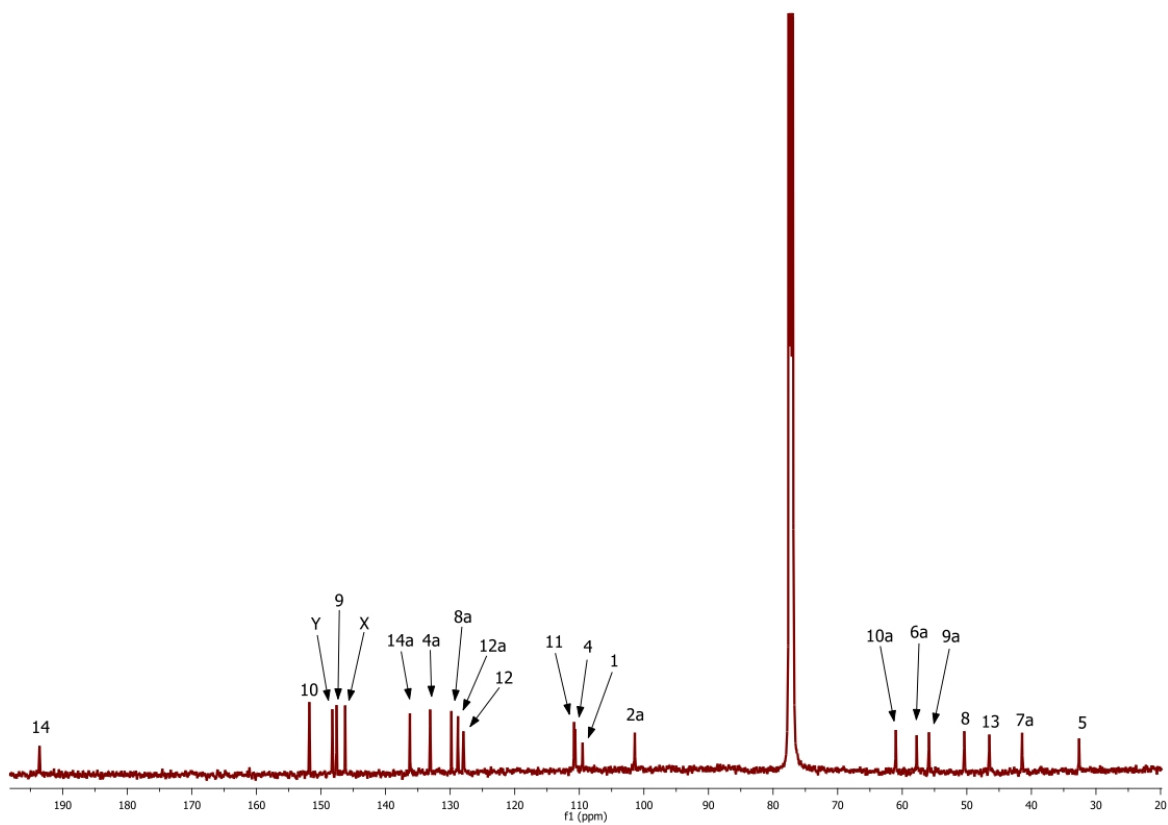


Obr. 13: <sup>1</sup>H-NMR spektrum allokraptopínu

#### 5.1.2.2. <sup>13</sup>C-NMR spektrum allokraptopínu

<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 25°C):

32.63, C-5; 41.44, C-7a; 46.52, C-13; 50.40, C-8; 55.88, C-9a; 57.77, C-6; 61.00, C-10a; 101.42, C-2a; 109.50, C-1; 110.65, C-4; 110.83, C-11; 127.97, C-12; 128.80, C-12a; 129.83, C-8a; 133.12, C-4a; 136.25, C-14a; 146.58, C-X; 147.91, C-9; 148.27, C-Y; 151.82, C-10; 193.62, C-14; signály označené ako X, Y prislúchajú uhlíkom C-2 a C-3, nie je možné ich spoľahlivo priradiť.

