

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

DIPLOMOVÁ PRÁCE

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

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

Hradec Králové, září 2012

Jan Rýdl

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpal, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Místo:

Datum:

.....

podpis

Mnohokrát děkuji panu doc. RNDr. Lubomíru Opletalovi, CSc. za odborné vedení diplomové práce, materiály a cenné rady při vypracování mé diplomové práce. Dále bych chtěl poděkovat pracovníkům katedry farmaceutické botaniky a ekologie za příjemné prostředí a dobré podmínky k práci.

OBSAH

1. ÚVOD	6
2. CÍL PRÁCE	10
3. TEORETICKÁ ČÁST	12
3.1 ALZHEIMEROVA CHOROBA A JEJÍ TERAPIE	13
3.1.1 Alzheimerova choroba	13
3.1.2 Terapie AD	15
3.1.2.1 Inhibitory mozkových cholinesteras, kognitiva	16
3.1.2.2 Antagonisté NMDA receptorů	20
3.2 ALKALOIDY S POTENCIÁLEM ÚČINKU PROTI ALZHEIMEROVĚ CHOROBĚ	22
3.2.1 Alkaloidy s cholinesterasovou aktivitou	22
3.2.1.1 Alkaloidy čeledi Amaryllidaceae	22
3.2.1.2 Alkaloidy čeledi Fabaceae	23
3.2.1.3 Alkaloidy čeledi Huperziaceae	24
3.2.1.4 Alkaloidy čeledi Lycopodiaceae	25
3.2.1.5 Alkaloidy čeledi Apocynaceae	26
3.2.1.6 Alkaloidy ostatních čeledí	27
3.2.2 Alkaloidy ovlivňující osud β-amyloidu a alkaloidy snižující jeho toxicitu	31
3.2.3 Alkaloidy inhibující fosforylaci τ-proteinu	33
3.2.4 Alkaloidy působící prostřednictvím nikotinových receptorů	33
3.2.5 Alkaloidy s jiným mechanismem účinku	35
3.3 PAPAVER SOMNIFERUM L. (MÁK SETÝ)	37
3.3.1 Synonyma	38
3.3.2 Systematika	38
3.3.3 Botanický popis	38
3.3.4 Drogy získávané z <i>Papaver somniferum</i> L.	40
3.3.4.1 Fructus Papaveris immaturi (nezralý plod máku setého)	40
3.3.4.2 Fructus Papaveris sine semine (maková sláma)	40
3.3.4.3 Opium crudum (surové opium)	40
3.3.4.4 Papaveris semen (semena máku setého)	40
3.3.5 Obsahové látky <i>papaver somniferum</i> l.	41
3.3.5.1 Alkaloidy	41
3.3.5.2 Ostatní obsahové látky	45
3.3.6 Biologická aktivita a farmakologie obsahových látek <i>papver somniferum</i> l.	46

3.3.6.1	Analgetická aktivita	47
3.3.6.2	Antitusická aktivita	47
3.3.6.3	Spasmolytická aktivita	48
3.3.6.4	Účinky opia	48
3.3.7	Využití <i>papaver somniferum</i> 1.	49
4.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	51
4.1	Obecné metody	52
4.2	Rostlinný materiál	52
4.3	Příprava extraktů	52
4.4	Tenkvrstvá chromatografie (TLC)	55
4.5	Chemikálie, rozpouštědla a další potřeby	56
4.6	Izolace a stanovení struktury izolovaných látek	58
4.6.1	Dělení výtřepku ADd pomocí TLC	58
4.6.2	Zpracování zóny č. 1	59
4.7	Stanovení cholinesterasové inhibiční aktivity (ic_{50})	60
4.8	Stanovení antioxidační aktivity	61
5.	VÝSLEDKY	62
5.1	Stanovení struktury JR-1	63
5.1.1	MS studie morfinu	63
5.1.2	NMR studie morfinu	64
5.2	Stanovení cholinesterasové inhibiční aktivity	64
6.	DISKUSE	66
7.	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	70
8.	LITERATURA	73

1. ÚVOD

V druhé polovině minulého století se v lidské populaci začala ve větší míře objevovat skupina onemocnění, která byla dříve méně běžná, nebo jsme je neuměli diagnostikovat. K tomu pomohl rozvoj lékařských věd, nové poznatky v oblasti diagnostiky onemocnění, postupy léčby a léčby dalších, dříve neléčitelných onemocnění, sociální a hygienický standard, začal stoupat průměrný věk obyvatelstva. Společným jmenovatelem těchto onemocnění je především stres, vyplývající z rychlého tempa našeho života, špatné stravovací zvyky, nízká pohybová aktivita, vysoký příjem alkoholu a kouření cigaret. Tento životní styl je charakteristický převážně pro obyvatele velkých měst, kde je právě výskyt stresu, napětí a tím pádem i těchto onemocnění, nejvyšší.

Onemocnění můžeme pojmenovat jako civilizační choroby, tedy choroby vzniklé v důsledku životního stylu moderní doby. Patří k nim velmi mnoho onemocnění. Nejčastěji se vyskytující jsou: arteriální hypertenze, cukrovka, ateroskleróza a infarkt myokardu a cévní mozková příhoda, obezita, nádorová onemocnění, vrozené vývojové vady, alergie, revmatická onemocnění, únavový syndrom, deprese a demence. Demence je stále častěji se vyskytující onemocnění, nejběžnější formou je Alzheimerova choroba, neurodegenerativní onemocnění.

U neurodegenerativních onemocnění dochází k předčasnému zániku nervových buněk, neuronů nebo k jejich degeneraci. Často mají genetický podklad, postupné zhoršování symptomů onemocnění v průběhu času a patří mezi zdravotně a sociálně – ekonomicky nejzávažnější. Zahrnují Parkinsonovu chorobu a jiné parkinsonické syndromy, Alzheimerovu chorobu, Friedreichovu nemoc a spinoceberelární atrofie, amyotrofickou laterální sklerózu a další onemocnění projevující se omezením volního pohybu, třesem, choreou, dystonií, myoklonem, tikem a jinými abnormálními pohyby, demencí a dalšími kognitivními poruchami.¹

Parkinsonova choroba propuká nejčastěji mezi 50. a 60. rokem života s prevalencí 80 – 180 nemocných na 100 000 obyvatel, tzn., že asi každý 1000. obyvatel je nemocný. V populaci starší 60 let je prevalence až 1 %. Nových případů nemoci v roce, tedy incidence nemoci, je asi 20 nemocných na 100 000 obyvatel. Za příčinou vzniku Parkinsonovy choroby stojí nedostatečné množství dopaminu v nigrostriatálním systému a tím vzniká převaha cholinergní stimulace. Výsledkem je hypokineticko – hypertonický syndrom charakterizovaný zpomalením pohybů s drobnými kroky, třesem a ztuhlostí svalů. Rozvijí se porucha postoje, chůze, motoriky

potřebné pro každodenní činnosti, porucha řeči a také psychická onemocnění a demence. Momentálně je nemoc nevyléčitelná, avšak současná farmakoterapie dobře potlačuje symptomy nemoci doplněním dopaminu.

Friedreichova nemoc (ataxie) je autozomálně recesivní neurodegenerativní onemocnění s frekvencí výskytu 1:50 000 v Evropské populaci.² Jedná se o onemocnění míchy a mozečku, způsobující poruchy koordinace pohybů, reflexů a citlivosti. Onemocnění pomalu progreduje už od dětství, obvykle se začíná projevovat před 10. rokem.

Amyotrofická laterální skleróza je onemocnění s progresivním zánikem motoneuronů v předních rozích míšních i v centrálním nervovém systému. Z motoneuronů vychází nervová vlákna vedoucí k nervosvalové ploténce na kosterním svalstvu. Výsledkem je svalová atrofie, spastické jevy, fascikulace, únava a ztráta hmotnosti se zachováním intelektu.

Alzheimerova choroba je nejčastěji se vyskytující neurodegenerativní onemocnění a zároveň nejčastější forma demence. Je to civilizační onemocnění s postupnou ztrátou cholinergní transmisy a tím nastává degenerace nervových a kognitivních funkcí. Postupně dochází ke zhoršení paměti a řeči, řeč se stává chudou a významově nesmyslnou. Vyvíjí se dezorientace v prostoru i čase a nemocný je stále více závislý na pomoci okolí. Projevují se bludy, halucinace, poruchy chování a někdy dokonce agresivita.

K terapii nemoci se používají inhibitory acetylcholinesterasy, enzymu, který v mozkové tkáni rozkládá acetylcholin. Tyto látky však nemoc neléčí, ale zpomalují její progresi právě tím, že zvyšují množství acetylcholinu v mozku a tím zlepšují nervové i kognitivní funkce. V současnosti se předpokládá, že cholinesterasy (acetylcholinesterasa a butyrylcholinesterasa) mají hlavní roli při vzniku a progresi tohoto onemocnění.

Studium přírodních látek na katedře farmaceutické botaniky a ekologie je zaměřeno právě na látky vykazující inhibiční aktivitu vůči cholinesterasám. Na katedře vznikl tým pracovníků ADINACO (Alzheimer Disease and Natural Compounds), který se zaměřil na izolaci těchto přírodních inhibitorů. Provádí se screening vybraných taxonů z hlediska obsahu isochinolinových alkaloidů, a to zejména z čeledi Papaveraceae a Fumariaceae. Jedním ze

zástupců čeledi Papaveraceae je i mák setý *Papaver somniferum* L., u jehož některých alkaloidů se předpokládá aktivita vůči lidským cholinesterasám.

2. CÍL PRÁCE

Cíl mé diplomové práce byl:

1. Nalezení optimální mobilní fáze pro kontrolní TLC směsi alkaloidů – v jednotlivých typech výtřepků ze základního extraktu ze suchých tobolek *Papaver somniferum* podle pH a polaritý látek.
2. Výběr jednoho z výtřepků a jeho zpracování tenkovrstvou chromatografií s cílem získat minimálně jeden alkaloid v čistém stavu.
3. Určení jeho základní fyzikálně-chemické charakteristiky.
4. Podílení se na stanovení biologické aktivity alkaloidu (antioxidační aktivita DPPH, zjištění inhibice lidské acetylcholinesterasy a bytyrylcholinesterasy).

3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1 ALZHEIMEROVA CHOROBA A JEJÍ TERAPIE

3.1.1 Alzheimerova choroba

Alzheimerova choroba je nejčastější příčinou demence. Představuje 50 – 60 % všech demencí a dalších asi 10 % demencí je smíšené etiologie, kde se kromě charakteristických změn podílejí i ischemicko-vaskulární změny. Alzheimerova choroba je progresivní neurodegenerativní onemocnění, projevující se syndromem demence, které je poměrně dobře definováno patologickými nálezy (*post mortem*), společnými pro všechny postižené. Na druhou stranu však existuje individuální variabilita, co se týče doby vzniku, rychlosti progresu i některých dalších klinických odchylek. Značně se mohou lišit genetické predispozice jednotlivých pacientů, i množství a druh nejrůznějších faktorů ovlivňujících rozvoj a průběh choroby.³

Alzheimerova choroba je nemocí vyššího věku a s rostoucím věkem stoupá riziko jejího vzniku. Nejčastěji se choroba objevuje okolo 60. roku, v ojedinělých případech může nemoc propuknout již kolem 40. roku. Tuto formu označujeme jako presenilní demenci Alzheimerova typu. Ve skupině šedesátipětiletých trpí nemocí 2 – 3 % a každých 5 let se toto procento zdvojnásobuje. Ve skupině osmdesátiletých je postižena již asi polovina populace. V současnosti se odhaduje počet nemocných na celém světě okolo 36 milionů, v České republice na 80 000.⁴

Mezi rizikové faktory pro vznik Alzheimerovy choroby (AD) patří již zmíněný věk, rodinná anamnéza a dědičnost. Rizikové geny společně s vlivem prostředí zvyšují pravděpodobnost vzniku onemocnění, ten ale nezaručují. Rizikový gen s nejsilnějším vlivem se váže především k apolipoproteinu E-e4 (ApoE-e4). Odhaduje se, že ApoE-e4 může být ve 20 až 25 procentech zodpovědný za vznik Alzheimerovy choroby. Další genetické faktory, které korelují s předčasným vznikem AD, jsou geny kódující tři bílkoviny: amyloidový prekurzorový protein (APP), presenilin 1 a presenilin 2 (PS1 a PS2). Dále to jsou časté pády spojené s úrazem hlavy, nebo častá ztráta vědomí a kardiovaskulární onemocnění. Přesné příčiny vzniku nemoci ale dodnes známy nejsou.⁵

Vývoj AD je rozdělen do 7 fází, ale u každého nemocného se může AD vyvíjet rozdílně. V 1. fázi ještě nedochází k poruše paměti, následuje 2. fáze s lehkým zapomínáním, hledáním každodenních předmětů. Třetí fáze je charakteristická poklesem paměti a koncentrace,

zapomínáním jmen a slov, přibývají problémy s plánováním. Ve 4. fázi dochází ke ztrátě krátkodobé paměti, k potížím s plněním složitějších úkolů, k problémům v duševní aritmetice (např. počítat pozpátku). Nastupuje 5. fáze se středně těžkou poruchou kognitivních funkcí charakteristická výraznými změnami v paměti a myšlení, které se stávají dost nápadné. Stále si pamatují významné podrobnosti o sobě a své rodině a jsou sociálně soběstační. V 6. fázi se paměť stále zhoršuje. Svoje jméno si ještě pamatují, mají ale výrazné problémy s identifikací tváří, dochází ke změně osobnosti, potřebují pomoc s každodenními činnostmi, spánek se stává nekvalitním. V závěrečné 7. fázi AD lidé ztrácejí schopnost reagovat na jejich prostředí, pokračovat v konverzaci a nejsou schopni kontrolovat pohyby. Mohou ještě říkat slova nebo fráze. V této fázi potřebují hodně pomoci s jejich každodenní osobní péčí, včetně stravování a použitím toalety. Mohou také ztratit schopnost usmívat se, sedět bez podpory a držet hlavu nahoru. Reflexy jsou abnormální, svaly tuhnou, je zhoršené polykání.⁶ Vývoj k poslední fázi nastává v průběhu 5 – 15 let.⁷

Patogeneze dosud nebyla objasněna, diagnostika AD však může být velmi přesná. Vedle sledování chování a kognitivních funkcí se dnes používají moderní zobrazovací metody jako CT, MR, PET. Některé změny jsou diagnostikovány až *post mortem*, a k těm základním histopatologickým a neuropatologickým nálezům patří:

- tvorba β -amyloidu a formace plak, amyloidová angiopatie, degenerace τ -proteinu,
- atrofie mozku, selektivní zánik především acetylcholinergních neuronů,
- zánětlivá reakce, působení volných kyslíkových radikálů a oxidační stres,
- nadměrná tvorba a činnost vápníkových kanálů, závislých na potenciálu neuronu.^{3,7}

Velmi důležitý nález u AD je tvorba patologických proteinů. β -amyloid je významný degenerativní protein, který tvoří základ plak. Zde tvoří polymerovaný β -amyloid jádra, kolem kterých dochází k odumírání neuronů, vzniká gliový lem, dochází k projevům sterilního zánětu (akutní reakční fáze). Primárním zdrojem β -amyloidu je tzv. APP. Za fyziologických podmínek je štěpen enzymem α -sekretasou na fragmenty o 40 aminokyselinách. Tyto fragmenty (beta-

peptid) jsou solubilní a mají své důležité fyziologické role, např. při zajišťování neuronální plasticity a neuroprotektivním působení. Za patologických podmínek se uplatňuje také enzym β -sekretasa a asi i γ -sekretasa, které štěpí APP a vznikají delší fragmenty (o 42, nebo 43 aminokyselinách). Toto patologické štěpení APP je u části nemocných geneticky podmíněno na dlouhém raménku 21. chromozomu (možná genetická příbuznost s Downovým syndromem). U malé části nemocných, zejména u nemocných s familiárním výskytem a časným začátkem choroby, se toto podmínění váže na 1. a 14. chromozom (tyto geny jsou označovány jako preseniliny PS1, PS2). Zmnožené a atypické fragmenty APP přestávají být solubilní, začínají koagulovat a tím vzniká β -amyloid. Uvažuje se, že ke koagulaci dosud solubilních fragmentů APP přispívá přítomnost ApoE-e4, látka tělu vlastní, účastní se např. při transportu cholesterolu. Amyloid se také ukládá ve stěnách cév, vzniká amyloidní angiopatie. Zánětem se aktivují buňky mikroglie i astrocyty. V rámci akutní reakční fáze dochází k uvolnění cytokinů a volných kyslíkových radikálů. Tyto skupiny pak způsobí další neurodegenerativní změny, např. volné kyslíkové radikály peroxidují lipidy buněčné membrány neuronů a takto postižené neurony pak zanikají. Při zániku neuronů jsou nadměrně uvolňovány excitační aminokyseliny (glutamát, aspartát), které se váží v CNS na své receptory. Hyperexcitace tzv. ionotropních receptorů (např. receptor NMDA), spojených s otevřením vápníkového kanálu, vede k nadměrnému influxu Ca^{2+} do neuronů. Tím dochází k destabilizaci vnitřního prostředí neuronů a k aktivaci proteinkinas. Konečným důsledkem tohoto pochodu je neuronální smrt. Při tom dochází k opětovnému uvolnění excitačních aminokyselin, a tím ke kaskádové reakci. U AD dochází také k nadměrné aktivaci (pravděpodobně i k nadměrné tvorbě) vápníkových kanálů, které nejsou ve spojení s receptorem, ale jejich průchodnost je závislá na potenciálu neuronální membrány. Výsledek této aktivace pak je stejný jako výsledek toxicity excitačních aminokyselin.³ Odumíráním neuronů klesá i množství neuromediátorů a enzymů, pro AD důležitý acetylcholin (ACh) a cholinacetyltransferasa (CAT), enzym tvořící ACh z cholinu a AcCoA.

3.1.2 Terapie AD

V současnosti je zatím jen malé procento demencí vyléčitelných. Terapií demencí se dosahuje

lepších kognitivních i nekognitivních funkcí, ale základem terapie je zpomalení progresu onemocnění a tím oddálení těch nejzávažnějších stádií. Terapie AD vychází ze zatím známých etiologických poznatků. Současná terapie AD zlepšuje paměťové a výkonostní funkce, dle EBM (medicíny založené na důkazech) pomocí dvou terapeutických přístupů:

- inhibitorů mozkových cholinesteras
- antagonisté ionotropních glutamatergických NMDA receptorů⁸

3.1.2.1 Inhibitory mozkových cholinesteras, kognitiva

Užití inhibitorů cholinesteras je dnes nejčastěji používaný přístup v terapii mírných a středně závažných forem AD. Inhibitory cholinesteras svým centrálním cholinomimetickým působením vyrovnávají deficit cholinergního systému blokadou enzymů cholinesteras. Inhibicí těchto enzymů dochází ke zvýšení koncentrace endogenního ACh na všech místech, na kterých působí jako neurotransmiter.⁹ Tyto látky zlepšují paměťové funkce a pozornost, označujeme je proto jako kognitiva.

Hlavní zdroj centrální cholinergní aktivity vychází z eferentních neuronů v nucleus basalis Meynerti, bazálních ganglií předního mozku, odkud bohatě proniká do ostatních částí mozku. Ztráta cholinergní transmise nastává především v hippocampu, mozkové kůře a nucleus basalis Meynerti.¹⁰ Dochází ke snížení počtu synapsí i plasticity neuronů. U AD se jedná o poruchu především v presynaptickém cholinergním neuronu, snížena je funkce CAT. Je snížen transport cholinu, hlavního substrátu CAT, do neuronu. Snížené je i vyplavení ACh do synaptické štěrbině.

Účinek ACh je zprostředkován presynaptickými i postsynaptickými nikotinovými a muskarinovými receptory, přičemž stimulace presynaptických nikotinových receptorů usnadňuje vyplavení ACh. Působení ACh v synaptické štěrbině je ukončeno cholinesterasou rozkládající ACh zpět na cholin a acetát.

V lidském mozku převládají dva typy cholinesteras - acetylcholinesterasa (AChE) a butyrylcholinesterasa (BuChE). AChE existuje ve dvou izoformách, G1 a G4. U AD stoupá množství formy G1 a výrazně klesá množství rozpustné tetramerní formy G4. U pacientů s AD se zvyšuje aktivita BuChE, zatímco aktivita AChE zůstává buď stejná, nebo klesá.¹¹ AChE se

vyskytuje především v cholinergních neuronech a v okolí cholinergních synapsí, BuChE je spojena s gliovými buňkami, kterými je produkována. Nachází se dále v klubíčcích (tangles), neuritových placích, endoteliálních buňkách a neuronech. Obě cholinesterasy se liší svou reakční kinetikou v závislosti na koncentraci ACh. Při nízkých koncentracích ACh je BuChE velmi málo aktivní, naopak je tomu při vysokých koncentracích ACh, kdy aktivita BuChE stoupá. Během vysoké mozkové aktivity může lokálně na cholinergních synapsích dosáhnout ACh mikromolární úrovně, což se stává inhibiční hladinou pro AChE, a svou roli přebírá BuChE. Proto je možná BuChE spojena s gliovými buňkami, aby podporovala hydrolýzu ACh a zachovala tak normální cholinergní funkce.¹² Tím pádem se BuChE stala novým cílem v terapii AD.

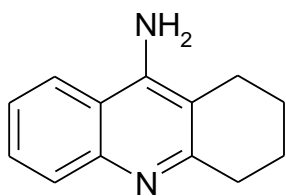
Všechny inhibitory AChE mají podobný princip účinku, rozdíly mezi působením jednotlivých inhibitorů jsou založeny na povaze reakce mezi inhibitorem a AChE, a tedy i rozdílnou rychlostí uvolňování (deacylací) enzymu. Inhibitory se liší svou chemickou strukturou i fyzikálně-chemickými vlastnostmi. Právě na fyzikálně-chemických vlastnostech závisí schopnost inhibitorů pronikat do CNS a působit centrálním účinkem. Na chemické struktuře závisí trvání inhibice. Základním dělením je reverzibilní a ireverzibilní účinek, a s chemickou strukturou je spojena schopnost stimulovat i určitý typ cholinergních receptorů přímo. Všechny inhibitory s kvarterním dusíkem mají vlastní nikotinové účinky, ty ale na rozdíl od inhibitorů s terciárním dusíkem do CNS nepronikají.⁹

Prvním používaným inhibitorem s vystupňovaným centrálním účinkem byl takrin a pro svůj hepatotoxický účinek se již nepoužívá. V roce 1996 se začal používat reverzibilní inhibitor donepezil a krátce po něm inhibitor karbamátového typu rivastigmin. Dalším je dnes již synteticky vyráběný benzazepinový alkaloid galanthamin, dříve získávaný izolací ze sněženky *Galanthus woronowii* (Amaryllidaceae).¹³

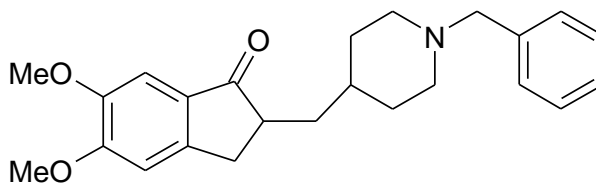
Podle typu inhibice AChE rozdělujeme inhibitory na:

- reverzibilní: takrin (I), donepezil (II), galanthamin (III)
- pseudoireverzibilní: rivastigmin (IV)
- ireverzibilní: metrifonát (V), organofosfáty (VI) (sarin, tabun)^{9,13}, organofosfáty

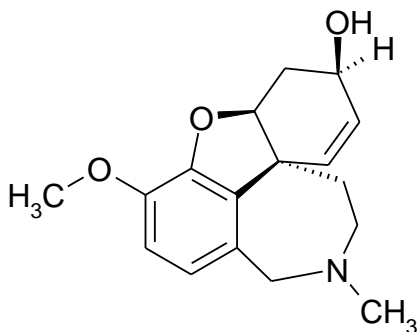
jsou pro svůj ireverzibilní účinek pro terapii AD nepoužitelné



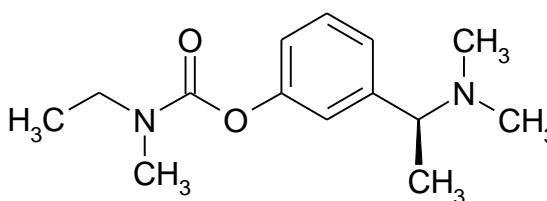
I



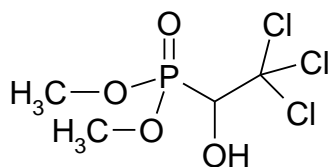
II



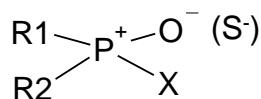
III



IV



V



$R_{1,2}$ = alkoxy, alkyl, subst. amidoskupina
 X = halogen, kyano, fenoxyskupina

VI

V praxi jsou v ČR používány tři inhibitory AChE: donepezil (Aricept®, Yasnal®), rivastigmin (Exelon®, Prometax®) a galanthamin (Reminyl®).

Donepezil (Aricept®) je reversibilní nekompetitivní inhibitor acetylcholinesterasy s relativně vysokou selektivitou účinku v CNS, schválený k léčbě mírné, středně těžké a těžké AD.⁹ Svůj účinek uplatňuje přes různé mechanismy, včetně stimulace nikotinových receptorů, zmírnění excitotoxicity a ovlivnění zpracování APP. Je tisíckrát účinnějším inhibitorem AChE než BuChE, která se vyskytuje převážně mimo CNS. Donepezil se užívá jednou denně večer před spaním v dávce 5 nebo 10 mg, ustálený stav je dosažen do 3 týdnů od začátku terapie. U pacientů, kteří se zúčastnili klinických studií, způsobilo podání donepezilu inhibici AChE o 63,6

% a 77,3 % v závislosti na dávce (měřeno v membránách erytrocytů). Aricept způsobil na dávce závislé, signifikantní statistické zvýšení procenta nemocných, kteří byli vyhodnoceni jako respondéři na léčbu.^{15,16} Dlouhodobé podávání donepezilu hraje pozitivní roli při remodelaci srdce po infarktu myokardu a jedna studie naznačuje snížení rizika ruptury srdeční komory během akutní fáze infarktu myokardu u myši.¹⁷

Rivastigmin (Exelon®) je centrálním cholinomimetikem karbamátového typu s inhibiční aktivitou vůči AChE a BuChE. Při prvním průchodu játry je intenzivně metabolizován na jeho dekarbamoylovaný derivát, který je záhy detekovatelný v mozkomíšním moku s c_{max} již za 1,4 až 3,8 hodin. Označuje se jako pseudoireverzibilní, protože inhibuje AChE až na 10 hodin vznikem karbamoylové vazby, podstatně odolnější vůči hydrolýze, kterou rozkládá samotná AChE. Inhibuje především G1 izoformu AChE, afinita k BuChE je 10x nižší. Je schválen pro léčbu mírné a středně-těžké AD ve formě tablet pro perorální podání ve dvou denních dávkách, anebo transdermální náplastí aplikovanou 1x denně s výrazně nižšími nežádoucími účinky, jako jsou nevolnost, křeče GIT, průjemy a polyurea. Rivastigmin je schválen i pro léčbu demence doprovázející Parkinsonovu chorobu.^{9,13,15,18}

Galanthamin (Reminyl®) je benzazepinový terciární a centrálně působící alkaloid prvně izolovaný ze sněženky *Galanthus woronowii*. Dále se vyskytuje v bleduli letní *Leucojum aestivum* a v rodu narcis. Všechny rostliny jsou z čeledi Amyrillidaceae. Galanthamin je slabší reverzibilní inhibitor AChE než jiné, klinicky dostupné inhibitory, ale terapeutický efekt na kognitivní funkce je srovnatelný. Má slabou inhibiční aktivitu vůči BuChE a stimuluje pre- i postsynaptické nikotinové receptory. Galanthamin se jako alosterický modulátor na nikotinových receptorech, především podtypech $\alpha 4\beta 2$ a $\alpha 7$, váže na odlišné místo receptoru, než na kterém působí ACh a agonisté nikotinových receptorů. Váže se na alosterické místo receptoru, čímž posiluje činnost (zcitlivuje) nikotinových receptorů v přítomnosti ACh. Pozitivní modulací postsynaptických nikotinových receptorů dochází k zesílení cholinergní transmise a aktivace presynaptických nikotinových receptorů (umístěných nejen na acetylcholinových neuronech), vede ke zvýšení syntézy a uvolňování jak acetylcholinu, tak i některých dalších neurotransmiterů

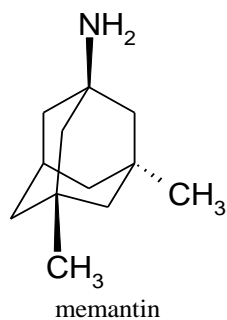
jako je dopamin, serotonin, GABA a glutamát. Další mechanismus účinku je neuroprotektce. Galanthamin přímo navyšuje antiapoptotický element bcl-2, aktivací $\alpha 7$ nikotinových receptorů brání jejich zániku vlivem β -amyloidu, chrání neurony před toxicitou β -amyloidu a usměrňuje štěpení proteinového prekurzoru amyloidu vytvářením solubilního metabolitu. Galanthamin se z GIT absorbuje v průběhu 0,5 – 2 hodin s téměř 100% biologickou dostupností. Účinnost galanthaminu byla ověřována řadou klinických studií. Na počátku terapie došlo ke zlepšení kognitivních funkcí, postupně se vyrovnaly na výchozí hodnoty, kde se držely 12 – 18 měsíců a poté se zhoršovaly. Galanthamin rovněž pozitivně ovlivňoval poruchy chování a psychotické stavy, udržel sociální aktivitu a výrazně snižoval dobu k ošetřování nemocných. Galanthamin byl dobře snášen a z nežádoucích účinků oproti placebo byly častější GIT obtíže, závratě a bolesti hlavy. Galanthamin je prokazatelně terapeuticky úspěšným duálním cholinergním kognitivem s neuroprotektivními účinky, který zlepšil nebo zabránil zhoršení Alzheimerovy a smíšené demence po dobu 12 – 18 měsíců a vaskulární demence po 21 – 36 měsíců, a výrazně zpomalil jejich další progresi.^{9,19,20,21}

3.1.2.2 Antagonisté NMDA receptorů

Glutamát je hlavní excitační neurotransmitter, který umožňuje přenos až na 60% synapsí v CNS, především v hippocampu a neokortexu a fyziologicky ovlivňuje učení a paměť. Glutamát se váže na ionotropní receptory NMDA (*N*-methyl -*D*-aspartát) a AMPA (α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazopropionová kyselina), které umožňují rychlý vstup kationtů (Na^+ , K^+ , Ca^{2+}) do nitra buněk. Aktivace NMDA receptorů může mít různý vliv na osud neuronů v závislosti na jejich umístění. Synaptické NMDA receptory mají neuroprotektivní působení, extrasynaptické způsobují neuronální smrt nebo neurodegenerativní procesy. Poslední data ukazují, že chronická aktivace extrasynaptických NMDA receptorů vede k trvalému uvolňování β -amyloidu, a mohla by být zapojena v patogenezi AD.^{22,23}

Memantin (Ebixa®) je nekompetitivní antagonist NMDA receptorů. Na rozdíl od jiných antagonistů memantin antagonizuje především extrasynaptické receptory, zatímco

k synaptické aktivitě je relativně šetrný. Proto je dnes jediným schváleným antagonistou NMDA receptorů v terapii demence. Memantin chrání neurony před neurotoxickým (excitotoxickým) působením glutamátu tím, že nahradí v iontovém kanálu Mg^{2+} (za fyziologického stavu je jím blokován) a blokuje vstup Ca^{2+} do buněk. Je nízce afinní a napětově závislý, takže po presynaptickém impulzu rychle opouští iontový kanál a umožňuje funkci glutamátu v procesu učení a paměti. Přílišná excitace a neurotoxicita glutamátu je blokována v koncentracích memantinu 7 – 10 krát nižších než jsou ty, které blokují všechny impulzy, nutné k dlouhodobé potenciaci receptorů, která tvoří základ pro formování neuronální paměti a synaptické plasticity. Z toho vyplývá, že memantin blokuje patologickou, ale umožňuje fyziologickou funkci NMDA receptorů. Memantin také antagonizuje serotoninové 5-HT₃ receptory a potlačuje tak nevolnost a narušenou GIT motilitu. Toho se využívá v kombinální terapii s inhibítorem AChE, donepezilem, ke zmírnění GIT nežádoucích účinků. Neuroprotektce memantinu zahrnuje ochranu neuronů nejen před toxickými koncentracemi glutamátu, ale i β -amyloidu či τ -proteinu, hypoxií a hypoglykemií a dalšími mozkovými inzulty. Dle provedených studií je schválen pro léčbu středně těžké a těžké AD a lehčích a středně těžkých vaskulárních demencí.^{22,23}



3.2 ALKALOIDY S POTENCIÁLEM ÚČINKU PROTI ALZHEIMEROVĚ CHOROBĚ

3.2.1 Alkaloidy s cholinesterasovou aktivitou

3.2.1.1 Alkaloidy čeledi Amaryllidaceae

Galanthamin byl poprvé izolován ze sněženky *Galanthus woronowii*, je to terciální alkaloid vyskytující se i v ostatních druzích rodu *Galanthus* a v mnoha dalších rodech čeledi *Amaryllidaceae*. Je to jedna z prvních látek používaných k léčbě myasthenia gravis a paralytické poliomyelitidy. Galanthamin je inhibitor AChE a navíc alostericky moduluje nikotinové receptory, čímž zvyšuje uvolňování ACh. Dnes je ve vědeckých studiích používán jako standard AChE inhibiční aktivity. Galanthamin dále odstraňuje paralýzu způsobenou tubokurarinem, antagonizuje útlum dechu vyvolaný opioidy a potlačuje některé centrální účinky droperidolu a diazepamu.^{21,24}

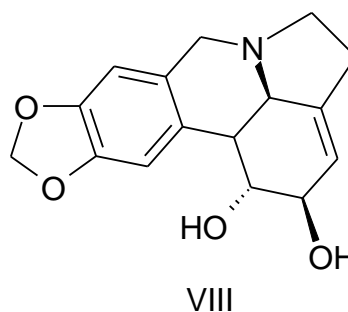
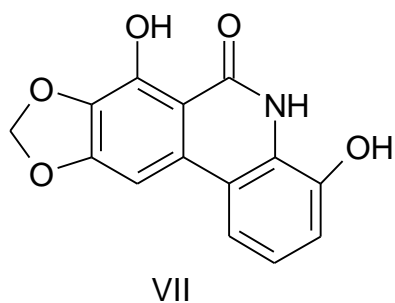
Sangvinin je 9-*O*-demethyl derivát galanthaminu vyskytující se v naší sněžence podsněžník (*Galanthus nivalis*) a libence (*Eucharis grandiflora*). V *in vitro* pokusech vykazuje mnohonásobně vyšší inhibiční aktivitu vůči AChE než galanthamin. Alkaloid hvězdníku (*Hippeastrum papilio*), 11 β -hydroxygalantamin, epimer dříve izolovaného habranthinu vykazuje také významnou *in vitro* inhibiční aktivitu.^{24,25}

Narciprimin (VII) je fenanthridinový alkaloid izolovaný z rodu *Cyrtanthus*, *Narcissus*, *Lycoris* a *Zephyranthes*. Vykazuje slabší inhibiční aktivitu vůči AChE s $IC_{50} = 78,9 \mu M$.²⁶

Lykorin (VIII) vykazuje jen slabou inhibiční AChE aktivitu ($IC_{50} = 450 \mu M$). Deriváty tohoto pyrrolofenanthridinového alkaloidu mají různou aktivitu vůči AChE. Největší inhibiční účinek má 1-acetyllykorin, svou aktivitou dvakrát převyšuje galanthamin. IC_{50} má $0,96 \pm 0,04 \mu M$. 1-acetyllykorin se vyskytuje v druhu *Ammocharis coranica*. V této rostlině je obsažen i alkaloid hamayn, mírně inhibuje AChE. Jeho IC_{50} je $250 \mu M$. Tato skupina alkaloidů je hojně rozšířena např. v druzích *Crinum* spp. a *Galanthus* spp. Cholinesterasová aktivita je zřejmě spojena s přítomností dvou volných hydroxylových skupin tohoto typu amarylkovitých alkaloidů.^{24,27,28}

Alkaloidy rodu *Hippeastrum*, montanin, hippeastrin a pretazzetin inhibují AChE. Jsou to isochinolinové alkaloidy, největší inhibiční aktivitu z nich má montanin, který v závislosti na dávce inhiboval více než 50% enzymu v 1 mM koncentraci.^{24,29}

Alkaloidy izolované z *Chlidanthus fragrans*, z nichž hlavní jsou tazzetin, chlidanthin, belladin a lykorin, inhibují lidskou AChE $IC_{50} = 20,1 \mu M$ a BuChE $IC_{50} = 136,8 \mu M$.³⁰



3.2.1.2 Alkaloidy čeledi Fabaceae

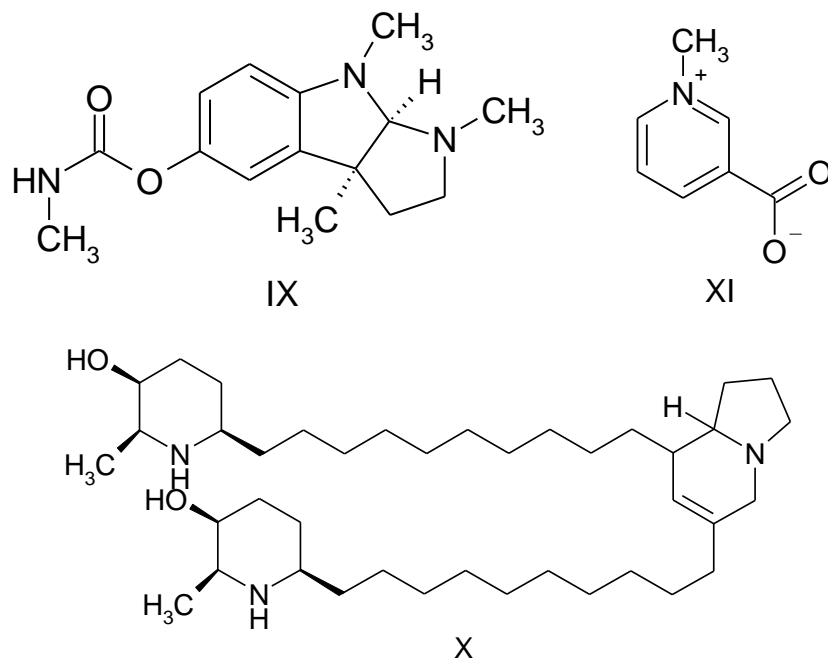
Fysostigmin (IX) byl vůbec prvním AChE inhibitorem zkušným pro léčbu AD. Je to indolový alkaloid obsažený v semenech bobovité rostliny *Physostigma venenosum* (kalabarových bobech), také označovaný jako eserin. Po chemické stránce je to ester methylkarbamové kyseliny, pro inhibiční účinek je nezbytná část molekuly charakteru esteru alkytkarbamové kyseliny s bazickým fenolem. Fysostigmin se stal předlohou sloučenin inhibitorů karbamátového typu s reverzibilním účinkem, jako je neostigmin (Syntostigmin®) a pyridostigmin (Mestinon®).¹³ Fysostigmin prochází hematoencefalickou bariérou, má krátký poločas a úzký terapeutický index. Z těchto důvodů nebyl zařazen pro léčbu AD. Používá se především v očním lékařství jako miotikum a pro snížení nitroočního tlaku při glaukomu. Pro své periferní i centrální antimuskarinové účinky se dá využít jako antidotum při předávkování parasymptolytiky např. atropinem nebo tricyklickými antidepresivy.^{9,14}