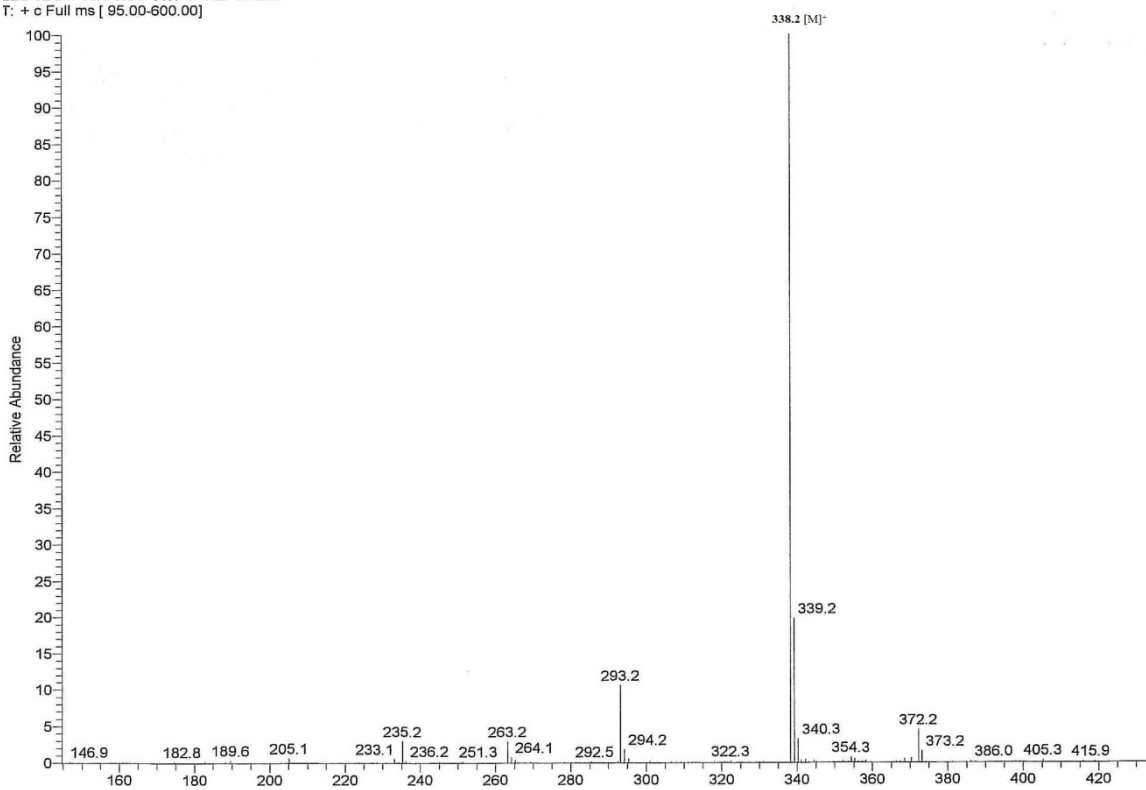
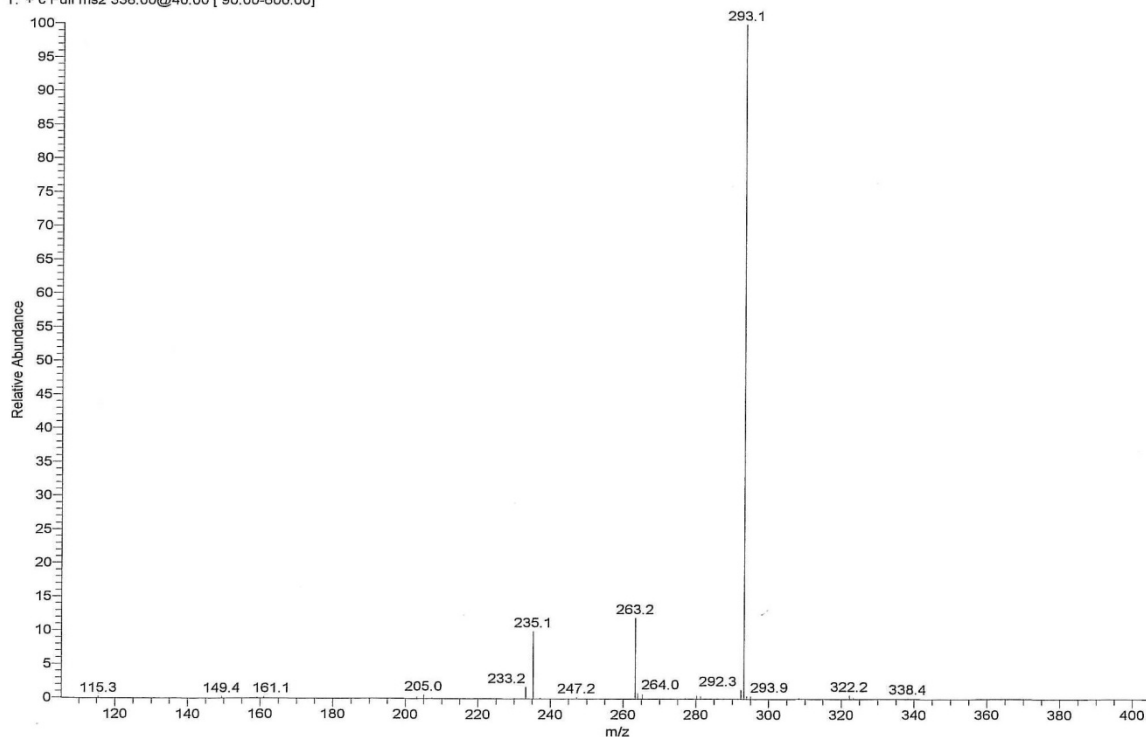


Obr. 14: <sup>13</sup>C-NMR spektrum allokryptopínu

## 5.2. Štruktúrna analýza kalifornidínu

### 5.2.1. MS štúdie kalifornidínu

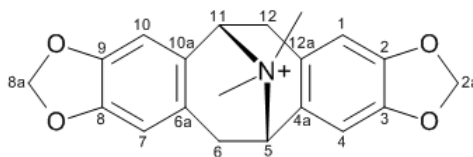
ESI-MS  $m/z$  338.2 [M]<sup>+</sup> (100), 293.2 (10). MS/MS  $m/z$  393.1 (100), 263.2 (18), 225.1 (10).

LLC 32 #1 RT: 0.01 AV: 1 NL: 6.02E7  
T: + c Full ms [ 95.00-600.00]LLC 32 MS2 338 #1 RT: 0.01 AV: 1 NL: 1.55E7  
T: + c Full ms2 338.00@40.00 [ 90.00-600.00]

Obr. 15: MS a MS/MS spektrum kalifornidínu

## 5.2.2. NMR štúdie kalifornidínu

Štruktúra izolovanej látky bola určená na základe interpretácie  $^1\text{H}$ - a  $^{13}\text{C}$ -NMR spektier a ich porovnania s dátami v literatúre<sup>23</sup>.

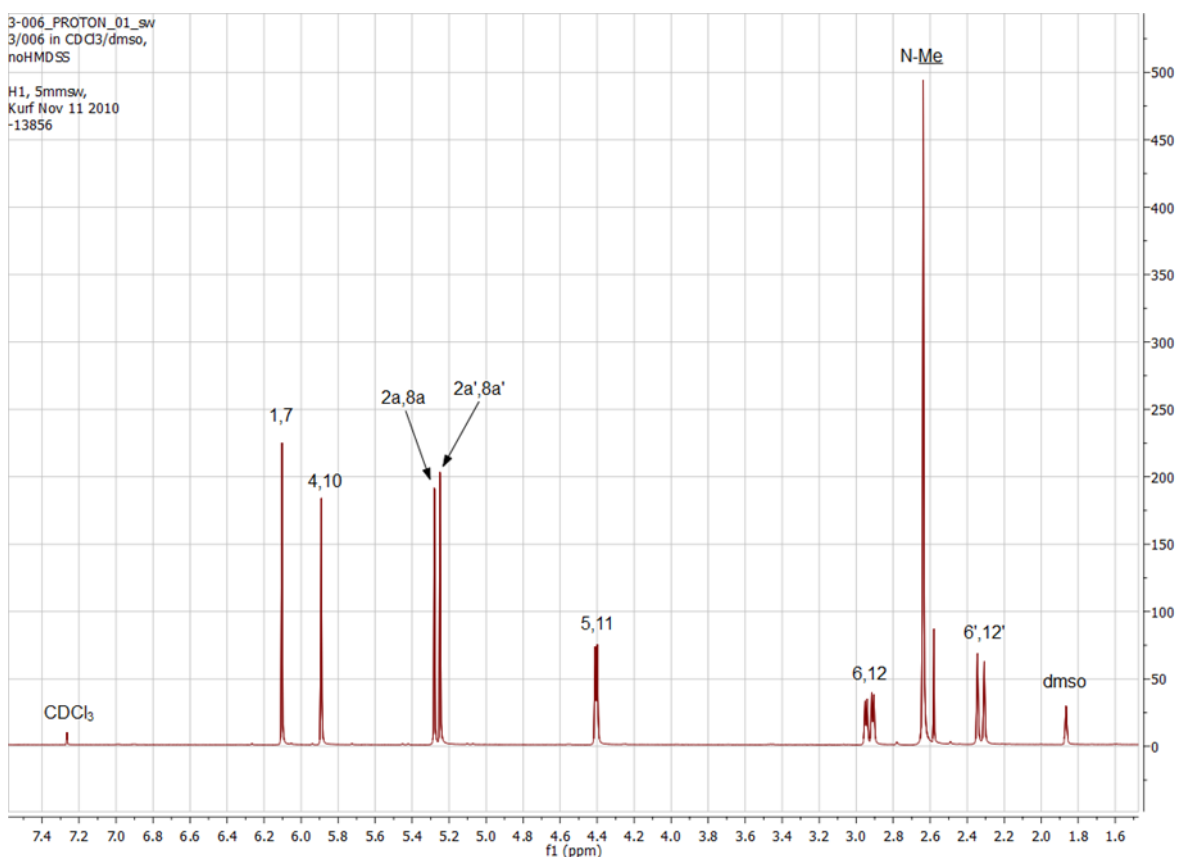


Obr. 16: Štruktúra kalifornidínu

### 5.2.2.1. $^1\text{H}$ -NMR spektrum kalifornidínu

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3/\text{DMSO}$ ,  $25^\circ\text{C}$ ):

2.51 s, 3H, H-14; 2.53 d ( $^2J_{\text{H}}=16.3$  Hz), 2H, H-6; 3.39 dd ( $^2J_{\text{H}}=16.3$  Hz,  $^3J_{\text{H}}=5.7$  Hz), 2H, H-6'; 3.95 d ( $^3J_{\text{H}}=5.7$  Hz), 2H, H-5; 5.81 d ( $^2J_{\text{H}}=1.5$  Hz), 2H, H-2a; 5.86 d ( $^2J_{\text{H}}=1.5$  Hz), 2H, H-2a'; 6.42 s, 2H, H-1; 6.58 s, 2H, H-4.