Juliflorin (X) je bispiperidinový derivát indolizinu z keře *Prosopis juliflora*. Tento alkaloid je nekompetitivní inhibitor AChE s $IC_{50} = 0,42 \mu M$ a BuChE s $IC_{50} = 0,12 \mu M$. Studium molekulárního dockingu ukázalo, že interakce s aktivním centrem acetylcholinesterasy probíhá

tak, že oba piperidinové kruhy se váží na aromatické hrdlo otvoru a indolizinové jádro se vnoří hluboko dovnitř, kde je umístěno katalytické centrum enzymu. Vzniklý enzym-inhibitorový komplex je tak stabilizován hydrofobními a vodíkovými vazbami a π - π interakcemi. Dále byla prokázána jeho spasmolytická aktivita na izolovaném jejunu králíka a blokování vápníkových kanálů buněk. Již dříve bylo prokázáno, že juliflorin vykazuje antibakteriální aktivitu a nepříliš vysokou toxicitu.³¹

Frakce alkaloidů ze semen pískavice řeckého sena (*Trigonella foenum-graecum*) vykazují AChE inhibici s $IC_{50} = 9,23 \pm 6,08 \mu\text{M}$. V ní obsažený pyridinový alkaloid **trigonelin** (XI) mírně inhibuje AChE s $IC_{50} = 233 \pm 0,12 \mu\text{M}$.³²

Spektalin a 3-*O*-acetylspektalin jsou piperidinové alkaloidy ze *Senna spectabilis*. Staly se předlohou pro nové selektivní AChE inhibitory s vysokou selektivitou pro CNS, tzn. že mají téměř nulové vedlejší účinky na jiných systémech.²⁴



3.2.1.3 Alkaloidy čeledi Huperziaceae

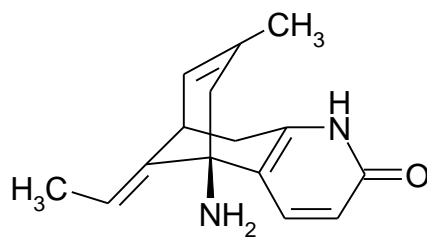
Huperzin A (XII) je seskviterpenový alkaloid, poprvé izolovaný z čínské plavuně *Huperzia serrata*. V menších koncentracích se vyskytuje i v některých dalších druzích rodu *Huperzia*. Je to silný, reverzibilní a vysoce specifický inhibitor AChE. V některých studiích je i účinnější než

donepezil, galantamin, či rivastigmin, má rychlejší vstup přes hematoencefalickou bariéru, vyšší perorální biologickou dostupnost a delší inhibiční účinek AChE. Huperzin A chrání buňky před peroxidem vodíku, β -amyloidem, glutamátem, ischemií a staurosporinem vyvolanou cytotoxicitou. Tyto účinky souvisí se schopností tlumit oxidační stres, regulovat expresi některých apoptických proteinů, regulovat nervový růstový faktor a jeho receptor a zasahovat do metabolismu APP. Huperzin A dále reverzibilně inhibuje NMDA receptory, čímž přispívá k jeho neuroprotektivním vlastnostem. Optický isomer (-)-huperzin A je účinnější oproti (+)-huperzin A. V Číně je huperzin již používán pro terapii AD a 4. fáze klinického hodnocení prokázala výrazné zlepšení paměti u starších pacientů s AD a vaskulární demencí. Vykazoval minimální vedlejší účinky na periferním cholinergním systému. Huperzin A může být také použit jako ochranný prostředek při intoxikaci organofosfáty. Zároveň probíhají studie zkoumající vliv huperzinu A na léčbu schizofrenie a závislosti na návykových látkách. Výzkum se také zaměřuje na vývoj derivátů huperzinu A a huperzinu B s vyšší účinností a lepšími kinetickými parametry. Např. zavedení methylové skupiny na C-10 huperzinu A vedlo k osmkrát vyšší účinnosti inhibice AChE.^{24,33,34}

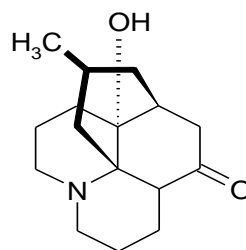
3.2.1.4 Alkaloidy čeledi Lycopodiaceae

Deset izolovaných alkaloidů lykopodanového typu (např. anotin, lykodolin (XIII), akrifolin) z islandského *Lycopodium annotinum* spp. *alpestre* vykazuje slabou AChE inhibici ve srovnání s huperzinem A a B, které jsou lykodinového typu. Na základě modelovacích studií alkaloidů lykopodanového typu se zdá, že dobře zapadají do prohlubně v aktivním místě AChE, ale postavení jejich funkčních skupin brání vytvoření silných vodíkových vazeb. Použitím kostry těchto alkaloidů by mohly vzniknout potenciálně aktivní analogy.³⁵

Lykoparin C vykazuje AChE inhibiční aktivitu. Byl izolován z *Lycopodium casuarinoides* současně s lykoparinem A a B, ty však tuto aktivitu nemají.³⁶



XII



XIII

3.2.1.5 Alkaloidy čeledi Apocynaceae

Deoxyvobustin, deoxyvobustin lakton, vobustin lakton jsou indolové alkaloidy izolované z *Voacanga globosa*. Tyto alkaloidy vykazují dobrou inhibiční AChE aktivitu. Deoxyvobustin s $IC_{50} = 6,2 \mu M$ inhiboval AChE nejvíce.³⁷

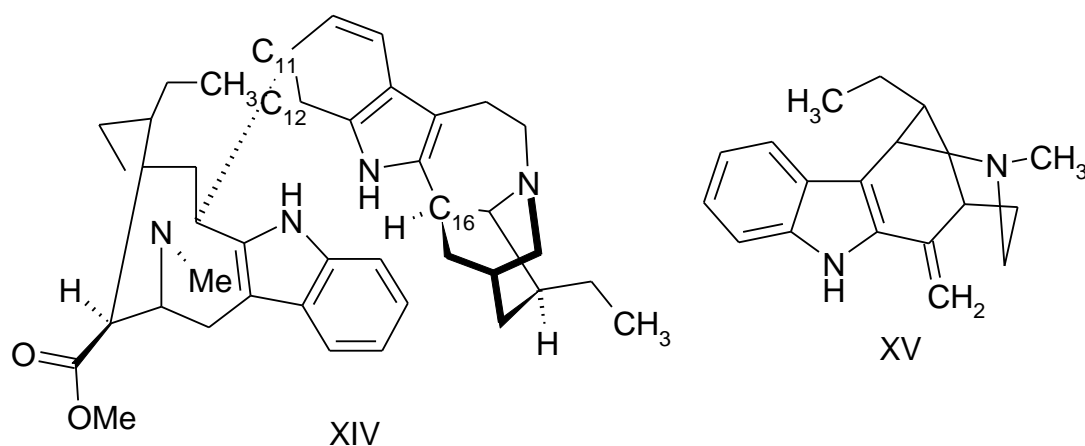
Dva bisindolové alkaloidy, **19,20-dihydrotabernamin** (XIV) a **19,20-dihydroervahanin A**, byly izolovány z kořenů thajské rostliny *Tabernaemontana divaricata*. Oba alkaloidy inhibují AChE více než galanthamin. Aktivita 19,20-dihydroervahaninu A byla prokázána jako specifická, reverzibilní a kompetitivní inhibice AChE. Současně byly izolovány dva neaktivní bisindolové alkaloidy - konodurin a tabernaelegantin A. Dle údajů by mohla substituce na C-11, C-12 a C-16 mít vliv na inhibiční aktivitu vůči AChE.³⁸

Významný inhibiční účinek na AChE má lihový extrakt ze stonku thajské rostliny *Alstonia macrophylla*. Obsahuje dva bisindolové alkaloidy makralstonin a nový thungfain.³⁹

Ulein (XV) je hlavní indolový alkaloid brazilského druhu *Himatanthus lancifolius*. Je to silný inhibitor AChE s $IC_{50} = 0,45 \mu M$.⁴⁰

Výzkum alkaloidů v *Haplophyton crooksii* vedlo k izolaci 15 indolových alkaloidů: 10-methoxy-N1-methylpericyklivin, 16-dekarbomethoxyvinervinin, krooksiin, yohimbin, β -yohimbin, krooksidin, dekarbomethoxytetrahydrosekodin, akuammicin, tubotaiwin, lanceomigin, lanceomigin N-oxid, haplofytin, cimicin, cimicidin, a akuammidin. Všechny tyto hlavní alkaloidy *Haplophyton crooksii* mají *in vitro* AChE inhibiční aktivitu.⁴¹

Dva z osmi izolovaných indolových alkaloidů z *Ervatamia hainanensis* mají AChE inhibiční aktivitu, ta je na stejné úrovni jako u galanthaminu.⁴² Stejně tak čtyři indolové alkaloidy koronaridin, voakangin, voakangin- hydroxyindolenin, rupikolin z *Tabernaemontana australis* inhibují AChE.⁴³



3.2.1.6 Alkaloidy ostatních čeledí

Z pěti druhů řebčíku *Fritillaria* spp. (Liliaceae) bylo izolováno 18 alkaloidů se steroidní strukturou, 5 z nich inhibuje AChE i BuChE: *N*-demethylpukvietinon, hupeheninosid, ebeiedinon (XVI), yibeinosid A, a chuanbeinon. Z údajů vyplývá, že *N*-demethylpukvietinon je selektivní inhibitor AChE a hupeheninosid a chuanbeinon jsou selektivními inhibitory BuChE.⁴⁴

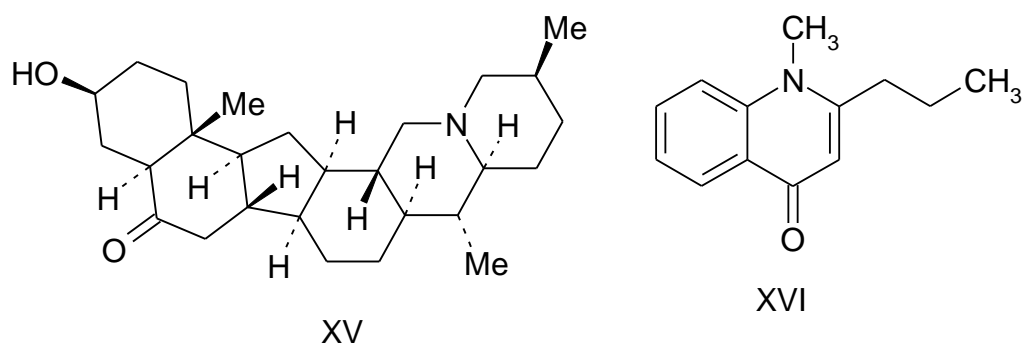
Tabulka č.1: Inhibiční aktivita AChE a BuChE vybraných alkaloidů izolovaných z řebčíků.⁴⁴

alkaloid	IC ₅₀ AChE (μM)	IC ₅₀ BuChE (μM)
<i>N</i> -demethylpukvietinon	6,4	12,5
hupeheninosid	16,9	2,1
ebeiedinon	5,7	5,2
yibeinosid A	6,5	7,3
chaunbeinon	7,7	0,7

Steroidní alkaloidy pregnanového typu z masoprodu *Sarcococca hookeriana* (Buxaceae) vykazují různou AChE inhibici v rozsahu IC₅₀ = 1,5 – 148,2 μM a BuChE inhibici 0,6 – 100,2 μM.⁴⁵ Pregnanové alkaloidy z *Sarcococca saligna* (celkem 15 alkaloidů) inhibují AChE v rozsahu IC₅₀ = 5,21 – 227,92 μM a BuChE 2,18 – 38,36 μM.⁴⁶ V listovém extraktu *Buxus hyrcana* (Buxaceae) je obsažen triterpenový alkaloid (+)-*N*-tigloylbuxahyrkanin[(20*S*)-20-

(dimethylamino)-3 β -(2'-methyl-2'-butenoylamino)bux-9(11)-en-10 α -ol]. Je aktivní vůči oběma cholinesterasám.⁴⁷

Ethanolový extrakt z kmenu brazilského stromu *Esenbeckia leiocarpa* (Rutaceae) obsahuje šest alkaloidů: leiokinin A, leptomerin (XVI), kokusaginin, skimmianin, makulin a flindersiamin. Z těchto alkaloidů má největší AChE inhibiční aktivitu leptomerin s $IC_{50} = 2,5 \mu M$.⁴⁸ Tři chinolinové alkaloidy ze *Skimmia aureola* (Rutaceae) 3-hydroxy-2,2,6-trimethyl-3,4,5,6-tetrahydro-2H-pyrano[3,2-c]chinolin-5-on, ribalinin a methylisoplatydesmin inhibují AChE i BuChE. Nekompetitivní inhibitor methylisoplatydesmin má také na dávce závislý spasmolytický účinek na králičím jejunu.⁴⁹ Mahanimbin je karbazolový alkaloid indické léčivé rostliny *Murraya koenigii* (Rutaceae). Jeho na dávce závislá inhibice AChE je $IC_{50} = 0,03 \pm 0,09 \text{ mg/ml}$.⁵⁰



Rutekarpin je chinazolinkarbolinový alkaloid z *Evodia rutaecarpa* (Rutaceae). Je to silný AChE inhibitor s vysokou selektivitou k AChE oproti BuChE. Rutekarpin slouží jako předloha pro syntézu nových inhibitorů se zvýrazněným účinkem. Kromě inhibice AChE působí rutekarpin vasodilatačně, protizánětlivě a jako antitrombikum.²⁴

Tetrahydroisochinolinové alkaloidy z rostlin čeledi Chenopodiaceae – *Salsola oppositifolia*, *S. soda* a *S. tragus* inhibují AChE a BuChE. Největší aktivitu mají alkaloidy druhu *S. tragus*, vůči AChE $IC_{50} = 30,2 \mu M$ a BuChE $IC_{50} = 26,5 \mu M$. Alkaloidy *S. oppositifolia* a *S. soda* mají selektivní účinek na BuChE. Všechny alkaloidy mají také výraznou antioxidační aktivitu, zjištěnou DPPH metodou.⁵¹

Izolace alkaloidů z listů *Waltheria brachypetala* (Sterculiaceae) vedla k získání chinolinových alkaloidů waltherion-A, waltherion-B, 8-methoxyflindersin a cyklického peptidového alkaloidu waltherinu. Alkaloidy inhibují AChE, přičemž waltherion-A a waltherion-B vykazují významnou aktivitu.⁵²

Isochinolinové alkaloidy z methanolového extraktu hlíz *Corydalis cava* (Fumariaceae) mají různou AChE a BuChE inhibiční aktivitu.⁵³ Etanolem extrahované hlízy, rozdělené n-hexanem, chloroformem a etanolem, vedlo k izolaci 15 isochinolinových alkaloidů, 3 z nich mají AChE nebo BuChE aktivitu, ostatní byly prohlášeny za neaktivní ($IC_{50} > 100 \mu M$).⁵⁴

Tabulka č.2: Inhibiční aktivita AChE a BuChE některých alkaloidů z *Corydalis cava*.⁵⁴

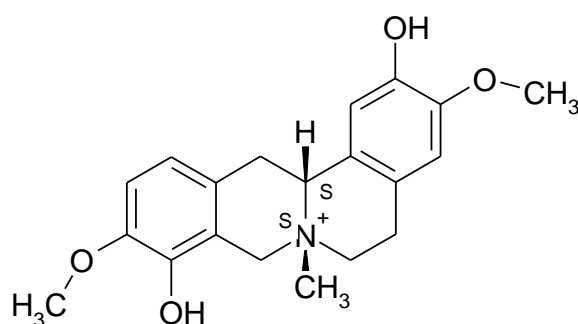
alkaloid	IC_{50} AChE (μM)	IC_{50} BuChE (μM)
bulbokapnin ⁵³	40 ± 2	83 ± 3
korydalin ⁵³	15 ± 3	-
korydin ⁵³	-	52 ± 4
(+)-kanadalin ⁵⁴	$20,1 \pm 1,1$	$85,2 \pm 3,2$
(±)-korykavidin ⁵⁴	-	$46,2 \pm 2,4$

Další rostlinou čeledi Fumariaceae s alkaloidy inhibujícími cholinesterasy je vlaštovičník větší *Chelidonium majus*. Inhibitory AChE jsou alkaloidy: sangvinarin, sangvirýthrin, chelidonin, berberin, chelerythrin, koptisin, protoberberin. Chelidonin je reverzibilní kompetitivní inhibitor, zatímco ostatní alkaloidy jsou nekompetitivní. Nejsilnějšími inhibitory jsou berberin, sangvinarin a sangvirýthrin s $IC_{50} = 0,23, 0,23$ a $0,29 \mu M$.⁵⁵

Šest protoberberinových alkaloidů z *Coptidis rhizoma*: berberin, palmatin, jateorrhizin, epiberberin, koptisin a groenlandicin inhibují AChE a BuChE v rozmezí hodnot $IC_{50} = 0,44 - 1,07 \mu M$ a $3,32 - 6,84 \mu M$.⁵⁶

Při průzkumu rostlin, využívaných jako paměťové stimulatory, byl z kořene *Stephania rotunda* (Menispermaceae) izolován nový protoberberinový alkaloid stefarotudin. Spolu se sedmi již známými látkami inhibuje AChE.⁵⁷ Hlízy *Stephania venosa* (Menispermaceae) obsahují kvarterní protoberberinové alkaloidy: cyklanolin (XVIII), stefaranin a N-metylstefolidin. Všechny inhibují AChE s $IC_{50} = 9,23 \pm 3,47; 14,10 \pm 0,81$ a $31,30 \pm 3,67 \mu M$. AChE inhibiční aktivita byla porovnána s palmatinem, jatorrhizinem, berberinem a s terciárními

protoberberinovými alkaloidy z téže rostliny: stefolidinem a korydalminem. Výsledky naznačují, že kladný náboj na dusíku tetrahydroisochinolinové části, sterická substituce na dusíku, planarita molekuly nebo substituce na C-2, C-3, C-9 a C-10 mají vliv na inhibiční AChE aktivitu protoberberinových alkaloidů.⁵⁸ Bisbenzylisochinolinové alkaloidy z *Stephania tetrandra* (Menispermaceae) mají také AChE inhibiční aktivitu.⁵⁹ Aporfinové alkaloidy izolované z čínské léčivé rostliny *Menispermum dauricum* (Menispermaceae) mají vysokou inhibiční aktivitu. Jsou to oxoisoaporfinové alkaloidy a mají vyšší selektivitu k AChE než k BuChE. Některé jejich syntetické analogy mají vysokou aktivitu s IC_{50} v nanomolárním množství.²⁴