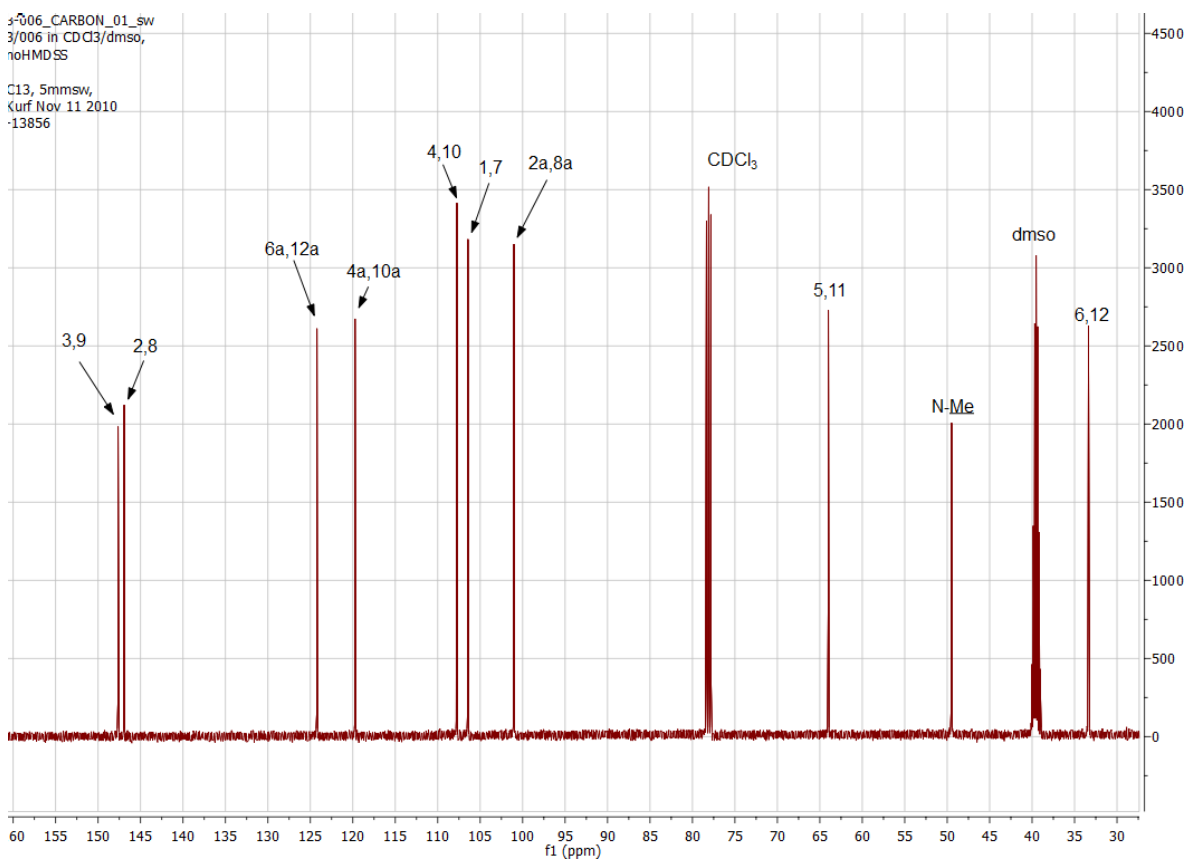


Obr. 17:  $^1\text{H}$ -NMR spektrum kalifornidínu

### 5.2.2.2. $^{13}\text{C}$ -NMR spektrum kalifornidínu

$^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ,  $25^\circ\text{C}$ ):

34.28, C-6; 41.07, C-14; 56.92, C-5; 100.08, C-2a; 107.25, C-4; 108.87, C-1; 125.21, C-6a; 131.24, C-4a; 146.19, C-X; 146.53, C-Y; Signály označené X, Y prislúchajú uhlíkom C-2 a C-3, nie je možné ich spoľahlivo priradiť.



Obr. 18:  $^{13}\text{C}$ -NMR spektrum kalifornidínu

## 5.3. Inhibičná aktivita voči HuAChE a HuBuChE

Izolované alkaloidy boli testované na ich inhibičnú aktivitu voči humánnej erytrocytarnej acetylcholinesteráze a sérovej butyrylcholinesteráze. Výsledky sú uvedené v nasledujúcej tabuľke (Tab. 4).

Tab. 4: *In vitro* inhibičná aktivita izolovaných alkaloidov voči HuAChE a HuBuChE

Látky	IC <sub>50</sub> (μM) <sup>a</sup>	
	HuAChE	HuBuChE
Allokryptopín	250 ± 22,2	530 ± 28,2
Kalifornidín	36,7 ± 0,9	>1000
Galantamín <sup>b</sup>	6,9 ± 0,3	156 ± 6,9
Huperzín A <sup>b</sup>	0,25 ± 0,01	>1000

<sup>a</sup> Každé meranie bolo opakované trikrát

<sup>b</sup> Referenčná látka

## 5.4. Antioxidačná aktivita

Získané alkaloidy boli podrobené testovaniu ich antioxidačnej aktivity. Výsledky sú uvedené v nasledujúcej tabuľke (Tab. 5).

Tab. 5: Antioxidačná aktivita izolovaných alkaloidov

Látky	EC <sub>50</sub> (μM) <sup>a</sup>
Allokryptopín	>1000
Kalifornidín	>1000
Kvercetrín <sup>b</sup>	25,3 ± 1,2
Trolox <sup>b</sup>	27,8 ± 0,8

<sup>a</sup> Každé meranie bolo opakované trikrát

<sup>b</sup> Referenčná látka

## **6. DISKUSIA**

Najúčinnejšími liečivami v terapii Alzheimerovej choroby sú v súčasnej dobe inhibítory AChE. Nedávny výskum ukázal, že aj enzým BuChE hrá významnú úlohu v regulácii hladiny acetylcholínu v mozgu, predovšetkým u pacientov trpiacich AD<sup>65</sup>. Preto sa neustále hľadajú nové, účinnejšie a z terapeutického hľadiska výhodnejšie látky vykazujúce inhibičnú aktivitu voči obom týmto enzýmom.

Predmetom tejto diplomovej práce bolo spracovanie výtrepku kvartérnych alkaloidov z *Eschscholtzia californica* CHAM. (Papaveraceae). Pomocou chromatografických a iných vyššie uvedených metód sa podarilo izolovať dva alkaloidy v čistej forme, ktoré boli následne podrobené štruktúrnej analýze a testovaniu ich biologickej aktivity.

Prvý izolovaný alkaloid bol na základe MS a NMR analýzy a porovnania dát s literatúrou identifikovaný ako allokryptopín. Je to terciárny izochinolínový alkaloid protopínového typu vyskytujúci sa v mnohých rodoch čeľade Papaveraceae (napr. *Eschscholtzia* spp., *Chelidonium* spp., *Glaucium* spp.<sup>66</sup>) a Fumariaceae (napr. *Corydalis* spp.<sup>67</sup>). Nachádza sa tiež v čeľadi Ranunculaceae (napr. *Thalictrum* spp.<sup>68</sup>) a Berberidaceae (napr. *Berberis densiflora*<sup>69</sup>). Jeho prítomnosť vo frakcii kvartérnych alkaloidov možno vysvetliť tým, že pri príprave výtrepku terciárnych alkaloidov nebol všetok allokryptopín vytrepaný.

Druhá izolovaná látka bola taktiež podrobená štruktúrnej analýze (MS a MNR štúdie) a po porovnaní dát s literatúrou bola identifikovaná ako kalifornidín. Kalifornidín je kvartérna báza pavinanovej štruktúry patriaca medzi izochinolínové alkaloidy, ktorá bola z tejto rastliny izolovaná už niekoľkokrát<sup>23,56</sup>. Izolovať sa ju podarilo aj z iných zástupcov rodu *Eschscholtzia*: *Eschscholtzia douglasii* (HOOK. et ARN.) WALP. a *Eschscholtzia glauca* GREENE<sup>23</sup>. Kalifornidín je pre tento rod unikátny a zo zástupcov iných rodov zatiaľ izolovaný nebol.

U oboch izolovaných alkaloidov boli uskutočnené štúdie na ich inhibičnú aktivitu voči erytrocytarnej HuAChE a sérovej HuBuChE. Inhibičná aktivita bola študovaná Ellmanovou spektrofotometrickou metódou s použitím 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoovej kyseliny (DTNB). Ako referenčné látky boli použité galantamín a huperzín A, významné inhibítory AChE. Galantamín je látka úspešne používaná v liečbe AD, huperzín A je seskviterpenický alkaloid izolovaný z *Huperzia serrata* (Thunb.) Trevis (Lycopodiaceae), ktorý je taktiež perspektívnym liečivom v terapii AD<sup>70</sup>.

Hodnota IC<sub>50</sub> allokryptopínu stanovená pre HuAChE bola 250 ± 22,2 μM a pre HuBuChE 530 ± 28,2 μM. Tieto hodnoty sú výrazne vyššie než hodnoty použitých štandardov (galantamín: IC<sub>50</sub> (HuAChE) = 6,9 ± 0,3 μM, IC<sub>50</sub> (HuBuChE) = 156 ± 6,9 μM,



huperzín A:  $IC_{50}$  (HuAChE) =  $0,25 \pm 0,01 \mu\text{M}$ ,  $IC_{50}$  (HuBuChE)  $>1000 \mu\text{M}$ ). Allokryptopín nevykazuje dostatočnú inhibičnú aktivitu a nie je možné ho považovať za látku potenciálne využiteľnú v terapii AD.

U kalifornidínu boli stanovené hodnoty  $IC_{50}$  (HuAChE) =  $36,7 \pm 0,9 \mu\text{M}$ ,  $IC_{50}$  (HuBuChE)  $>1000 \mu\text{M}$ . Inhibičná aktivita kalifornidínu voči AChE bola popísaná už skôr (61% inhibícia AChE pri koncentrácii  $10 \mu\text{M}$ <sup>71</sup>), avšak zdrojom enzýmu bol v tomto prípade elektrický úhor, preto získané výsledky nie je možné uspokojivo porovnať. Nami získané inhibičné hodnoty kalifornidínu voči AChE sú síce priaznivé, limitujúcim faktorom je však kvartérny charakter jeho molekuly, čo značne obmedzuje prechod hematoencefalickou bariérou a tým jeho pôsobenie v mozgu. Kalifornidín sa preto nejaví ako perspektívne liečivo v terapii AD.

Na základe skutočnosti, že v patogenéze AD hrá významnú úlohu aj oxidačný stres a voľné kyslíkové radikály, boli obidve látky testované na ich antioxidačnú aktivitu (DPPH test). V oboch prípadoch boli dosiahnuté hodnoty  $EC_{50}$  vyššie než  $1000 \mu\text{M}$ , tieto látky teda nevykazujú žiadnu terapeuticky významnú antioxidačnú aktivitu.

## **7. LITERATÚRA**

1. Vlček J., Fialová D. a kol.: *Klinická farmacie I.* 1. vyd. Grada, Praha 2010.
2. Preiss M. a kol.: *Klinická neuropsychologie.* 1. vyd. Grada, Praha 1998.
3. Fišar Z. a kol.: *Výbrané kapitoly z biologické psychiatrie.* 2. vyd. Grada, Praha 2009.
4. Koukolík F., Jiráček R.: *Diagnostika a léčení syndromu demence.* 1. vyd. Grada, Praha 1999.
5. Hartl J., Palát K.: *Farmaceutická chemie I.* 2. vyd. Karolinum, Praha 2007.
6. Marco L., do Carmo Carreiras M.: Galanthamine, a natural product for the treatment of Alzheimer's disease. *Recent Pat. CNS Drug Discov.* 2006, 1, 105-111.
7. Sramek J. J., Franckiewicz E. J., Cutler N. R.: Review of the acetylcholinesterase inhibitor galanthamine. *Expert Opin. Inv. Drug* 2000, 9, 2393-2402.
8. Čeladník M. a kol.: *Organická chemie.* Avicenum, Praha 1990.
9. Tomè F., Colombo M. L., Caldiroli L.: A comparative investigation on alkaloid composition in different populations of *Eschscholtzia californica* Cham. *Phytochem. Analysis* 1999, 10, 264-267.
10. Hostettmann K., Borloz A., Urbain A., Marston A.: Natural product inhibitors of acetylcholinesterase. *Curr. Org. Chem.* 2006, 10, 825-847.
11. Jahodář L.: *Farmakobotanika - semenné rostliny.* Karolinum, Praha 2006.
12. Dewick P.M.: *Medicinal natural products.* 2nd ed. Wiley, Chichester 2002.
13. ---: fireflyforest.net: <http://fireflyforest.net/firefly/2008/02/27/california-poppies-at-picacho-peak-state-park/>, vystavené dňa 27.2.2008.
14. Cheney R. H.: Therapeutic potential of *Eschscholtzia californica* herba. *Q. J. Crude Drug Res.* 1963, 3, 413-416.
15. ---: plants.usda.gov: <http://plants.usda.gov/java/profile?symbol=ESCA2>, vystavené dňa 25.12.2005.
16. Blaschek W., Ebel S., Hackenthal E., Holzgrabe U., Keller K., Reichling J., Schulz V.: *Hagers Handbuch der Drogen und Arzneistoffe.* HagerROM 2006. CD-Realisierung: Informatik II. Universität Würzburg. [ Programmversion 6.1 ]. Springer Medizin Verlag, Heidelberg 2006.
17. Hönemann. Preložila Čížková D.: *Botanika*, s. 349. 1.vyd. Slovart, Praha 2007.
18. ---: botany.cz: <http://botany.cz/cs/eschscholtzia-californica/>, vystavené dňa 5.2.2008.
19. ---: wikipedia.org: [http://en.wikipedia.org/wiki/File:Eschscholtzia\\_californica\\_i01.jpg](http://en.wikipedia.org/wiki/File:Eschscholtzia_californica_i01.jpg),

vystavené dňa 26.2.2008.