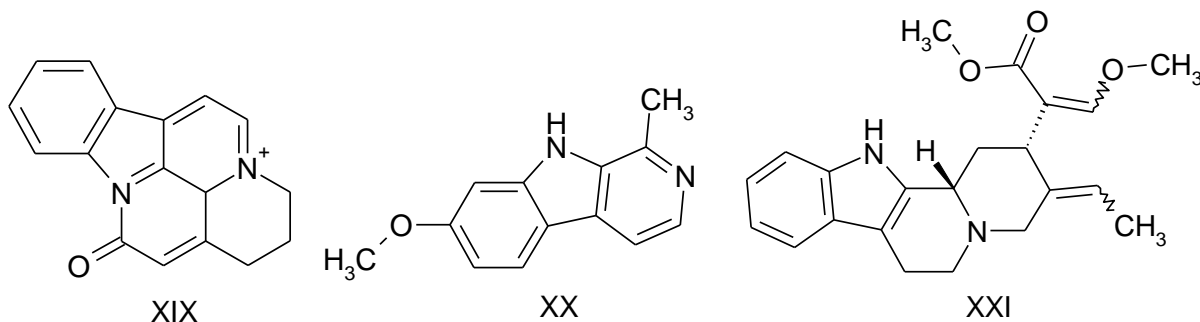


XVIII

Dva β -karbolinové alkaloidy **infraktopikrin** (XIX) a 10-hydroxy-infraktopikrin z pavučince olivového *Cortinarius infractus* (Cortinariaceae) inhibují AChE s vyšší selektivitou než galanthamin. Studie chemického dockingu ukazují, že chybí π - π interakce u BuChE, které jsou zodpovědné za tuto selektivitu. Další studie naznačují, že oba alkaloidy brání vlastní agregaci β -amyloidových proteinů, ale ne agregaci indukovanou AChE.⁶⁰

Screening rostlin íránské tradiční medicíny zjistil dobrou AChE inhibici u semen syrské routy *Peganum harmala* (Zygophyllaceae). Rostlina obsahuje β -karbolinové alkaloidy harmin (XX), harmalin, harmol, harman a pyrolochinazolinové alkaloidy vasicinon, vasicin, deoxyvasicinon, deoxyvasicin. Všechny alkaloidy mají dobrou inhibiční aktivitu AChE, harmin, harmalin a harmol se účinkem vyrovnávají galanthaminu.⁶¹

Geissoschizin-methyleter (XXI) je nově objevený indolový alkaloid, silný inhibitor AChE izolovaný z *Uncaria rhynchophylla* (Rubiaceae). Z rostliny bylo také izolováno 6 alkaloidů se slabší inhibiční aktivitou. IC₅₀ Geissoschizin-methyleteru je $3,7 \pm 0,3 \mu\text{M}$.⁶²



3.2.2 Alkaloidy ovlivňující osud β -amyloidu a alkaloidy snižující jeho toxicitu

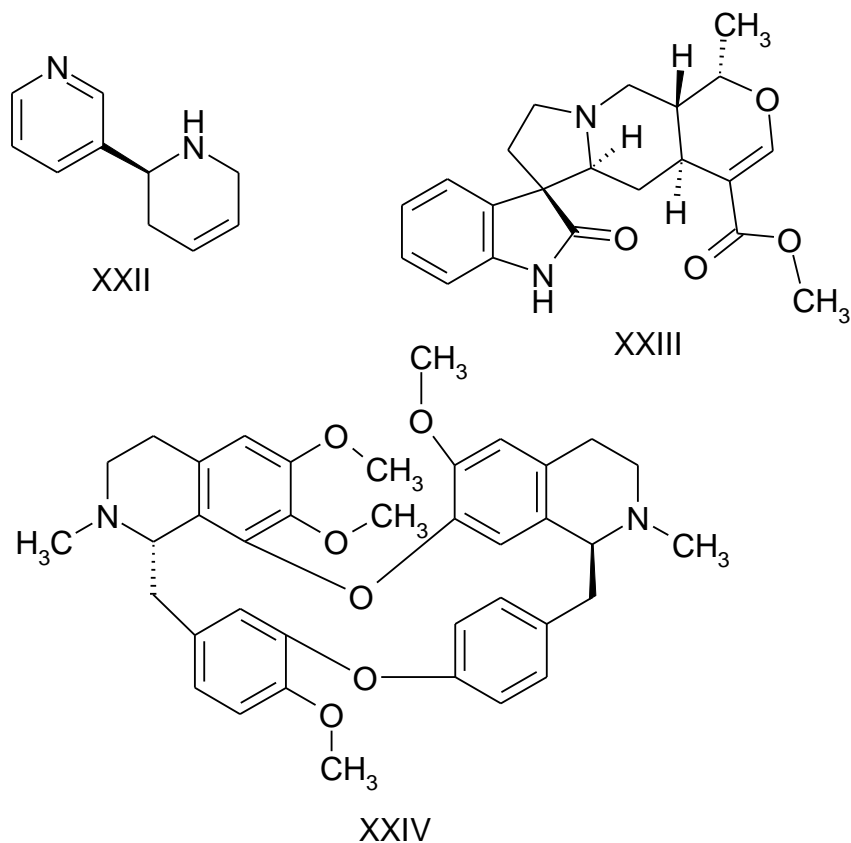
Anatabin (XXII) je jedním z minoritních alkaloidů čeledi lilkovitých (Solanaceae), pyridinového typu. *In vitro*, za použití buněčné linie produkující lidský APP, snižuje v závislosti na dávce hladiny β -amyloidu s počtem aminokyselin 40 a 42. Snižuje hladinu β -amyloidu zejména vlivem na β -štěpení APP. Dále snižuje aktivaci NF- κ B, v dávkách, které inhibuje produkci β -amyloidu *in vitro*. NF- κ B reguluje expresi BACE-1, limitního enzymu zodpovědného za produkci β -amyloidu. *In vivo*, u transgenních myších modelů s AD, akutní léčba anatabinem po dobu čtyř dnů výrazně snižuje hladinu β A1-40 a β A1-42 v mozku. Anatabin tak představuje velmi zajímavou látku pro regulaci akumulace β -amyloidu.⁶³

Mitrafyllin (XXIII) je oxindolový alkaloid izolovaný z *Uncaria tomentosa* (Rubiaceae), který se významně váže na protein β A1-40. To by mohlo mít vliv na identifikaci nových látek s velkým významem pro AD.⁶⁴ Některé extrakty z čínských léčivých rostlin mají v závislosti na dávce silné inhibiční působení na formování vláknitých β A1-40 a β A1-42. Nejintenzivněji z nich inhibuje agregaci β -amyloidu extrakt z *Uncaria rhynchophylla* (Rubiaceae). Tento vodný extrakt obsahuje několik různých látek včetně oxindolových a indolových alkaloidů s neuroprotektivním účinkem. Tato rostlina by mohla být novým léčebným prostředkem pro prevenci anebo léčbu AD.⁶⁵

Vláknitý β -amyloid indukuje jeho pohlcování mikroglíí a výrazně zvyšuje hladinu IL-1 β , TNF- α a expresi fosfo NF- κ B u kultury mikroglíí. Léčba tetrandrinem vedla ke snížení hladiny fosfo NF- κ B a výrazně snížila produkci IL-1 β a TNF- α . **Tetrandrin** (XXIV) je bisbenzylisochonilínový alkaloid z kůry čínské byliny *Stephania tetrandra* (Menispermaceae). Snižuje poškození mikroglíí vzniklé neurotoxicitou se zachováním jejich neuroprotektivního působení.⁶⁶ Tetrandrin byl podáván krysím modelům s AD a bylo pozorováno výrazné zlepšení učení a paměti. Výrazně se snížila NF- κ B DNA vazebná aktivita, produkce IL-1 β a TNF- α , stejně jako zvýšené histologické poškození hippocampu u krys indukované β -amyloidem (1-42). Tetrandrin by tedy mohl výrazně snížit poškození prostorového učení a paměti vyvolané β -amyloidem a snížit expresi prozánětlivých mediátorů, což by bylo velikým přínosem pro terapii AD.⁶⁷

Staurosporin je alkaloidní toxin izolovaný z bakterií *Streptomyces staurospores*, který je široce používán jako inhibitor proteinkinasy C (PKC). U krysích buněk feochromocytomu PC12 sympatických neuronů produkujících APP, vedlo podání staurosporinu před inhibicí PKC k regulaci APP. Staurosporin by tak mohl být použit jako látka pro vývoj léčiv, které by regulovaly expresi APP.⁶⁸ Společně s látkami K-252, nízkomolekulárními alkaloidy bakteriálního původu, chrání staurosporin krysí hippocampální neurony vůči toxicitě β -amyloidu a před poškozením volnými radikály.⁶⁹

Methanolový extrakt asijského pelyňku *Artemisia asiatica* (Asteraceae) obsahuje alkaloidy, které snižují toxicitu vyvolanou β -amyloidem. Krysí buňky PC12 byly vystaveny toxickému působení β -amyloidu a po 2 hodinách v přítomnosti alkaloidů *Artemisia asiatica* v koncentraci 1200 μ g/ml došlo ke snížení toxicity. Studie prokázala, že alkaloid může projít hematoencefalickou bariérou a v lidském mozku snižovat toxicitu vyvolanou β -amyloidem. Navíc vykazuje silný AChE inhibiční účinek.⁷⁰



3.2.3 Alkaloidy inhibující fosforylaci τ -proteinu

Harmin (XX) je β -karbolinový alkaloid, je to inhibitor dvojí fosforylace tyrosinu regulované kinasou 1 (DYRK1A) s vysokou afinitou. DYRK1A se nachází na 21. chromozomu v kritické oblasti Downova syndromu a má za následek fosforylaci τ -proteinu, spojených na více místech s patologií τ -proteinu u AD u Downova syndromu. Harmin i řada dalších β -karbolinových látek inhibuje tuto kinasu a mohou tak terapeuticky zasáhnout do nástupu a progresu patologie τ -proteinu u AD.⁷¹

3.2.4 Alkaloidy působící prostřednictvím nikotinových receptorů

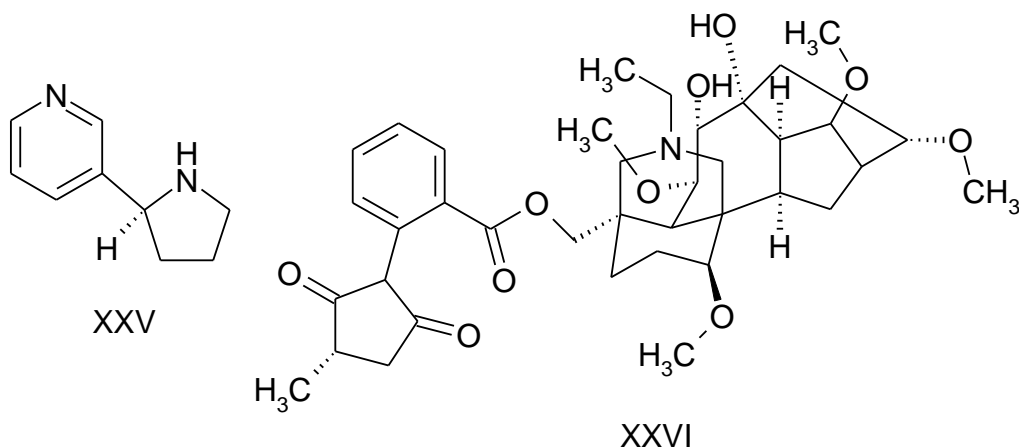
Nikotinové receptory jsou v mozku široce rozložené a jsou lokalizované na nervových zakončeních, především presynapticky, hlavním neurotransmiterem je ACh. Tam usnadňují nebo zesilují uvolnění samotného ACh nebo i jiných neurotransmiterů, jako je glutamát, noradrenalin nebo GABA. Tento vliv na zesílené vylučování ACh prostřednictvím nikotinových receptorů vysvětluje fatální následky vycházející ze ztráty cholinergních receptorů, jako je tomu u AD.

Nikotin je alkaloid obsažený v tabáku *Nicotiana tabacum* (Solanaceae), je to agonista nikotinových neuronálních receptorů ve vegetativních gangliích, CNS a na senzoryckých nervových zakončeních, jeho účinek je především stimulační. **Nornikotin** (XXV) je ve větším množství obsažen v tabáku, zároveň je minoritním systémovým metabolitem nikotinu. Nornikotin se váže především na $\alpha 7$ nikotinové receptory, ty jsou na něj velmi citlivé ve srovnání s ACh. Tyto $\alpha 7$ receptory byly navrženy jako potenciální terapeutický cíl pro terapii AD.^{9,72}

Anabasein je alkaloidní toxin poprvé izolovaný z mořského červa a dále z některých druhů mravenců. Anabasein je agonista všech subtypů nikotinových receptorů a jeho četné syntetické analogy byly testovány z farmakologického i toxikologického hlediska. Jeho analog GTS-21 (3-(2,4-dimethoxybenzyliden)-anabasein) je selektivní agonista $\alpha 7$ nikotinových receptorů a tím i kandidát pro léčbu AD.⁷³

Alkaloidy rodu *Delphinium* jsou agonisté nikotinových receptorů u hmyzu s insekticidním účinkem. Vývoj selektivních $\alpha 7$ agonistů nikotinových receptorů na bázi *Delphinium* alkaloidů by mohl vést k novým látkám pro terapii AD, které modulují cholinergní funkce přímo, nebo prostřednictvím navýšení nikotinových receptorů. **Methyllykakonitin** (XXVI) je $\alpha 7$ selektivní alkaloid vyskytující se např. v *Delphinium brownii* (Ranunculaceae).^{74,75}

Fantasmidin je přirozeně se vyskytující alkaloid v žábě, pralesničce Anthonyově (*Epipedobates anthonyi*). Fantasmidin a jeho deriváty jsou agonisté nikotinových receptorů. Byly vyhodnoceny jako potenciální k léčbě onemocnění reagujících na agonisty nikotinových receptorů jako je, AD, Parkinsonova choroba, schizofrenie, myastenia gravis, kognitivní dysfunkce a další.⁷⁶



3.2.5 Alkaloidy s jiným mechanismem účinku

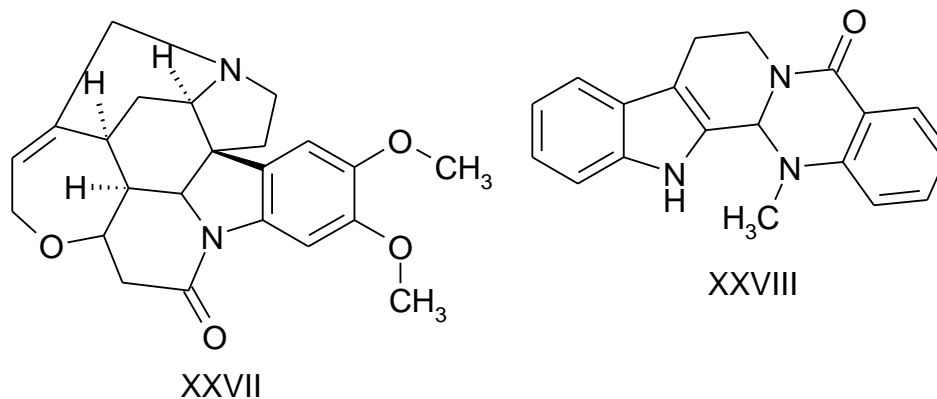
Tetracyklický piperidinový alkaloid **himbacin**, izolovaný z kůry australské rostliny rodu *Galbulimima* (Himantandraceae), je antagonist muskarinových receptorů, podtypu M2. Zvyšuje hladinu synaptického ACh prostřednictvím selektivní inhibice presynaptických muskarinových receptorů.⁷⁷ Brucin (XXVII) je alkaloid ze stromu jihovýchodní Asie *Strychnos nux-vomica* (Loganiaceae), který selektivně zvyšuje alosterickou modulací na M1 muskarinových receptorech hladinu ACh. Zvýšení hladiny ACh není veliké. Deriváty brucinu působí různě selektivně i na jiných podtypech muskarinových receptorů. Například N-chloromethylbrucin má selektivní účinek na M3. Látky působící selektivně na jednom subtypu muskarinových receptorů, který působí sub-optimálně, by mohly být terapeuticky využity v časných stádiích AD.⁷⁸

Alkaloid **agrocybenin** má vysokou inhibiční schopnost proti prolyl-endorpeptidase, enzymu, který generuje degenerativní onemocnění jako je AD nebo senilní demence. Farmaceuticky přijatelné soli jsou extrahovány z houby *Agrocybe cylindraceae* (Bolbitiaceae).⁷⁹

Pyridinový alkaloid **piperin**, hlavní alkaloid pepře *Piper nigrum* (Piperaceae), vykazuje nootropní činnost.⁸⁰ Perorálně podávaný piperin skupině dospělých potkanů v dávkách 5, 10, 20 mg/kg výrazně zlepšil poruchy paměti a neurodegeneraci v hippocampu. Piperin navíc ukázal neurotropní efekt v hippocampu. Možné základní mechanismy účinku by mohly být spojeny s poklesem peroxidovaných lipidů, nebo i cholinesterasová aktivita.⁸¹

Evodiamin (XXVIII) izolovaný ze stejné rostliny jako rutekarpin, silný inhibitor AChE, z *Evodia rutaecarpa* (Rutaceae). Oba to jsou chinazolinkarbolinové alkaloidy. Evodiamin u myších modelů s AD výrazně snížil postižení schopnosti se učit a paměti, navíc obrátil inhibici uptake glukózy vzniklou vývojem znaků AD u myši. Dávka 100 mg/kg také výrazně snížila expresi IL-1 β , IL-6, TNF- α , a COX-2 vzniklé zánětem doprovázejícím AD.⁸²

Námelový alkaloid z cizopasně houby paličkovice nachové *Claviceps purpurea* (Clavicipitaceae) ergokryptin, resp jeho semisyntetický derivát **dihydroergokryptin** ve studii s 215 pacienty ukázal symptomatické účinky u starších pacientů s pravděpodobnou AD zpomalení kognitivního úpadku.⁸³ **Nicergolin** je semisyntetický derivát námelového alkaloidu, který dle randomizované multicentrické studie zlepšil bdělost a zpracování informací na neurofyziologické úrovni, která vede na behaviorální úrovni ke klinickému zlepšení, jak degenerativní, tak cévní demence.⁸⁴



3.3 *PAPAVER SOMNIFERUM* L. (MÁK SETÝ)



Obrázek č.1: *Papaver somniferum* L. ⁸⁵



Obrázek č.2: *Papaver somniferum* L., nařezaná tobolka s vytékajícím latexem ⁸⁶

3.3.1 Synonyma

Papaver amplexicaule S TOKES, *Papaver nigrum* C RANTZ, *Papaver officinale* GMD.,
Papaver opififerum FORSK.⁸⁷

3.3.2 Systematika

Papaver somniferum L. (mák setý) je rostlinný druh z řádu Papaverales (mákovité) a čeledi Papaveraceae (mákovité).⁸⁸

3.3.3 Botanický popis

3.3.3.1 Původ

Všechny formy opiového máku vznikly z divokého máku štětinatého (*Papaver setigerum*), který je původní středomořský druh také produkující morfin. Z Evropy se pak rozšířil na východ přes celou Asii.^{87,88}

3.3.3.2 Popis rostliny

Mák setý je jednoletá bylina s kulovitým kořenem, pronikajícím do hloubky 0,5 – 0,8 m a velkým množstvím postranních kořínků. Zpravidla má jednu lodyhu vysokou 0,3 – 1,5 m, jednoduchou nebo rozvětvenou, lysou, zřídka chlupatou, na příčném řezu oblou, vyplněnou dřevem a na okrajích voskovitě ojměnou. Listy jsou podlouhlé, dolní celistvé s krátkým řapíkem, střední a horní nepravidelně zubaté, poloobjímavé, zubaté. Celá rostlina je protkaná mléčnicemi. Květy jsou více či méně vzpřímené, dosahují až 10 cm v průměru. Mají dva opadavé zelené kališní lístky, čtyři korunní lístky různé velikosti a u většiny odrůd se světlou nebo tmavou skvrnou na bázi lístku. Koruna je zbarvena bíle, přes růžovou až do fialových odstínů v závislosti na odrůdě. Květ je oboupohlavní, zpravidla samosprašný s velkým počtem tyčinek, které jsou při kvetení přilnuté k semeníku. Svrchní semeník vyrůstá na prodloužené květní stopce a chybí mu čnělky. Blizna vytváří hvězdicový terč s 8-12 paprsky. Kvetení od června do srpna. Plodem je tobolka kuželovitého nebo kulovitého tvaru různé velikosti, na povrchu zdeformovaná paprsky, které z části zasahují do plodové dutiny, kde vytváří neúplné přehrádky. Když je zralá, otevírá se buď

malými otvory mezi paprsky, nebo zůstává uzavřená. V přehrádkách je velké množství drobných semen ledvinovitého tvaru, obecně modro-šedá, bílá, žlutá, šedá, červená nebo černá.^{87,88,89,90}

Základní rozdělení druhů máku je dle selekce na druhy s produkcí maximálního množství alkaloidů a na druhy olejné. Kromě četných zahradních hybridů jsou uznávány tyto druhy:

Papaver somniferum var. *glabrum* Boiss., pěstovaný v Turecku s fialovým, někdy bílým květem, semeny od bílé po tmavě fialovou barvu.