20. Hegnauer R.: *Chemotaxonomie der Pflanzen*. Vol. 5. Birkhäuser, Basel, Stuttgart 1969.
21. Duke J. A.: *CRC Handbook of Medicinal Herbs*. CRC Press, Boca Raton, FL. 1985.
22. Slavík J., Slavíková E.: On alkaloids from the aerial parts of three *Eschscholtzia* species. *Collect Czech. Chem. C*. 1986, *51*, 1743-1751.
23. Fabre N., Claparols C., Richelme S., Angelin M.-L., Fourasté I., Moulis C.: Direct characterization of isoquinoline alkaloids in a crude plant extract by ion-pair liquid chromatography - electrospray ionization tandem mass spectrometry: example of *Eschscholtzia californica*. *J. Chromatogr. A* 2000, *904*, 35-46.
24. Paul L. D., Maurer H. H.: Studies on the metabolism and toxicological detection of the *Eschscholtzia californica* alkaloids californine and protopine in urine using gas chromatography - mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* 2003, *789*, 43-57.
25. Cahlíková L., Macáková K., Kuneš J., Kurfürst M., Opletal L., Cvačka J., Chlebek J., Blunden G.: Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase Inhibitory Compounds from *Eschscholtzia californica* (Papaveraceae). *Nat. Prod. Commun.* 2010, *5* (7), 1035-1038.
26. Beck M.-A., Häberlein H.: Flavonol glycosides from *Eschscholtzia californica*. *Phytochemistry* 1999, *50*, 329-332.
27. Jain L., Tripathi M., Pandley V. B., Rücker G.: *Phytochemistry* 1996, *41*, 661-662.
28. Bilia A. R., Caldiroli L., Morelli I., Tomè F.: Pigments of *Eschscholtzia californica* Cham. flowers. *Plant Physiol. Bioch.* 1996, *34*, 317.
29. Maoka T., Fujiwara Y., Hashimoto K., Takeda S., Takaragaki S., Ida K.: A New retro-Carotenoid from the Petals of the Californian Yellow Poppy *Eschscholtzia californica*. *J. Nat. Prod.* 2000, *63*, 1288-1289.
30. Kácl K.: *Organická chemie*. Státní zdravotnické nakladatelství, Praha 1959.
31. Tomko J. a kol.: *Farmakognózia*. 2. vyd. Osveta, Martin 1999.
32. Bruneton J.: *Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal Plants*. 2nd ed. Lavoisier, Paris 1999. s. 784.
33. Teuscher E., Lindequist U.: *Biogene Gifte: Biologie, Chemie, Pharmakologie*. 2. Auf. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart 1994.
34. Cahlíková L., Hořčíčková Z., Opletal L., Macáková K., Kurfürst M.: Isochinolinové

- alkaloidy a jejich biologická aktivita. 38. *Konference Syntéza a analýza léčiv*, Hradec Králové, září 2009. Sborník abstraktů. s. 73.
35. Sturm S., Stuppner H.: Analysis of isoquinoline alkaloids in medicinal plants by capillary electrophoresis - mass spectrometry. *Electrophoresis* 1998, 19, 3026-3032.
36. Lee S.-S., Liu Y.-C., Chen C.-H.: Neocaryachine, a new pavine alkaloid from *Cryptocarya chinensis*, and NMR spectral properties of related alkaloids. *J. Nat. Prod.* 1990, 53, 1267-1271.
37. Stermitz F. R., McMurtrey K. D.: Alkaloids of the Papaveraceae. X. New alkaloids of *Argemone gracilentia*. *J. Org. Chem.* 1969, 34, 555-559.
38. Stermitz F. R., Stermitz J. R., Zanoni T. A., Gillespie J. P.: Alkaloids of the Papaveraceae. XXI. Alkaloids of *Argemone subintegrifolia* and *A. munita*. *Phytochemistry* 1974, 13, 1151-1153.
39. Wu J., Beal J. L., Wu W.-N., Dorskotch R. W.: Alkaloids of *Thalictrum*. XXIV. Isolation and identification of alkaloids from the tertiary phenolic fraction of *Thalictrum revolutum* tops. *Lloydia* 1977, 40, 593-601.
40. Urzúa A., Mendoza L.: Eschscholtzine-N-oxide from *Eschscholtzia californica*. *J. Nat. Prod.* 1986, 49 (5), 922-923.
41. Suchomelová J., Táborská E.: *HPLC studium kvartérních benzofenantridinových alkaloidů ve vybraných rostlinných druzích čeledi Papaveraceae*. Masarykova univerzita. Lékařská fakulta v Brně. Biochemický ústav, 2007. Dizertačná práce. 81 s.
42. Dostá, J., Slavík J.: Novější poznatky o sanguinarinu a příbuzných alkaloidech. *Chem. Listy* 2000, 94, 15-20.
43. Ahmad N., Gupta S., Husain M. M., Heiskanen K. M., Mukhtar H.: Differential antiproliferative and apoptotic response of sanguinarine for cancer cells versus normal cells. *Clin. Cancer Res.* 2000, 6, 1524-1528.
44. Chmura S. J., Dolan M. E., Cha A., Mauceri H. J., Kufe D. W., Weichselbaum R. R.: In vitro and in vivo activity of protein kinase C inhibitor chelerythrine chloride includes tumor cell toxicity and growth delay in vivo. *Clin. Cancer Res.* 2000, 6, 737-742.
45. Eley B. M.: Antibacterial agents in the control of supragingival plaque - a review. *Brit. Dent. J.* 1999, 186, 286-296.
46. Grenby T. H.: The use of sanguinarine in mouthwashes and toothpaste compared with some other antimicrobial agents. *Brit. Dent. J.* 1995, 178, 254-258.

47. Singh S., Jain L., Pandey M. B., Singh U. P., Pandey V. B.: Antifungal Activity of the Alkaloids from *Eschscholtzia californica*. *Folia Microbiol.* 2009, 54 (3), 204-206.
48. Manske R. H. F., Shin K. H.: The alkaloids of Papaveraceous plants. LIII. *Eschscholtzia californica*. *Can. J. Chem.* 1965, 43, 2180-2182.
49. Mištová T.: *Alkaloidy obsažené v čeledi Papaveraceae Juss.* Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická, 2009. Bakalárska práca. 40 s.
50. Ko F. N., Wu T. S., Lu S. T., Wu Y. C., Huang T. F., Teng C. M.: Antiplatelet effects of protopine isolated from *Corydalis tubers*. *Thromb. Res.* 1989, 56(2), 289-298.
51. Hrdina V. a spol.: *Přírodní toxiny a jedy*. Galén, Praha 2004.
52. Stuppner H., Sturm S., Mulinacci N., Vincieri F.: Capillary Zone Electrophoretic Analysis of the Main Alkaloids from *Eschscholtzia californica*. *Chromatographia* 1993, 37 (11/12), 579-605.
53. Rolland A., Fleurentin J., Lanhers M. C., Younos C., Misslin R., Mortier F., Pelt J. M.: Behavioural effects of the American traditional plant *Eschscholtzia californica*: sedative and anxiolytic properties. *Planta Medica* 1991, 57, 212-216.
54. Vincieri F. F., Celli S., Mulinacci N., Speroni E.: An approach to the study of the biological activity of *Eschscholtzia californica* Cham. *Pharmacol. Res. Commun.* 1988, 20 (5), 41-44.
55. Hanus M., Lafon J., Mathieu M.: Double-blind, randomised, placebo-controlled study to evaluate the efficacy and safety of a fixed combination containing two plant extracts (*Crataegus oxyacantha* and *Eschscholtzia californica*) and magnesium in mild-to-moderate anxiety disorders. *Curr. Med. Res. Opin.* 2004, 20, 63-71.
56. Gafner S., Dietz B. M., McPhail K. L., Scott I. M., Glinski J. A., Russell F. E., McCollom M. M., Budzinski J. W., Foster B. C., Bergeron C., Rhyu M.-R., Bolton J. L.: Alkaloids from *Eschscholtzia californica* and Their Capacity to Inhibit Binding of [<sup>3</sup>H]8-hydroxy-2-(di-N-propylamino)tetralin to 5-HT<sub>1A</sub> Receptors in Vitro. *J. Nat. Prod.* 2006, 69, 432-435.
57. Rössner P.: Alzheimerova choroba – diagnostika a léčba. *Neurologie pro praxi* 2004, 1, 11-16.
58. Silbernagl S., Lang F.: *Atlas patofyziologie člověka*, 1. vyd. Grada, Praha 2001.
59. Koukolík F., Jiráček R.: *Alzheimerova nemoc a další demence*. 1. vyd. Grada, Praha 1998.

60. Lincová D., Farghali H. et al.: *Základní a aplikovaná farmakologie*. 2. vyd. Galén, Praha 2007.
61. Jiráček R.: Farmakoterapie Alzheimerovy choroby. *Klin. Farmakol. Farm.* 2004, 18, 212-214.  
Stahl E.: *Thin-layer Chromatography, A Laboratory Handbook*. Springer Verlag, Berlin 1969.
62. Lincová D., Farghali H. et al.: *Základní a aplikovaná farmakologie*. 2. vyd. Galén, Praha 2007.
63. Doležal J.: *Biologická aktivita obsahových látek rostlin VIII. Vliv alkaloidů z různých rostlinných taxonů na acetylcholinesterázu*. UK v Praze. Farmaceutická fakulta v Hradci Králové. Hradec Králové, 2008. Diplomová práce. 65 s.
64. Steck T. L., Kant J. A.: Preparation of impermeable ghosts and inside-out vesicles from human erythrocyte membranes. *Method Enzymol.* 1974, 31, 172-180.
65. Greig N. H., Lahiri D. K., Sambamurti K.: Butyrylcholinesterase: an important new target in Alzheimer's disease. *Int. Psychogeriatr.* 2002, 14, 77-91.
66. Kintsurashvili L. G., Vachnadze V. Y.: Alkaloids of *Glaucium corniculatum* and *G. flavum* growing in Georgia. *Chem. Nat. Compd.* 2000, 36, 225-226.
67. Wang Q.-Z., Liang J. Y., Yuan Y.: Purification and identification of chemical constituents of *Corydalis saxicola*. *Zhongguo Tianran Yaowu.* 2007, 5, Chem. Abstr. 2007: 327047.
68. Kintsurashvili L. G., Vachnadze V. Y.: Alkaloids from *Thalictrum triternatum* Rupr., growing in Georgia. *Seriya Khimicheskaya* 1997, 23, 172-173.
69. Khamidov I. I., Aripova S. F., Telezhenetskaya M. V., Karimov A., Dzhenberov I.: Berberis alkaloids. XXXIX. New alkaloids from *B. densiflora*. *Chem. Nat. Compd.* 1997, 33, 323-325.
70. Ortega M. G., Agnese A. M., Cabrera J. L.: Anticholinesterase activity in an alkaloid extract of *Huperzia saururus*. *Phytomedicine* 2004, 11, 539-543.
71. Stejskal J., Kovář J., Slavík J.: Inhibition of acetylcholine esterase and butyrylcholine esterase with isoquinoline alkaloids. *Collect Czech. Chem. C.* 1985, 50, 2471-2479.