Papaver somniferum var. *album* DC., pěstovaný v Indii s bílými květy i semeny, tobolka je vejcovitého tvaru, 4 -8 cm v průměru, bez pórů pod bliznou.

Papaver somniferum var. *nigrum* DC., pěstovaný v Evropě pro semena, je břidlicově zbarven, listy a kalich jsou lysé, květ je fialový a tobolka je někdy menší, více kulovitá, než u var. *album*.

Papaver somniferum var. *steigerum* DC., divoká forma z jižní Evropy, stopky a listy jsou pokryté ježatými chlupy, listové laloky jsou ostře špičaté, zakončené štětinou.⁹⁰

3.3.3.3 Ekologie

Mák setý potřebuje úrodnou půdu s dostatkem dusíku, ne příliš suchou zeminu nebo sprašové půdy.⁸⁷

3.3.3.4 Celkové rozšíření

Jako holotypus *Papaver somniferum* L. dnes existuje velmi ojediněle, jedná se o vyšlechtěné odrůdy opiového nebo olejného máku. V současné době planě roste v celém Středomoří, ale hlavně v Malé Asii. Pěstuje se téměř po celém světě. Mezi nejvýznamnější pěstitele se řadí Turecko, Indie, Pákistán a Makedonie. Nejznámější oblastí je však tzv. Zlatý trojúhelník, zahrnující horské oblasti Barmy, Thajska a Laosu, odkud pochází značná část nelegálně získávaného opia. Menší pěstitelskou oblastí je tzv. Zlatý půlměsíc, který zahrnuje hlavně Írán, Afghánistán a Pákistán.⁸⁹

3.3.3.5 Výskyt v ČR

Pěstuje se především na polích, jen ojediněle zplaňuje v okolí polních cest, navážkách zeminy apod. V ČR se v posledních letech pohybují osevní plochy máku mezi 30 – 40 tisíci ha.⁹¹

3.3.3.6 Složení

Květ obsahuje kvercetin-3-gentiobiosid a kvercetin-3-glukosid, kališní lístky nepojmenované alkaloidy $C_{17}H_{19}NO$, $C_{18}H_{21}NO_3H_2O$, papaverin, paramorfin a narkotin. Kořeny obsahují 0,1 – 0,4 %, nať 0,1 – 1,0 % a semena 0,005 – 0,04 % alkaloidů.⁸⁷

3.3.4 Drogy získávané z *Papaver somniferum* L.

3.3.4.1 Fructus Papaveris immaturi (nezralý plod máku setého)

Droga se sbírá po opadu lístků, podélně se rozřízne a zbaví semen. V této podobě slouží k získávání opia.⁸⁷

3.3.4.2 Fructus Papaveris sine semine (maková sláma)

Drogou jsou plně zralé, vyschlé a semen zbavené makovice. Dnes se maková sláma jako vedlejší zemědělský produkt používá pro izolaci alkaloidů. I u nás, kde obsah morfinu je v makové slámě nižší, je makovina vykupována a na Slovensku zpracovávána firmou Zentiva a.s.⁹²

3.3.4.3 Opium crudum (surové opium)

Opium je na vzduchu zaschlý latex, vytékající po nařezání nezralých plodů. Má charakteristický zápach s velmi hořkou chutí. Během sušení se stává tvrdým a křehkým se zrnitým lomem, vlivem světla je různě zbarvené. Mák setý se pro výrobu opia pěstuje po celém světě. Nejznámější pěstitelské oblasti jsou tzv. Zlatý trojúhelník a menší Zlatý půlměsíc. Mezi další významné producenty této plodiny patří ještě Mexiko a Kolumbie.⁸⁷

3.3.4.4 Papaveris semen (semena máku setého)

Drogou jsou semena vyspaná ze zralých plodů. Semena mohou mít různou barvu (viz výše), pouze bílá semena mohou být použita pro farmaceutický průmysl. Obsahují velké množství oleje, proteinů a nepatrné množství alkaloidů.⁸⁷

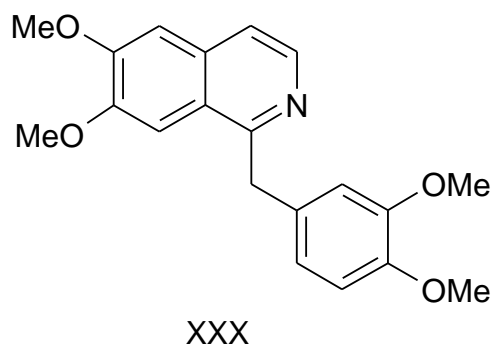
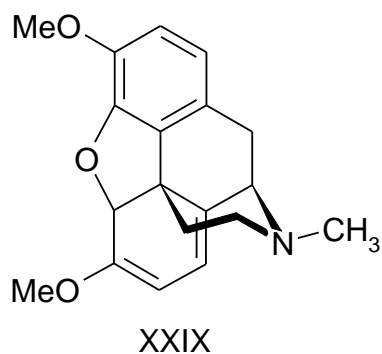
3.3.5 OBSAHOVÉ LÁTKY PAPAVER SOMNIFERUM L.

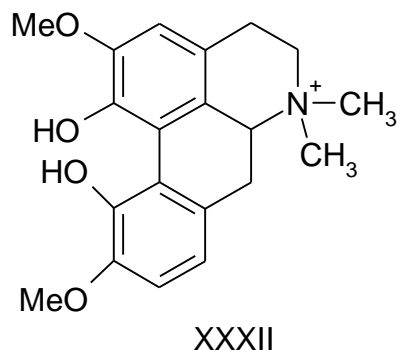
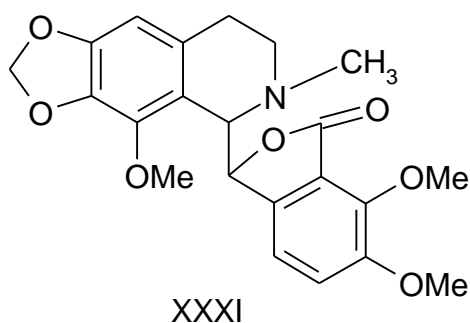
3.3.5.1 Alkaloidy

Hlavní obsahové látky máku jsou právě alkaloidy, bylo jich popsáno okolo 40. Koncentrace alkaloidů je v různých částech rostliny jiná. Např. množství morfinu klesá směrem ke kořenům, u kodeinu je tomu naopak, v listové části rostliny tento přechod zaznamenán nebyl. Ne všechny alkaloidy se nacházejí přímo v matečné rostlině, některé vznikají až při zpracování nebo při uchovávání drogy.⁸⁷

Alkaloidy můžeme dle chemické struktury rozdělit na:

- Morfinové alkaloidy – základem struktury je pentacyklický útvar, v němž cykly C a D oktahydroisochinolinového systému mají *trans* uspořádání, kruhy A a B spolu s dihydrofuranovým cyklem vytváří skoro rovinný útvar kolmý k oktahydroisochinolinovému systému (např. morfin, kodein, thebain (XXIX)).
- Benzylisochinolinové alkaloidy – deriváty 1-benzylisochinolinu, přičemž isochinolinové jádro může být plně aromatické (např. u papaverinu (XXX)), nebo tetrahydroisochinolinové (např. laudanosin).
- Ftalidisochinolinové alkaloidy (narkotin (XXXI), narcein).
- Tetrahydroisochinolinové alkaloidy (hydrokotanin).
- Alkaloidy protopinové (protopin), protoberberinové (somniaferin), aporfínové (magnoflorin (XXXII)).⁸⁷





Isochinolinové alkaloidy jsou početnou skupinou sekundárních metabolitů rostlin s širokou biologickou aktivitou, jejichž prekurzorem syntézy je aminokyselina tyrosin. Podle typu základního isochinolinového řetězce (dva spojené uhlíkové kruhy s jedním atomem dusíku) je můžeme rozdělit na několik podskupin: jednoduché isochinoliny, benzyloisochinoliny, morfiny, tetrahydroisochinoliny, ftalidisochinoliny, protopiny, protoberberiny (berberin), alkaloidy z *Cephaelis ipecacuanha* (Rubiaceae) např. emetin a další. Tyto alkaloidy se vyskytují v mnoha čeledích, jako např. Papaveraceae, Fumariaceae, Berberidaceae, Rutaceae, Ranunculaceae, Menispermaceae. Výskyt morfinanových alkaloidů, konkrétně morfinu a kodeinu, je omezen pouze na druh *Papaver*. Isochinolinové alkaloidy se v rostlinách vyskytují často ve formě solí s organickými kyselinami, v máku je charakteristická kyselina mekonová, nebo u vlaštovičníku většího (*Chelidonium majus* (Papaveraceae)) kyselina chelidonová. Při izolaci alkaloidů se využívá jejich bazicity. S výhodou se při extrakci používají zředěné kyseliny, kdy alkaloidy přechází na formu jejich solí. Např. s použitím HCl získáme alkaloidy ve formě chloridů. Ty následně alkalizací převedeme na volné báze, které izolujeme. Při čištění alkaloidů také využíváme jejich bazicity, kde postupnou alkalizací směsi přechází báze alkaloidů do organické fáze a alkaloidy ve formě solí zůstávají ve fázi vodné.

- *Alkaloidy nezralého plodu máku (Fructus Papaveris immaturi)*

Droga obsahuje stejné zastoupení alkaloidů jako v opiu jen ve velmi malé koncentraci. Celkový obsah alkaloidů i obsah jednotlivých alkaloidů je závislý na době sklizně, klimatických a genetických faktorech. Existuje korelace mezi tvarem pouzdra a barvou semen na obsahu

morfinu. Vysoké výnosy poskytují pouzdra s kulovitým až soudkovitým tvarem a barvou semen modrou nebo tmavou. Relativně nejvyšší obsah alkaloidů je 10 – 12 dnů před zralostí semen. Obsah morfinu se pohybuje mezi 0,12 – 0,89 %. Obsah ostatních alkaloidů je také velmi variabilní kolísá, mezi 0,035 – 0,23 %.⁸⁷

- *Alkaloidy makové slámy (Fructus Papaveris sine semine)*

Maková sláma obsahuje opět stejné spektrum alkaloidů jako opium, ale jen ve velmi malé koncentraci. 0,035 – 0,23 % celkový obsah alkaloidů a z toho 0,015 – 0,018 % morfinu. V horní třetině stonku je to 0,023 – 0,19 % alkaloidů.⁸⁷

- *Alkaloidy opia (Opium crudum)*

Opium obsahuje 20 – 25% hmotnosti alkaloidů. Jsou vázány na kyseliny mekonovou, fumarovou, mléčnou a kyselinu sírovou. V rostlině je obsaženo asi 20 alkaloidů, zbylé vznikají oxidací, hydrolýzou a racemizací při vysychání latexu. Hlavním alkaloidem je morfin, který se zde nachází ve velkém množství - 9 – 17 %, kodein v množství 0,2 – 3,0 %, noskapin 2 – 10 %, papaverin 0,5 – 1,3 %, thebain 0,2 – 1,0 %, narcein 0,1 – 0,7 %. Jako vedlejší alkaloidy jsou zde přítomny kodamin, protopin, kryptopin, gnoskopin, neopin, oxynarkotin, papaveraldin, papaveramin, lanthopin; mekonidin v koncentraci asi 0,002 %. Narkotolin od 0,03 do 0,06 %, glaudin pod 0,01 %, retikulin 0,22 % a skoulerin. Z nově nalezených alkaloidů, které se staly meziprodukty biosyntézy, je to (S)-retikulin, dimery alkaloidů somniferin a somniferin-O-methyleter a oripavin.⁸⁷ Kompletní seznam alkaloidů viz. tabulka č. 3.

Celkový obsah alkaloidů je silně závislý na druhu, lokalitě, počasí a času sklizně. Minimum alkaloidů je kolem poledne, zatímco nejvíce jich je v časných ranních hodinách. Významný pokles alkaloidů, 60 – 80 %, způsobí déšť nebo kapky rosy. Jako příznivá doba ke sběru opia, v závislosti na druhu, je mezi 8. a 10. dnem od opadnutí okvětních lístků. Doba s nejvyšším obsahem alkaloidů je konec 2. týdne od opadu lístků. Výnos opia vztažený na jednu tobolku je mezi 20 - 50 mg, průměrný hektarový výnos je 3 -7 kg.⁸⁷

Výrazný vliv na obsah alkaloidů má i volba jarních a podzimních výsevů, a s tím související zkrácení nebo prodloužení vegetační doby. Biologicky u podzimních odrůd měla

delší kultivace příznivý vliv na zvýšení produkce (až pětinasobně) sušiny a účinných látek. Nevýhodou je nižší obsah morfinu, zatímco hladina kodeinu a thebainu je vyšší, zvyšuje se i podíl semen. Jarní kultivary mají potenciálně vysoké výnosy. Výnos alkaloidů v jarním cyklu je sice nepatrně nižší, což je dáno kratší vegetační dobou a nižším množstvím vyprodukované sušiny, ale je kompenzováno vyšší hladinou alkaloidů.⁹³

- *Alkaloidy semen (Papaveris semen)*

Alkaloidy v makových semenech dosahují koncentrace pouze 0,009 %. Ve velmi malých množstvích je zde zastoupen kodein, morfin, narkotin, papaverin, thebain, rhoeadin, papaverrubin B,C,D,E.⁸⁷

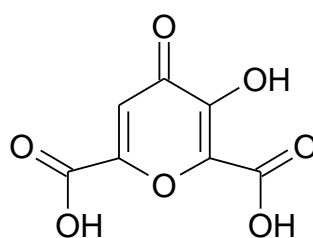
Tabulka č.3: Alkaloidy izolované z opia.⁸⁷
Alkaloidy označené hvězdičkou vznikají až během zpracování nebo skladování drogy.

Morfinanové alkaloidy	Morfin
	Pseudomorfin *
	Kodein
	Neopin (β-kodein)
	10-hydroxykodein
	Thebain
Benzylisochinolinové alkaloidy	Papaverin
	Papaveraldin * (Xanthalin)
	Palaudin
	Laudanin * [(±)-laudanidin]
	Laudanidin (tritopin)
	Laudanosin
	Kodamin
	Retikulin
Ftalidisochinolinové alkaloidy	Noskapin (narkotin)
	Narkotolin
	Gnoskopin* [(±)-narkotin]
	Oxynarkotin * (nornarcein)
	Narcein
Tetrahydroisochinolinové alkaloidy	Hydrokotarnin *
Protopinové alkaloidy	Protopin

	kryptopin
Protoberberinové alkaloidy	(-)-Skoulerin
	(-)-Isokorypalmin (somniaferin)
Aporfinové alkaloidy	Korytuberin
	Magnoflorin
	Isoboldin
	Papaverrubin
	Porphyroxin (papaverrubin D)
	Papaverrubin B (<i>O</i> -methylporphyroxin)
	Papaverrubin C (epiporphyroxin)
	Papaverrubin E
	Glaudin (<i>O,N</i> -dimethylporphyroxin)
	<i>N</i> -metyl-14- <i>O</i> -demethylporphyroxin
Alkaloidy s neznámou strukturou	Lanthopin
	Papaveramin

3.3.5.2 Ostatní obsahové látky

V nezralém plodu máku jsou přítomny nízkomolekulární sacharidy jako erythritol, D-glycero-D-mannooktuloza, xyloza a další. Obsahuje lignin, pektin a pentosany. Z organických kyselin kyselinu *p*-kumarovou, citronovou, mekonovou (XXXIII), vinnou, kávovou. Dále je přítomen i saponin. Kyselina kávová, *p*-kumarová a fenoloxidas snižují obsah morfinu v tobolce.⁸⁷



XXXIII

V makové slámě jsou přítomny kyseliny: *p*-kumarová, 2,3- a 3,4-dimethoxyftalová, fumarová, *p*-oxybenzoová, 2-oxycinchoninová, kyselina ftalová a vanilová.⁸⁷

Z opia byly izolovány kyseliny jablečná, jantarová, octová, citronová, mléčná, lakton mekonové kyseliny mekonin a mekonoinin. Opium obsahuje 5 – 10 % gumy a 1 – 4 % tuků, stopové množství cukrů, vosků, pryskyřic a bílkovin. Přítomny jsou polypeptidy a volné

aminokyseliny, podíl aminokyselin se liší v závislosti na geografickém původu rostliny. Zastoupení aminokyselin je: alanin, γ -aminomáselná kyselina, asparagová kyselina i její amid, glutamová kyselina, glycin, isoleucin, fenylalanin, serin, threonin, tyrosin, valin a 3 neznámé aminokyseliny. V nezmýdelnitelné frakci je obsažen 3γ -oxytriterpenoid, β -sitosterol, cykloartenol, stigmasterol. Obsah vody v opiu je závislý na stupni vysušení a pohybuje se v rozmezí 5 – 20 %.⁸⁷

V makových semenech je 50 – 55 % tuků, z mastných kyselin jsou přítomny kyselina linolová (62,2 %) olejová, palmitová, stearová. Přítomny jsou polární lipidy, ceramidy, cerebrosidy, volné mastné kyseliny, fosfatidylcholin, fosfatidylethanolamin, fosfatidylinostitol a steroly. Obsah proteinů je 21,5 – 23,5 %, zastoupeno je 16 aminokyselin. Semena obsahují enzymy lipasu, amylasu a emulsin, 3 % cukerných pentóz a až 1 % lecitinu.⁸⁷ Z vitamínů a minerálních látek je zastoupen thiamin, niacin a riboflavin, Ca, Cu, Fe, I₂, K, Mg, Mn, Na, P, Zn.⁹⁴

3.3.6 BIOLOGICKÁ AKTIVITA A FARMAKOLOGIE OBSAHOVÝCH LÁTEK *PAPVER SOMNIFERUM L.*

Mák pěstovaly a využívaly již starověké civilizace Persie, Egypta a Mezopotámie. Archeologické důkazy jsou staré 30 tisíc let a první písemná zmínka o máku je stará 4 tisíce let. Byl známý jako „rostlina radosti“. Řeční lékaři využívali jak celou rostlinu, tak opiový extrakt a Galén (2. století n.l.) uvedl tyto léčebné indikace: léčí chronické bolesti hlavy, závratě, hluchotu, epilepsii, mrtvici a šerost zraku, ztrátu hlasu, astma, kašel všeho druhu, plivání krve, tísnivý pocit dechu, koliku, otravu šeríkem, žloutenku, močové stížnosti, horečku, vodnatelnost a lepru, ženské problémy spojené s melancholií a všechny nákazy.⁹⁵