## **8. ZOZNAM SKRATIEK**



AD	Alzheimerova choroba
AChE	acetylcholinesteráza
APP	amyloidový prekursorový proteín
BuChE	butyrylcholinesteráza
CE	kapilárna elektroforéza
CNS	centrálny nervový systém
CYP	cytochróm P
DPPH	2,2'-difenyl-1-pikrylhydrazyl
DTNB	5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina
<i>E. californica</i>	<i>Eschscholtzia californica</i>
EBM	medicína založená na dôkazoch
EC	účinná koncentrácia
GABA	$\gamma$ -aminomaslová kyselina
GC	plynová chromatografia
HEB	hematoencefalická bariéra
HPLC	vysokoúčinná kvapalinová chromatografia
HuAChE	ľudská acetylcholinesteráza
HuBuChE	ľudská butyrylcholinesteráza
IC	inhibičná koncentrácia
IChE	inhibítor cholinesterázy
min.	minúta
MS	hmotnostná spektrometria
NMDA	N-metyl-D-aspartát
NMR	nukleárna magnetická rezonancia
SNRI	inhibítory spätného vychytávania serotonínu a noradrenalínu
SSRI	selektívne inhibítory spätného vychytávania serotonínu
TLC	tenkovrstvová chromatografia
vit.	vitamín

## ABSTRAKT

Bednaříková L.: Biologicky aktivní metabolity rostlin 4. Alkaloidy *Eschscholtzia californica* CHAM. a jejich biologická aktivita. Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra farmaceutické botaniky a ekologie, Hradec Králové, 2011. Diplomová práce. 65 s.

Predmetom diplomovej práce bolo spracovanie výtrepku kvartérnych alkaloidov z *Eschscholtzia californica* CHAM. (Papaveraceae). Pomocou stĺpcovej chromatografie boli izolované dva alkaloidy, ktoré boli následne podrobené štruktúrnej analýze (MS a NMR štúdie). Prvá látka bola identifikovaná ako terciárny alkaloid allokryptopín, druhým izolovaným alkaloidom bola kvartérna báza kalifornidín. Oba alkaloidy boli z *E. californica* izolované už pred tým.

Obidve látky boli testované na ich inhibičnú aktivitu voči ľudskej erytrocytarnej acetylcholinesteráze (HuAChE) a ľudskej sérovej butyrylcholinesteráze (HuBuChE). U allokryptopínu boli stanovené hodnoty  $IC_{50}$  (HuAChE) =  $250 \pm 22,2 \mu\text{M}$  a  $IC_{50}$  (HuBuChE) =  $530 \pm 28,2 \mu\text{M}$ . Hodnoty získané pre kalifornidín boli  $IC_{50}$  (HuAChE) =  $36,7 \pm 0,9 \mu\text{M}$  a  $IC_{50}$  (HuBuChE)  $>1000 \mu\text{M}$ . Ako pozitívny štandard bol použitý galantamín ( $IC_{50}$  (HuAChE) =  $6,9 \pm 0,3 \mu\text{M}$ ,  $IC_{50}$  (HuBuChE) =  $156 \pm 6,9 \mu\text{M}$ ) a huperzín A ( $IC_{50}$  (HuAChE) =  $0,25 \pm 0,01 \mu\text{M}$ ,  $IC_{50}$  (HuBuChE)  $>1000 \mu\text{M}$ ). V porovnaní so štandardom bol allokryptopín len málo aktívny. Inhibičná aktivita kalifornidínu voči HuAChE bola síce priaznivá, avšak kvartérna štruktúra jeho molekuly obmedzuje prechod hematoencefalickou bariérou. Ani jedna z látok sa teda nejaví ako perspektívne liečivo v terapii Alzheimerovej choroby.

Obidve látky boli podrobené aj štúdiu ich antioxidačnej aktivity. V oboch prípadoch boli dosiahnuté hodnoty  $EC_{50}$  vyššie než  $1000 \mu\text{M}$ , tieto látky teda nevykazujú žiadnu terapeuticky významnú antioxidačnú aktivitu.

Kľúčové slová: *Eschscholtzia californica* CHAM., izochinolínové alkaloidy, acetylcholinesteráza, butyrylcholinesteráza, Alzheimerova choroba.

## ABSTRACT

Bednaříková L.: Biologically active metabolites of plants 4. Alkaloids from *Eschscholtzia californica* CHAM. and their biological activity. Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Department of Pharmaceutical Botany and Ecology, Hradec Králové, 2011. Diploma thesis. 65 p.

The aim of the diploma thesis was to process the pool of quaternary alkaloids from *Eschscholtzia californica* CHAM. (Papaveraceae). By means of column chromatography two alkaloids were isolated and subsequently subjected to structural analysis (MS and NMR studies). The first substance was identified as a tertiary alkaloid allocryptopine, the second one was a quaternary base californidine. Both alkaloids have previously been isolated from *E. californica*.

Both substances were tested for their inhibitory activity against human erythrocyte acetylcholinesterase (HuAChE) and human plasma butyrylcholinesterase (HuBuChE). The measured values for allocryptopine were  $IC_{50}$  (HuAChE) =  $250 \pm 22,2 \mu\text{M}$  and  $IC_{50}$  (HuBuChE) =  $530 \pm 28,2 \mu\text{M}$ . Californidine's values were  $IC_{50}$  (HuAChE) =  $36,7 \pm 0,9 \mu\text{M}$  and  $IC_{50}$  (HuBuChE) >  $1000 \mu\text{M}$ . Galanthamine ( $IC_{50}$  (HuAChE) =  $6,9 \pm 0,3 \mu\text{M}$ ,  $IC_{50}$  (HuBuChE) =  $156 \pm 6,9 \mu\text{M}$ ) and huperzine A ( $IC_{50}$  (HuAChE) =  $0,25 \pm 0,01 \mu\text{M}$ ,  $IC_{50}$  (HuBuChE) >  $1000 \mu\text{M}$ ) were used as positive controls. In comparison to standard allocryptopine was little active. Although the inhibitory activity of californidine against HuAChE was promising, its quaternary structure restricts the transport through the blood-brain barrier. Nor allocryptopine neither californidine can be considered as a potential substance in Alzheimer's disease treatment.

Both alkaloids were also subjected to studies of their antioxidant activity. In both cases the resulting  $EC_{50}$  values were higher than  $1000 \mu\text{M}$ . These substances do not show any therapeutically significant antioxidant activity.

Keywords: *Eschscholtzia californica* CHAM., isoquinoline alkaloids, acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase, Alzheimer's disease.