3.3.6.1 Analgetická aktivita

Mák vděčí za svůj analgetický účinek přítomnosti morfinových alkaloidů: morfinu, opioidu se silným analgetickým působením, a kodeinu, který však má analgetický efekt slabší. **Morfin** byl poprvé izolován Sertürnerem v r. 1803, jeho struktura byla objasněna r. 1925 a totální syntéza pochází z r. 1952. Působení morfinu je zprostředkováno stimulací tří typů opioidních receptorů: μ , κ_1/κ_3 , δ , přičemž největší selektivitu má k μ receptorům. Stimulací μ receptorů dochází k supraspinální a spinální analgezií, euforii, sedaci, mióze, dechové depresi, zpomalení motility trávicího ústrojí a k závislosti. Stimulace κ receptorů: spinální a periferní analgezie, sedace, dysforie, mióza, snížení motility GIT a stimulací δ receptorů dochází k spinální analgezií, dechové depresi, snížení motility GIT. Morfin intenzivně tlumí vnímání bolesti, působí lépe na těžkou, stálou bolest než na ostrou, přerušovanou bolest. Účinek je selektivní, neoslabuje vnímání jiných senzitivních podnětů. Analgezií doprovází emoční zklidnění, odstranění napětí a strachu, pocit spokojenosti až euforie. Morfin je dostupný ve formě injekcí nebo tablet. Kodein má slabý až středně silný analgetický efekt, který se připisuje vzniku asi 10 % morfinu jeho metabolizací. Jako analgetikum se používá v kombinaci např. s paracetamolem nebo kyselinou acetylsalicylovou.^{9,96}

3.3.6.2 Antitusická aktivita

Prvním, v širším měřítku používaným léčivem tlumícím kašel, bylo opium, z něho byl v r. 1833 izolován alkaloid **kodein**. Kodein je 3-*O*-methyl derivát morfinu, který již v nižších než analgetických dávkách působí antitusicky a snižuje bronchiální sekreci. Má centrální účinek a kašlací reflex inhibuje tím, že tlumí centrum pro kašel v prodloužené míše. Má nižší sedativní účinek než morfin a u citlivých jedinců při dlouhodobějším užívání není vyloučen vznik závislosti. Kodein, jako některé další opiáty, zvyšuje tonus kosterního svalstva. Díky snížení GIT motility lze kodein použít i při terapii průjmu. Dalšími antitusicky působícími alkaloidy jsou **noskamin**, jehož efekt je způsoben vazbou na δ receptory, a alkaloid **narcein**.^{9,87,96}

3.3.6.3 Spasmolytická aktivita

Papaverin je benzyliochinolinový alkaloid, který byl až do třicátých let 20. století jediným prakticky používaným spasmolytikem muskulotropního typu. Spasmus hladkých svalů uvolňuje bez účasti ACh, účinek je spojován s inhibicí fosfodiesterasy s následným nahromaděním cAMP, který má podíl na relaxaci hladké svaloviny. Papaverin navozuje relaxaci cévního i mimocévního svalstva po perorálním a parenterálním podání, mimocévní svalstvo relaxuje blokováním pomalých vápníkových kanálů. Relaxační účinek má i na bronchiální svalstvo. Intravenózní podání papaverinu má i vasodilatační účinky, způsobující nežádoucí pokles krevního tlaku, bradykardii a arytmiie. Intravenózní podání se využívá při embolii a pro uvedené nežádoucí účinky je kontraindikováno u nemocných s poruchami srdečního rytmu. Kardiální účinky, negativně inotropní a negativně chronotropní, jsou zřejmě způsobeny antagonismem 6β adrenoreceptorů.^{9,13,87}

3.3.6.4 Účinky opia

Opium obsahuje velké množství rozmanitých látek, různý počet a obsah jednotlivých alkaloidů. Jejich synergické nebo antagonistické působení dává vznik komplexním účinkům opia. Silný analgetický efekt, vzniklý inhibicí aferentní nocicepce do limbického systému morfinem, je potencován noskapinem (narkotinem). **Noskapin** má slabý, centrálně narkotický, hypnotický účinek na mozkové hemisféry. Zesiluje tak narkotický účinek morfinu v mozkové kůře. Tento efekt je následně vystřídán přehnanými reflexy v důsledku stimulace míchy, projevujícími se jako třes a neklid. Křeče a zvýšená excitace vzniká patrně u pacientů dlouhodobě užívající opium, kteří užili jinou šarži opia s vyšší obsahem noskapinu. Výhoda v podání spolu s morfinem je, že stimuluje dýchání a snižuje tak depresi dechu. S kodeinem zesiluje jeho antitusický účinek, periferně působí jako papaverin s výrazně slabším účinkem. Relaxuje hladké svalstvo, průdušky, ale nemá žádný vliv na kosterní svalstvo.⁹⁷ **Narcein** má morfinu podobný slabý účinek. Samotný, ve formě tablet, je možné ho užít jako slabé hypnotikum a antitusikum ke zmírnění kašle. Jeho výhodou je, že má méně tlumivý účinek než morfin a nezpůsobuje

zácpu.⁹⁸ **Kryptonin** je protopinový alkaloid s centrálně paralytickým účinkem. Jeho farmakologické působení je mezi účinkem berberinu a papaverinu. Stimuluje dělohu (izolovanou i *in situ*) jako berberin, postrádá ale účinek papaverinu na střevo.⁸⁷ **Protopin** dle starších údajů způsobuje u studenokrevných i teplokrevných živočichů těžké křeče s nástupem paralýzy. Vysoká koncentrace protopinu na izolovaných orgánech způsobuje jejich paralýzu. U psů způsobuje vzrušení, sedativní a hypnotický účinek chybí.⁸⁷ Bylo zjištěno, že protopin snižuje produkci oxidu dusného (NO), cyklooxygenasy 2 a prostaglandinu E₂ u lipopolysacharidy indukované zánětlivé reakci myších makrofágů bez cytotoxického účinku. Tato inhibice byla způsobena blokadou fosforylace mitogeny aktivované protein kinasy (MAP kinasy).⁹⁹ Ostatní opiové alkaloidy způsobují křeče, jako například laudanin, laudanosin, tritopin, některé vykazují centrální nebo kurareformní periferní paralytický účinek např. gnoskopin, nebo hydrokotarnin, některé jsou prakticky neúčinné z hlediska jejich studované aktivity, jako pseudomorfin. U některých alkaloidů nebyla studována jejich farmakologická aktivita.⁸⁷

Hlavní alkaloidy opia mají ve všech případech narkotický účinek. Tento účinek klesá v pořadí: morfin, papaverin, kodein, narkotin (noskapin), thebain. Zvýšení reflexů je postupně zvyšováno nástupem účinku pozdějších členů skupiny alkaloidů. Thebain svým stimulačním účinkem na míchu zcela zastiňuje depresivní účinek na mozkových hemisférách. Všechny opiové alkaloidy se vstřebávají z GIT, benzylochinolinové alkaloidy se zpožděním. Nízká biodostupnost při perorálním podání je způsobená vysokým jaterním first pass metabolismem.⁸⁷

Farmakokinetické údaje o opiu nejsou známy, vychází se z údajů jednotlivých hlavních alkaloidů.⁸⁷

3.3.7 VYUŽITÍ PAPAVER SOMNIFERUM L.

Mák je velmi stará kulturní rostlina. Opium se ve starém Řecku používalo jako lék, při věštění, kouřových obřadech v chrámech a mystériích. Účinky opia na lidský organismus popsal římský lékař Scribonius Largus, kdy se opiové přípravky užívaly ve formě pilulek, čípků, klystýrů a zábalů. Dle Plinia se v Římě opiem léčila elefantiáza, jaterní obtíže, uštknutí štírem a epilepsie.

V Evropě se opium používalo pro lékařské účely (zároveň zneužívalo pro jeho psychoaktivní účinky) až od 17. století.⁸⁹

Lidově se opium používalo v zažívacím ústrojí pro snížení motility střev při střevním krvácení (u tyfu, vředů, střevní tuberkulóze), zánětu pobřišnice, spastických stavech hladkého svalstva včetně žlučových a močových cest, u žlučnickových a ledvinových kamenů a u kolik močového měchýře.⁸⁸ Opium má delší a výraznější účinek na střeva než morfin, a proto mají přípravky z opia přednost při průjmových a střevních poruchách.¹⁰⁰

Opium má článek v řadě lékopisů. Dle ČL 2009 je surové opium určeno výhradně pro přípravu galenických přípravků a samotné se nesmí vydat.¹⁰¹

Opium se zevně používá jako náplast (*Emplastrum Opii*), liniment (*Linimentum Opii*), nebo jako tinktura přidávaná do vody. Zevně nemají alkaloidy žádný vliv na nervová zakončení, používají se kvůli absorpci, prohřívání a proti podráždění. Tuhé a tekuté extrakty a opiová tinktura jsou obvyklé lékové formy pro vnitřní použití jako hypnotika, proti bolesti a jako antidiarrhoikum ve formě prášku. Opiové čípky byly používány k úlevě od bolesti konečníku a bolesti pánevní oblasti.¹⁰⁰

Opium a maková sláma v dnešní době slouží především pro izolaci jednotlivých alkaloidů a k jejich následnému farmaceutickému použití. Některé alkaloidy jsou dále využívány jako látky pro výrobu semisyntetických léčiv.

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Obecné metody

4.1.1 Příprava a čištění rozpouštědel

Všechna komerční rozpouštědla, která byla při práci použita, byla předem přečištěna destilací. Dle tabelární hodnoty teploty varu daného rozpouštědla byla jímána hlavní frakce s tím, že bylo predestilováno max. 95 % objemu rozpouštědla.

4.1.2 Odpařování extraktů a jejich uchování

Chromatografické frakce byly odpařovány za sníženého tlaku s použitím vakuové odparky při teplotě nepřesahující 40 °C. Odparky alkaloidních bazí, určené pro zjištění biologické aktivity, byly v 5 ml injekčních ampulkách rychle odpařeny v proudu filtrovaného vzduchu při max. 60 °C na vodní lázni.

4.1.3 Stanovení struktury izolované látky

¹H NMR (500 MHz) a ¹³C NMR (125.7 MHz) spektra byla na přístroji Varian Inova 500 Spektrometr a hmotnostní spektra (ESI-MS) na přístroji Thermo Finnigan LCQDuo Spektrometr.

4.2 Rostlinný materiál

Rostlinná kultura byla založena na jaře 2008 z komerčního osiva *Papaver somniferum* L. cv. Opál, dodaného firmou LABRIS s. r. o., Dobré 51, 517 93 Dobré v Botanické zahradě léčivých rostlin farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy. V červenci-srpnu 2008 byly sklizeny zelené tobolky, rozříznuty, vyklepána nezralá nevyvinutá semena Sušení probíhalo 2 dny při 50 °C, poté byl suchý materiál rozemlet na části do 3 mm na tříštivém mlýnu. Celkem bylo získáno 7,0 kg suchého hnědo zeleného materiálu.

4.3 Příprava extraktů

Základní extrakt:

7 kg rozemletých tobolek bylo zalito 96% etanolem, 2 dny ponecháno v klidu a poté byla provedena perkolace 78 litry ethanolu (poměr 1:11,1). Z extraktu bylo rozpouštědlo odpařeno za

snížené teploty, odparek byl dispergován v 2 litrech 2% HCl na pH 1-2 (s použitím indikátorového papírku), zředěn vodou na 5 litrů a zfiltrován (tmavě hnědý, pěnicí). Ze základního extraktu byly připraveny následující výtřepky:

Výtřeppek Ac-Et₂O:

Základní extrakt byl zalkalizován 900 ml 10% NaOH pH 9,5-10 a vytřepán 4x1,2 litry Et₂O (vrstvy se dobře dělily), organická fáze byla zfiltrována a odpařena.

n = 38 g tmavě hnědý, velmi viskózní.

Výtřeppek Ad-CHCl₃:

Vodná fáze po vytřepání Et₂O byla vytřepána 4x1,2 litry CHCl₃; organická vrstva se hůře oddělovala. Po rozdělení byla organická fáze zahuštěna, vyloučila se žlutavá práškovitá látka, která nebyla z odparku oddělena.

n=20,5 g světle hnědý, s náznakem bělavé práškovité hmoty, nekystalický.

Výtřeppek Bc-Et₂O:

Primární extrakt po chloroformovém výtřepku A byl zalkalizován 50% NaOH na pH 12,5-13 (celkem vzniklo 8,1 litru roztoku) a byl vytřepán 5x2 litry Et₂O. Et₂O roztok byl po dobrém oddělení fází odpařen.

n = 1,1 g tmavě hnědý, velmi viskózní, vyloučilo se málo drobných krystalků.

Výtřeppek Bd-CHCl₃:

Po okyselení malého množství silně alkalického primárního extraktu z předchozího vytřepávání H₂SO₄ bylo přidáno Mayerovo činidlo; vznikl velmi jemný zákal, a proto už dále nebylo provedeno vytřepávání CHCl₃, ale bylo provedeno srážení zbytkových alkaloidů do formy mayerátu.

Kvartérní jodidy J:

Tyto jodidy nebyly při pH 3 připravovány, ale kvartérní baze získány ve formě mayerátu, jak je uvedeno v následujícím odstavci.

Kvarterní alkaloidy Q:

Primární extrakt, silně alkalický z vytřepávání Et₂O při pH 13, byl zneutralizován 3M H₂SO₄ na pH 3 (během této operace hnědý roztok výrazně zesvětlá, ca 11,7 litrů), zbytek alkaloidů byl vysrážen přidávkem Mayerova činidla (1 litr). Po sedimentaci drobné černé sraženiny byla provedena dekantace, filtrace na Büchnerově nálevce, sraženina promyta destilovanou vodou a po oschnutí na vzduchu vysušena ve vakuu a odložena.

n=3,2 g hnědý, práškovitý

Příprava extraktu a jednotlivých výtřepků byla provedena mimo rámec diplomové práce.

Dále byl zpracován pouze výtřepok Ac-Et₂O:

38 g tohoto výtřepku bylo rozpuštěno v 600 ml 2% HCl (pH 1), roztok byl zfiltrován v tubusu přes vrstvu křemeliny a vytřepán 3x 200 ml Et₂O. Po odpaření organické fáze vzniklo 1,85 g tmavě hnědé, velmi viskózního odparku, ve kterém se vylučovala bělavá práškovitá hmota (negativní reakce na alkaloidy za použití Mayerova činidla).

Kyselá vodná fáze byla vytřepána 4x 250 ml CHCl₃, organická fáze byla odpařena. Vzniklo 2,85 g tmavě hnědé, velmi viskózního odparku, pozitivně reagujícího na alkaloidy, který byl odložen a dále nezpracován.

Zbylá vodná fáze byla alkalizována 10% roztokem Na₂CO₃, vzniklých 980 ml zakaleného hnědé roztoku bylo vytřepáno 5x 300 ml CHCl₃. Po odpaření vzniklo 22,45 g hnědé, velmi viskózního odparku, pozitivně reagujícího na alkaloidy. Tento odparek byl rozpuštěn ve 150 ml 2% HCl (pH 1), zředěn vodou na 450 ml a zalkalizován 10% roztokem NaOH. Suspenze byla vytřepána 4x300 ml Et₂O, (organická fáze odpařena za vzniku 4,12 g hnědé nekystalického odparku a dále nepoužita). Vodná fáze byla vytřepána 5x300 ml CHCl₃ a organické vrstvy odpařeny. Vzniklo 12,25 g tmavě hnědé, prakticky práškovitého odparku, pozitivně reagujícího na alkaloidy, označeného ADd s obsahem několika alkaloidů (obr. 3).



Obr. 3: Pilotní TLC výtřepku ADd
(Kieselgel Merck, UV254 nm, toluen+CHCl₃+Et₂NH 45+45+10, komora nasycená, vyvíjení 1x, detekce UV 254 nm, Dragendorff. činidlo).

ADd (chloridy alkaloidů nerozpustné v CHCl₃, baze rozpustné v CHCl₃)

4.4 Tenkovrstvá chromatografie (TLC)

Tenkovrstvá chromatografie byla prováděna v systému N (normálních) komor, vzestupně. Použité komory byly nasyceny mobilní fází, kdy sycení komory trvalo přibližně 1 hodinu.

4.4.1 Adsorbenty

Kieselgel 60 GF₂₅₄ fuer TLC (Merck)

4.4.2 Chromatografické soustavy

S1 Toluén + chloroform + diethylamin 45 : 45 : 10

4.4.3 Detekční činidla

D1: Dragendorffovo činidlo (podle Muniera)

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

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

Příprava zásobního roztoku: připraví se směs roztoků A a B v poměru 1 : 1. Vzniklý roztok může být uchováván v chladničce při 4 °C po dobu až několika měsíců.

Příprava detekčního roztoku: 5 ml zásobního roztoku se přidá k roztoku 10 g kyseliny vinné v 50 ml vody. Uchovává se v chladničce při 4 °C po dobu několika měsíců.

Činidlo se používá pro detekci alkaloidů na TLC.

D2: Mayerovo činidlo

1,35 g chloridu rtuťnatého a 5,0 g jodidu draselného se rozpustí ve vodě a doplní se do 100,0 ml.

4.5 Chemikálie, rozpouštědla a další potřeby

4.5.1 Pro přípravu extraktů a TLC

Ethanol č. 95%, denaturovaný methanolem (EtOH)

Diethylether (Et₂O)

Diethylamin (Et₂NH)

Hydroxid sodný 2% (NaOH)

Hydroxid sodný 50% (NaOH)

Chloroform č. (CHCl₃)

Kyselina chlorovodíková 2% (HCl)

Kyselina sírová (H₂SO₄)

Methanol č. (MeOH)

Toluen č. (C₆H₅CH₃)

Argon

Dragendoffovo činidlo

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

Mayerovo činidlo

Oxid hlinitý (Al₂O₃)

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

Chemikálie:

Acetylthiocholin jodid (Sigma-Adrich) (použit 10mM roztok)

Butyrylthiocholin jodid (Sigma-Adrich) (použit 10mM roztok)

Dimethylsulfoxid p. a. (Sigma-Adrich)

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

Galanthamin hydrobromid (Changsha Organic Haerb Inc., China)

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

Pufry:

- 5mM Fosfátový pufr pH 7,4

Zásobní roztok A

10 mM roztok NaH_2PO_4 (v 1 litru roztoku je obsaženo 1,20 g NaH_2PO_4 , nebo 1,38 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, nebo 1,56 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$).

Zásobní roztok B

10 mM roztok Na_2HPO_4 (v 1 litru roztoku je obsaženo 1,42 g Na_2HPO_4 , nebo 1,78 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, nebo 3,58 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$).

Smíchá se 57 ml roztoku A a 283 ml roztoku B a 300 ml vody.

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

Zásobní roztok A

200 mM roztok NaH_2PO_4 (v 1 litru roztoku je obsaženo 24,0 g NaH_2PO_4 , nebo 27,6 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, nebo 31,2 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$).

Zásobní roztok B

200 mM roztok Na_2HPO_4 (v 1 litru roztoku je obsaženo 28,4 g Na_2HPO_4 , nebo 35,6 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, nebo 71,63 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$).

Smíchá se 57 ml roztoku A a 243 ml roztoku B a 300 ml vody.

Biologický materiál:

Zdrojem lidské acetylcholinesterasy (HuAChE) byla pouzdra lidských erytrocytů. Jako zdroj butyrylcholinesterasy (HuBuChE) byla použita lidská plazma.

Pouzdra erytrocytů byla připravena z čerstvé krve, odebrané od zdravých dobrovolníků. K odebrané krvi byl přidán 1 ml citrátu sodného na 10 ml odebrané krve podle upravené metody Stecka a Kanta¹. Plazma byla z krve odstředěna při rychlosti 4000 ot.min⁻¹ s použitím centrifugy Boeco U-32R s rotorem Hettich 1611. Erytrocyty byly přemístěny do zkumavek o objemu 50 ml a byly třikrát promyty 5mM fosfátovým pufrům (pH 7,4), který obsahuje 150 mM NaCl (12 000 ot.min⁻¹, centrifuga Avanti J-301, rotor JA-30.50). Takto promyté erytrocyty byly následně míchány 10 minut s 5mM fosfátovým pufrům (pH 7,4), tím došlo k erytrocytární lýze. Poté byly erytrocyty centrifugovány rychlostí 20000 ot.min⁻¹ a vzniklá pouzdra erytrocytů byla promyta třikrát fosfátovým pufrům, adjustována do mikrozkušavek a uchovávána při -22°C do doby použití.

4.5.3 Pro stanovení antioxidační aktivity

Chemikálie:

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

Dimethylsulfoxid p. a. (Sigma-Aldrich)

Kvercetin č. (Sigma-Adrich)

Kyselina askorbová č. (Sigma-Aldrich)

Trolox č. (Sigma-Adrich)

4.6 Izolace a stanovení struktury izolovaných látek

4.6.1 Dělení výtřepku ADd pomocí TLC

Hmotnost odparku	12,25 g
Desky	Kieselgel 60 GF254, 15 x 15 cm; na jednu desku 6,5 g adsorbentu,

	pruh na startu 13 cm
Počet desek	210 desek
Soustava	chloroform + toluen + diethylamin 45 : 45 : 10
Komora/vyvíjení	Nasyčená, vyvíjení 2x
Detekce	UV 254 nm

Tabulka č. 4: Dělení výtřepku ADd

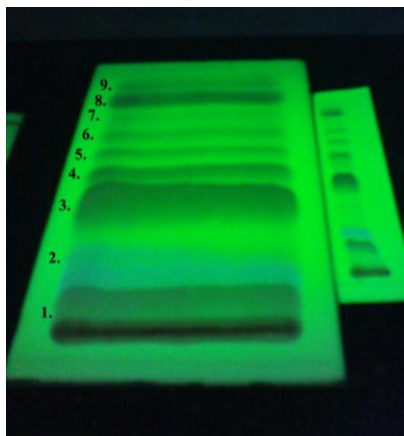
Odparek byl rozpuštěn ve směsi chloroform+EtOH 1 : 1 (celkem 88 ml) a roztok byl postupně nanesen na uvedené chromatografické desky obvyklým způsobem nanášení (průtokovou kapilárou).

Po vysušení chromatogramu byly zóny z desek oddělovány, adsorbent ze zón stejné kvality spojen, přidána křemelina, asi polovina vzhledem k jeho objemu, vsypán do trubice a eluován dostatečným množstvím směsi $\text{CHCl}_3 + \text{EtOH}$ 1 : 1.

Tabulka č. 5: Výsledky preparativní chromatografie

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

* zóny 7-9 byly spojeny, jejich rozdělení na individuální látky bylo obtížné



Obr. 4: Preparativní TLC výtřepku ADd

4.6.2 Zpracování zóny č. 1

1,32 g tmavě hnědého odparku, v němž se vyloučila okrová práškovitá látka bylo rozpuštěno ve 35 ml směsi $\text{CHCl}_3 + \text{EtOH}$ 95 + 5, roztok byl zfiltrován přes 1 cm vrstvu křemeliny ve filtračním tubusu a vlit na chromatografickou kolonku s obsahem 30 g neutrálního Al_2O_3 0,063-

0,200 mm, desaktivovaného 6 % vody (průměr x výška = 1,6 x 15 cm) a kolonka promyta 750 ml této směsi. Světle hnědý odparek (0,92 g) byl krystalizován ze směsi CHCl₃-EtOH.

Po vysušení vzniklo 0,64 g okrové, práškovité látky, t. t. 193-195 °C (rozkl.), označené JR-1

4.7 Stanovení cholinesterasové inhibiční aktivity (IC₅₀)

Cholinesterasová inhibiční aktivita IC₅₀ byla stanovena s použitím Ellmanovy spektrofotometrické metody, která využívá 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoovou kyselinu (DTNB). Estery thiocholinu se používají jako substráty, které cholinesterasy štěpí na thiocholin a příslušnou kyselinu. Při této metodě se stanovuje SH- skupina thiocholinu, která se váže na DTNB. Vzniklý produkt se žlutým zbarvením se spektrofotometricky stanovuje při vlnové délce 436 nm, měří se nárůst absorbance za 1 minutu. Z naměřených hodnot poklesu aktivity AChE nebo BuChE byly následně vypočteny hodnoty IC₅₀ nelineární regresi. Výpočty byly provedeny v programu GraphPad Prism (verze 3.02 pro Windows; Graph Pad Software, San Diego, USA). Zjištěné výsledky byly porovnány s hodnotami IC₅₀ známých cholinesterasových inhibitorů, a to s galanthaminem a huperzinem A. Procenta inhibice (% I) byla vypočtena podle vzorce $I = 100 - (\Delta A_{BL} / \Delta A_{SA}) * 100$, kde ΔA_{BL} je nárůst absorbance slepého vzorku za 1 minutu a ΔA_{SA} je nárůst absorbance měřeného vzorku.

Při přípravě slepého vzorku se do jamky mikrotitrační destičky napipetuje 8,3 μl pouzder lidských erytrocytů nebo plazmy, přidá se 67 μl DTNB, 8,3 μl rozpouštědla použitého pro ředění vzorků (DMSO), 215 μl 100mM fosfátového pufru a 33,5 μl substrátu.

Při přípravě měřených vzorků (extraktů) se používají stejné objemy činidel a roztoku substrátu. Namísto samotného rozpouštědla se přidá roztok měřené látky o různé koncentraci (40,0; 10,0; 4,0; 1,0; 0,4, v DMSO, případně nižší), či roztok extraktu o různé koncentraci (20,0; 10,0; 2,0; 1,0; 0,2 mg/ml, případně nižší).

Stanovení probíhá při teplotě 37 °C, vlnové délce 436 nm v kinetickém módu během 1 minuty (7 měření). Výpočet hodnoty IC₅₀ se stanoví s použitím programu GraphPad Prism – určí

se 50% inhibiční koncentrace. Cholinesterasová inhibiční aktivita bylo porovnána s referenčními látkami: galathaminem, huperzinem A a eserinem.

4.8 Stanovení antioxidační aktivity

Antioxidační aktivita byla *in vitro* testována DPPH testem. Ke stanovení hodnoty antioxidační aktivity (EC_{50}) měřených látek nebo extraktů se využívá reakce s 2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl radikálem, který je fialově zbarven. Reaguje s látkami, které fungují jako donor vodíku. Redukovaná forma radikálu je žlutě zbarvena, čímž dochází k odbarvení fialového roztoku. Míra poklesu zbarvení roztoku (absorbance) se měří spektrofotometricky při 525 nm.

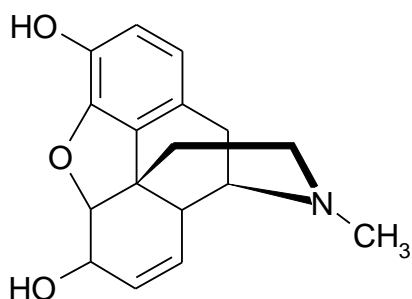
Roztoky extraktů se připraví podle rozpustnosti v DMSO nebo EtOH v koncentraci 2,0; 1,0, 0,5; 0,2 mg.ml⁻¹. Dle schématu se do mikrotitrační destičky nepipetuje 100 µl jednotlivých roztoků vzorků a 100 µl 0,2 mM roztoku DPPH.

Po 40 minutách od smíchání roztoků se měří absorbance při vlnové délce 525 nm. Výpočet % inhibice se provede podle vzorce: $\%Q = (1 - A_x/A_0) \cdot 100$, kde A_0 je průměrná absorbance, naměřená u slepého vzorku (zde je místo roztoku antioxidantu použito samotné rozpouštědlo DMSO nebo EtOH) a A_x je absorbance, naměřená po přidání roztoku antioxidantu, od které je odečtena absorbance samotného roztoku vzorku. Výpočet hodnoty EC_{50} se provede pomocí programu GraphPad Prism – určí se 50% účinná koncentrace antioxidační aktivity.

5. VÝSLEDKY

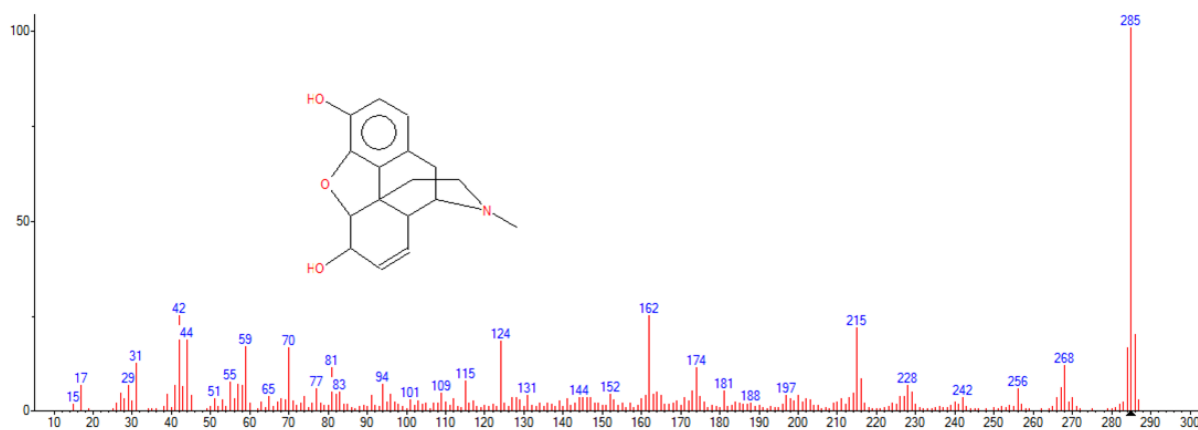
5.1 Stanovení struktury JR-1

Na základě zhodnocení spektrální výsledků a jejich porovnání s literárními údaji lze konstatovat, že látka JR-1 je morfin.



morfin

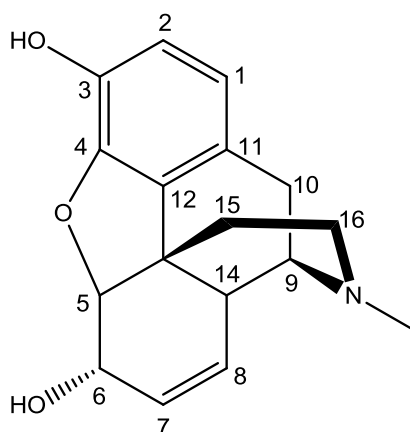
5.1.1 MS studie morfinu



Obr. 5: MS studie morfinu

EI-MS m/z : 285 [M^+] (100); 284 (15); 268 (15); 215 (25); 162 (28); 124 (20)

5.1.2 NMR studie morfinu



Obr. 6: NMR studie morfinu

^1H NMR (DMSO, 25°C):

1.74 (1H, H-15eq.); 2.04 (2H, H-15ax.; H-10qe); 2.30 (2H, H-10qe(α), -NCH₃); 2.4-2.5 (2H, H-16ax.,eq.); 2.79 (1H, H-14); 3.00 (1H, H-10qe(β)); 3.25 (1H, H-9); 4.55 (1H, H-6); 5.04 (1H, H-7); 6.04 (1H, H-8); 6.68 (1H, H-1); 7.03 (1H, H-2).

^{13}C NMR (CDCl₃, 25°C):

20.20 C-10; 35.56 C-15; 40.63 C-14; 42.83 -NCH₃; 42.97 C-13; 46.05 C-16; 58.09 C-9; 66.38 C-6; 91.49 C-5; 116.36 C-2; 118.60 C-1; 125.53 C-11; 128.50 C-8; 131.04 C-12; 133.43 C-7; 138.45 C-3; 146.30 C-4.

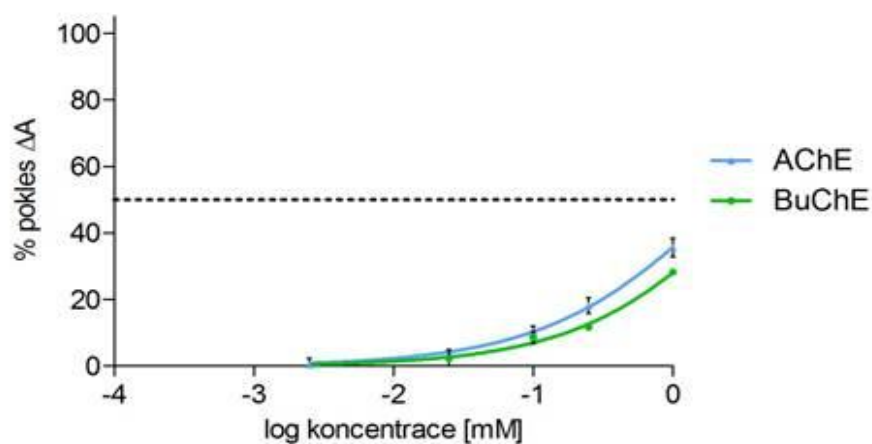
5.2 Stanovení cholinesterasove inhibiční aktivity

Z naměřených hodnot inhibice cholinesteras, lze usoudit, že morfin oba enzymy neovlivňuje.

Tabulka č. 6: inhibiční aktivita morfinu vůči AChE a BuChE

	IC ₅₀ μM	
	AChE	BuChE
morfin	>1000 (2357)	>1000 (3744)

Graf č.1: inhibiční aktivita morfinu vůči AChE a BuChE v závislosti na koncentraci



5.2.1 Výsledky antioxidační aktivity

Hodnota EC_{50} DPPH testu pro morfin je nižší než $500 \mu\text{M}$. Z toho vyplývá, že látka nedisponuje významnou antioxidační aktivitou za použití DPPH testu.

6. DISKUSE

V dnešní době je terapie Alzheimerovy choroby stále problematická. AD vzniká na podkladě mnoha patofyziologických procesů, z nichž některé spolu úzce souvisí, nebo na sebe navazují. Hlavním terapeutickým cílem v terapii AD je inhibice mozkových cholinesteras. V ČR jsou registrované 3 inhibitory AChE: rivastigmin, donepezil a galanthamin. Galanthamin je přírodním alkaloidem. Alkaloid fysostigmin se dnes již pro své nežádoucí účinky nepoužívá. Velice perspektivní přírodní látkou je alkaloid huperzin A izolovaný z čeledi Huperziaceae, který je již v poslední fázi klinického hodnocení. Druhým dnes používaným terapeutickým cílem u AD je využití antagonistů NMDA receptorů. Jediným antagonistou, schváleným pro terapii AD, je memantin. Látek pro terapii AD není mnoho, a tak se stále hledají nové, syntetické i přírodní látky, které by mohly svým působením příznivě ovlivnit progresi AD.

Čeleď Papaveraceae nabízí některé rostliny, které obsahují látky aktivní vůči cholinesterasám. Jednou z nich je např. *Chelidonium majus* s alkaloidy, jež inhibují lidskou AChE. Z tohoto důvodu jsou alkaloidy máku setého *Papaver somniferum* zkoumány z hlediska účinku na cholinesterasy. Dalším důvodem zkoumání je to, že některé morfinanové alkaloidy nebo základ struktury morfinanových alkaloidů vykazují neuroprotektivní působení. Dextrometorfan a jeho analogy mají antikonvulzivní efekt, vyvolaný pravděpodobně interakcí se σ receptory a slabou bloádou NMDA receptorů, zmenšují důsledky mozkové ischemie. Tyto účinky vykazuje i antagonist morfinových receptorů naloxon. 3-hydroxymorfinan vykazuje neurotropní účinek na astroglie a jeho protizánětlivý účinek je dán inhibicí aktivace mikroglíí, snižuje toxicitu vyvolanou lipopolysacharidy. Diskutováno je jejich použití u zánětlivých neurodegenerativních onemocnění a excitotoxicity, a to jak léčebně, tak profylakticky.¹⁰¹ Látky typu morfinan-6-onu, konkrétně *N*-formylmorfinan-6-onu, mají potenciál k léčbě nebo prevenci neurodegenerativních onemocnění. Všechny testované látky typu *N*-formylmorfinan-6-onu posilují cholinegický systém inhibicí AChE, přitom nevykazují agonismus na opioidních ani sigma receptorech. Jejich použití by bylo možné u těchto onemocnění: Alzheimerova choroba, Parkinsonova choroba, mírná kognitivní porucha, amyloidóza, roztroušená skleróza, amyotrofická laterální skleróza, Huntingtonova choroba, Pickova nemoc, bovinní spongiformní encefalitida a Creutzfeldt-Jakobova nemoc.¹⁰²

Mák setý je rostlinou, která nabízí velké množství alkaloidů, popsáno jich bylo již okolo 40, a můžeme je zařadit do následujících 7 skupin, dle jejich chemické struktury: morfinové alkaloidy, benzyloisochinolinové, ftalidisochinolinové, tetrahydroisochinolinové, protopinové, protoberberinové a aporfinové alkaloidy. Zastoupení jednotlivých alkaloidů i jejich obsah v nezralém plodu máku je silně závislý na genetických faktorech, době sklizně i klimatických podmínkách. Obsah morfinu v nezralých makovicích je do 0,89 % a obsah zbývajících alkaloidů je v rozmezí 0,035 – 0,23 %.⁸⁷ Latex, který začne vytékat po nařezání nezralých makovic na vzduchu zaschne a vzniká na alkaloidy bohaté opium. Opium obsahuje až 25 % alkaloidů, přitom některé vznikají až při zasychání latexu. Hlavním alkaloidem je morfin, v množství 9 – 17 %. Druhou nejvyšší koncentraci má alkaloid noskapiin 2 – 10 % a dále kodein v koncentracích od 0,2 do 3 %. Majoritními alkaloidy opia jsou i papaverin, thebain a narcein.⁸⁷ Úplný seznam alkaloidů izolovaných z opia viz. tabulka č. 3.

Ze suchých zelených makovic byl připraven ethanolický extrakt, odpařen do sucha a zředěn 2% HCl. Alkalizací tohoto základního extraktu 10% NaOH na pH 9,5 – 10 a vytřepáním 4 x 1,2 litry Et₂O byl získán tmavě hnědý, viskózní diethyletherový výtřepek. Výtřepek byl postupnou alkalizací rozdělen podle pH na jednotlivé frakce alkaloidů. Frakce č.6, se kterou se dále pracovalo, byla označena jako ADd, obsahovala chloridy alkaloidů nerozpustné v CHCl₃, baze rozpustné v CHCl₃. Odparek byl rozpuštěn ve směsi CHCl₃+EtOH, nanesen na chromatografickou desku a vyvíjen v soustavě chloroform+toluen+diethylamin (45:45:10). Po vysušení byly spojovány jednotlivé zóny adsorbentu, smíchány s křemelinou a eluovány směsí CHCl₃+EtOH. Odpařením zóny č. 1 vzniklo 1,32 g hnědého odparku, ten byl rozpuštěn ve směsi CHCl₃+EtOH a zfiltrován přes vrstvu křemeliny a vlit na chromatografickou kolonu s neutrálním Al₂O₃. Po odpaření byl hnědý odparek krystalizován ze směsi CHCl₃+EtOH. Po vysušení vzniklo 0,64 g okrové, práškovité látky, označené JR-1. Na základě spektrálních výsledků konstatuji, že látka, označená jako JR-1, je morfin. Morfin se v tomto výtřepku vyskytoval díky jeho rozpustnosti v CHCl₃ a velmi omezené rozpustnosti v Et₂O.

Na izolovaném morfinu byla sledována aktivita vůči lidským cholinestetasam a jeho antioxidační aktivita. Zdrojem lidské AChE byla pouzdra lidských erytrocytů, jako zdroj BuChE

lidská plazma. Cholinesterasová inhibiční aktivita byla stanovena Ellmanovou metodou, kde cholinesterasy štěpí estery thiocholinu na thiocholin a příslušnou kyselinu. Metodou se stanovuje SH- skupina thiocholinu, která reaguje s 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoovou kyselinou a vzniklý barevný produkt, resp. nárůst absorbance je dokazován spektrofotometricky. Antioxidační aktivita morfinu byla testována DPPH testem, který využívá reakci s fialově zbarveným 2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl radikálem.

Naměřená inhibiční aktivita morfinu vůči AChE je $IC_{50}=2357 \mu M$, vůči BuChE je $IC_{50}=3744 \mu M$. Z těchto hodnot lze usoudit, že morfin oba enzymy neovlivňuje. Při DPPH testu se antioxidační aktivita morfinu nepotvrdila. Ale je možné, že morfin je aktivní na jiných místech v souvislosti s vývojem AD, např. inhibice beta-sekretasy BACE1. Na sledování těchto účinků se pracuje.

7. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AcCoA	acetylkoenzym A
AD	Alzheimerova choroba
ACh	acetylcholin
AChE	acetylcholinesterasa
ApoE-e4	apolipoprotein E-e4
APP	amyloidový nekurzorový protein
BACE1	beta-sekretasa 1
BuChE	butyrylcholinesterasa
CAT	cholinacetyltransferasa
CNS	centrální nervový systém
COX-2	cyklooxygenasa 2
CT	počítačová tomografie
DMSO	dimethylsulfoxid
DNTB	kyselina 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová
DYRK1A	dvojí specifická fosforylace tyrosinu regulovaná proteinkinasou 1
EBM	Evidence Based Medicine (medicína založená na důkazech)
Et ₂ O	diethylether
GABA	γ-aminomáselná kyselina
GIT	trávicí ústrojí
H ₂ SO ₄	kyselina sírová
HCl	kyselina chlorovodíková
HuAChE	lidská acetylcholinesterasa
HuBuChE	lidská butyrylcholinesterasa
CHCl ₃	chloroform
IL-1β	interleukin 1β
IL-6	interleukin 6
MR	magnetická resonance
NaOH	hydroxid sodný
NMDA	<i>N</i> -methyl-D-aspartát
NMR	nukleární magnetická resonance
PET	pozitronová emisní tomografie

PKC	proteinkinasa C
PS1	presenilin 1
PS2	presenilin 2
TNF- α	tumor nekrotizující faktor α
β A1-40, β A1-42	fragmenty β -amyloidu s 40, resp. 42 aminokyselinami

8. LITERATURA

1. <http://www.lf.upol.cz/menu/struktura-lf/kliniky/neurologicka-klinika/centra-lecebne-pece/centrum-pro-diagnostiku-a-lecbu-neurodegenerativnich-onemocneni>, staženo 2.3.2012.
2. http://www.google.cz/url?sa=t&rct=j&q=friedreichovu%20ataxie&source=web&cd=1&ved=0CCIQFjAA&url=http%3A%2F%2Fwww.uhkt.cz%2Ffiles%2Fnrl-dna%2Fblp%2FGLP_Fajkusova_Friedreich.pdf&ei=tn4_T7z4A42h-Qb0vK2_BQ&usg=AFQjCNEMQQdDtyczhm7EtbzSC5qpmLrFOQ&cad=rja, staženo 2.3.2012.
3. <http://www1.lf1.cuni.cz/~zfishar/bp/8.2.htm>, staženo 16.3.2012.
4. <http://www.gerontologie.cz/showdoc.do?docid=25>, staženo 16.3.2012.
5. http://www.alz.org/alzheimers_disease_causes_risk_factors.asp, staženo 16.3.2012.
6. http://www.alz.org/alzheimers_disease_stages_of_alzheimers.asp, staženo 16.3.2012.
7. Mačák J., Mačáková J.: *Patologie*, str. 306. Grada publishing, a.s., Praha, 2004.
8. Jiráček R.: Nové postupy v biologické terapii demencí, *Psychiatrie pro praxi* 2010, 143-144.
9. Lincová, D., Farghali, H. et al.: *Základní a aplikovaná farmakologie*, vydání 2. Galén, 2007.
10. <http://apt.rcpsych.org/content/8/2/89.full>, staženo 16.3.2012.
11. Nigel H. Greig, Debomoy K. Lahiri and Kumar Sambamurti (2002). Butyrylcholinesterase: An Important New Target in Alzheimer's Disease Therapy. *International Psychogeriatrics*, 14 , pp 77-91 doi:10.1017.
12. Nigel H. Greig: [Selective butyrylcholinesterase inhibition elevates brain acetylcholine, augments learning and lowers Alzheimer \$\beta\$ -amyloid peptide in rodent](#). *National Academy of Sciences of the United States of America* 2005;102(47):17213-17218.
13. Doležal M.: *Farmaceutická chemie léčiv působících na autonomní nervový systém*. Karolinum, Praha 2009.
14. Mona Mehta: New Acetylcholinesterase Inhibitors for Alzheimer's Disease, *International Journal of Alzheimer's Disease* 2012; 2012:728983.
15. <http://www.aislp.cz/cz/>
16. Berk C., Sabbagh M.: Broader Considerations of Higher Doses of Donepezil in the Treatment of Mild, Moderate, and Severe Alzheimer's Disease. *Int J Alzheimers Dis.* 2012; 2012: 707468.
17. [Arikawa M](#), [Kakinuma Y](#), [Handa T](#), [Yamasaki F](#), [Sato T](#).: Donepezil, anti-Alzheimer's disease drug, prevents cardiac rupture during acute phase of myocardial infarction in mice. *PLoS ONE* 6(7): e20629. doi:10.1371/journal.pone.0020629.
18. <http://www.edukafarm.cz/clanek.php?id=853>, staženo 17.4.2012.

19. Melanie-Jayne R. Howes: The Role of Phytochemicals in the Treatment and Prevention of Dementia. [Drugs & Aging](#), Volume 28, Number 6, 1 June 2011 , pp. 439-468(30).
20. Yukio Ago¹, Ken Koda¹, Kazuhiro Takuma¹, and Toshio Matsuda: Pharmacological Aspects of the Acetylcholinesterase Inhibitor Galantamine. *Journal of Pharmacological Sciences* [Vol. 116](#) (2011) [No. 1](#) P 6-17.
21. Švestka J.: Galantamin – duální kognitivum s neuroprotektivním účinkem: *Psychiatrie, časopis pro moderní psychiatrii*, Praha: Tigris, 8, 4, od s. 304-314.
22. [Bordji K](#), [Becerril-Ortega J](#), [Buisson A](#).: Synapses, NMDA receptor activity and neuronal A β production in Alzheimer's disease. [Rev Neurosci](#). 2011;22(3):285-94.
23. Švestka J.: Memantin – necholinergní alternativa léčby Alzheimerovy a vaskulární demence. *Psychiatrie pro praxi*, Konice: Solen, 5, 3, od s. 162-168.
24. Martin J., Kršková Z., Dušek J.: Huperzin A jiné přírodní látky v léčbě Alzheimerovy choroby, *Praktické lékařství* 2011; 7(1).
25. Paulo J., Berkov, Strahil : Alkaloid s from *Hippeastrum papilio*, *Molecules* (2011), 16, 7097-7104.
26. [Nair JJ](#), [Aremu AO](#), [van Staden J](#).: Isolation of narciprimine from *Cyrtanthus contractus* (Amaryllidaceae) and evaluation of its acetylcholinesterase inhibitory activity. [J Ethnopharmacol](#). 2011 Oct 11;137(3).
27. [Elgorashi EE](#), [Stafford GI](#), [Van Staden J](#).: Acetylcholinesterase enzyme inhibitory effects of amaryllidaceae alkaloids. [Planta Med](#). 2004 Mar;70(3):260-2.
28. [Houghton PJ](#), [Agbedahunsi JM](#), [Adegbulugbe A](#).: Choline esterase inhibitory properties of alkaloids from two Nigerian *Crinum* species. [Phytochemistry](#). 2004 Nov;65(21):2893-6.
29. Pagliosa, L. B.: Effect of isoquinoline alkaloids from two *Hippeastrum* species on in vitro acetylcholinesterase activity *Phytomedicine* (2010), 17(8-9), 698-701.
30. Cahliková L.: Analysis of Amaryllidaceae alkaloids from *Chlidanthus fragrans* by GC-MS and their cholinesterase activity, *Natural Product Communications* (2011), 6(5), 603-606.
31. Choudhary, M. Iqbal: Juliflorine: a potent natural peripheral anionic-site-binding inhibitor of acetylcholinesterase with calcium-channel blocking potential, a leading candidate for Alzheimer's disease therapy. *Biochemical and Biophysical Research Communications* (2005), 332(4), 1171-1179.
32. Satheesh Kumar, N.: Acetylcholinesterase enzyme inhibitory potential of standardized extract of *Trigonella foenum graecum* L and its constituents, *Phytomedicine* (2010), 17(3-4), 292-295.
33. Wang, Rui; Yan, Han; Tang, Xi-can: Progress in studies of huperzine A, a natural cholinesterase inhibitor from Chinese herbal medicine. *Acta Pharmacologica Sinica* (2005), 27(1), 1-26.

34. Kozikowski, Alan P.: Identification of a more potent analog of the naturally occurring alkaloid huperzine A. Predictive molecular modeling of its interaction with AChE. *Journal of the American Chemical Society* (1996), 118(46), 11357-1136.
35. Halldorsdottir, Elsa Steinunn: Acetylcholinesterase inhibitory activity of lycopodane-type alkaloids from the Icelandic *Lycopodium annotinum* ssp. *Alpestre*. *Phytochemistry* (Elsevier) (2010), 71(2-3), 149-157.
36. Hirasawa, Yusuke: Lycoparins A-C, new alkaloids from *Lycopodium casuarinoides* inhibiting acetylcholinesterase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* (2008), 16(11), 6167-6171.
37. Macabeo, Allan Patrick G.: *Mycobacterium tuberculosis* and cholinesterase inhibitors from *Voacanga globosa*. *European Journal of Medicinal Chemistry* (2011), 46(7), 3118-3123.
38. Ingkaninan, Kornkanok: Vobasinyl-iboga bisindole alkaloids, potent acetylcholinesterase inhibitors from *Tabernaemontana divaricata* root. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* (2006), 58(6), 847-852.
39. Changwichit, Kanokwan: Bisindole alkaloids and secoiridoids from *Alstonia macrophylla* Wall. ex G. Don. *Fitoterapia* (2011), 82(6), 798-804.
40. Seidl, Claudia: Acetylcholinesterase inhibitory activity of uleine from *Himatanthus lancifolius*. *Zeitschrift fuer Naturforschung, C: Journal of Biosciences* (2010), 65(7/8), 440-444.
41. Mroue, Mohamad A.: Indole alkaloids of *Haplophyton crooksii*. *Journal of Natural Products* (1996), 59(9), 890-893.
42. Zhan, Zha-Jun: Indole alkaloids from *Ervatamia hainanensis* with potent acetylcholinesterase inhibition activities. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* (2010).
43. Andrade, Marcelo T.: Indole alkaloids from *Tabernaemontana australis* (Mueell. Arg) Miers that inhibit acetylcholinesterase enzyme. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* (2005), 13(12), 4092-4095.
44. Lin, Bao-Qin: Inhibitors of acetylcholine esterase in vitro - screening of steroidal alkaloids from *Fritillaria* species. *Planta Medica* (2006), 72(9), 814-818.
45. Choudhary, M. Iqbal: Cholinesterase inhibitory pregnane-type steroidal alkaloids from *Sarcococca hookeriana*. *Steroids* (2005), 70(4), 295-303.
46. Atta-Ur-Rahman: Pregnane-type steroidal alkaloids of *Sarcococca saligna*: a new class of cholinesterase inhibitors. *Helvetica Chimica Acta* (2002), 85(2), 678-688.
47. Choudhary, M. Iqbal: New Triterpenoid Alkaloid Cholinesterase Inhibitors from *Buxus hyrcana*. *Journal of Natural Products* (2003), 66(6).
48. Cardoso-Lopes, Elaine Monteiro: Alkaloids from stems of *Esenbeckia leiocarpa* Engl. (Rutaceae) as potential treatment for Alzheimer disease. *Molecules* (2010), 15, 9205-9213.

49. Atta-Ur-Rahman: New natural cholinesterase inhibiting and calcium channel blocking quinoline alkaloids. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* (2006), 21(6), 703-710.
50. Kumar, N. Satheesh: Acetylcholinesterase inhibitory potential of a carbazole alkaloid, mahanimbine, from *Murraya koenigii*. *Phytotherapy Research* (2010), 24(4), 629-631.
51. Tundis, Rosa: A potential role of alkaloid extracts from *Salsola* species (*Chenopodiaceae*) in the treatment of Alzheimer's disease. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* (2009), 24(3), 818-824.
52. Lima, Murilo M. C.: Acetylcholinesterase activity of alkaloids from the leaves of *Waltheria brachypetala*. *Planta Medica* (2009), 75(4), 335-337.
53. Adersen, Anne: Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory compounds from *Corydalis cava* Schweigg. & Kort. *Journal of Ethnopharmacology* (2007), 113(1), 179-182.
54. Chlebek, Jakub: Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory compounds from *Corydalis cava* (*Fumariaceae*). *Natural Product Communications* (2011), 6(5), 607-610.
55. Kuznetsova, L. P.: Inhibition of enzymatic hydrolysis of acetylthiocholine with acetylcholinesterase by principal alkaloids isolated from *Chelidonium majus* and *Macleaya* and by derivative drugs. *Tsitologiya* (2001), 43(11), 1046-1050.
56. Jung, Hyun Ah: Anti-alzheimer and antioxidant activities of *Coptidis Rhizoma* alkaloids. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* (2009), 32(8), 1433-1438.
57. Hung, Tran Manh: Alkaloids from roots of *Stephania rotunda* and their cholinesterase inhibitory activity. *Planta Medica* (2010), 76(15), 1762-1764.
58. Ingkaninan, Kornkanok: Acetylcholinesterase inhibitors from *Stephania venosa* tuber. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* (2006), 58(5), 695-700.
59. Ogino, Tatsunori: Studies on inhibitory activity against acetylcholinesterase of new bisbenzylisoquinoline alkaloid and its related compounds. *Heterocycles* (1997), 45(11), 2253-2260.
60. Geissler, Torsten: Acetylcholinesterase inhibitors from the toadstool *Cortinarius infractus*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* (2010), 18(6), 2173-2177.
61. Zheng, Xi-yuan: Acetylcholinesterase inhibitive activity-guided isolation of two new alkaloids from seeds of *Peganum nigellastrum* Bunge by an in vitro TLC- bioautographic assay. *Archives of Pharmacal Research* (2009), 32(9), 1245-1251.
62. Yang, Zhong-duo: Geissoschizine methyl ether, a corynanthean-type indole alkaloid from *Uncaria rhynchophylla* as a potential acetylcholinesterase inhibitor. *Natural Product Research* (2012), 26(1), 22-28.
63. Paris, Daniel: Anatabine lowers Alzheimer's A β production in vitro and in vivo. *European Journal of Pharmacology* (2011), 670(2-3), 384-391.

64. Frackowiak, Teresa: Binding of an oxindole alkaloid from *Uncaria tomentosa* to amyloid protein (A β 1-40). *Zeitschrift fuer Naturforschung, C: Journal of Biosciences* (2006), 61(11/12), 821-826.
65. Fujiwara, Hironori: *Uncaria rhynchophylla*, a Chinese medicinal Herb, has potent antiaggregation effects on Alzheimer's β -amyloid proteins. *Journal of Neuroscience Research* (2006), 84(2), 427-433.
66. He, Fu Qian: Tetrandrine suppresses amyloid- β -induced inflammatory cytokines by inhibiting NF- κ B pathway in murine BV2 microglial cells. *International Immunopharmacology* (2011), 11(9), 1220-1225.
67. He, Fu-Qian: Tetrandrine attenuates spatial memory impairment and hippocampal neuroinflammation via inhibiting NF- κ B activation in a rat model of Alzheimer's disease induced by amyloid- β (1-42). *Brain Research* (2011), 1384, 89-96.
68. Friedman, Lilach Mira: The microbial alkaloid toxin staurosporine blocks the phorbol ester-induced increase in β -amyloid precursor protein in PC12 cells. *Natural Toxins* (1997), 5(5), 173-179.
69. Goodman, Yadong: Staurosporine and K-252 compounds protect hippocampal neurons against amyloid β -peptide toxicity and oxidative Indry. *Brain Research* (1994), 650(1), 170-4.
70. Heo, Ho-Jin: Inhibitory effect of *Artemisia asiatica* alkaloids on acetylcholinesterase activity from rat PC12 cells. *Molecules and Cells* (2000), 10(3), 253-262.
71. Frost Danielle: β -carboline compounds, including harmine, inhibit DYRK1A and tau phosphorylation at multiple Alzheimer's disease-related sites. *PLoS One* (2011), 6(5), e19264.
72. Papke, Roger L.: The pharmacological activity of nicotine and normicotine on nAChRs subtypes: relevance to nicotine dependence and drug discovery. *Journal of Neurochemistry* (2007), 101(1), 160-167.
73. Kem, William R.: Alzheimer's drug design based upon an invertebrate toxin (anabaseine) which is a potent nicotinic receptor agonist. *Invertebrate Neuroscience* (1997), 3(2/3), 251-259.
74. Jennings, K. R.: Pharmacological studies of Delphinium alkaloids at the nicotinic acetylcholine receptor. *Special Publication - Royal Society of Chemistry* (1999), 232(Progress in Neuropharmacology and Neurotoxicology of Pesticides and Drugs), 163-174.
75. Goodall, Kirsten J.: A review of advances in the synthesis of analogues of the Delphinium alkaloid methyllycaconitine. *Synlett* (2005), (12), 1809-1827.
76. Fitch, Richard W.: Nicotinic acetylcholine receptor agonists. *PCT Int. Appl.* (2011), WO 2011116282 A2 20110922.
77. Chackalamannil, Samuel: Synthesis and biological evaluation of himbacine and analogs. *Book of Abstracts, 213th ACS National Meeting, San Francisco, April 13-17* (1997).

78. Birdsall, Nigel J. M.: Selective allosteric enhancement of the binding and actions of acetylcholine at muscarinic receptor subtypes. *Life Sciences* (1997), 60(13/14), 1047-1052.
79. Ryu, Ik Dong: Agrocybenin compounds and preparation thereof useful as prolyl endopeptidase inhibitors. Repub. Korea (1999), KR 220087 B1 19990901.
80. Joshi, Hanumanthachar: Effects of piperine on memory and behavior mediated via monoamine neurotransmitters. *Journal of Traditional Medicines* (2005), 22(2/3), 39-43.
81. Chonpathompikunlert, Pennapa: Piperine, the main alkaloid of Thai black pepper, protects against neurodegeneration and cognitive impairment in animal model of cognitive deficit like condition of Alzheimer's disease. *Food and Chemical Toxicology* (2010), 48(3), 798-802.
82. Yuan, Shu-min: Evodiamine improves cognitive abilities in SAMP8 and APP^{swE/PS1 Δ E9} transgenic mouse models of Alzheimer's disease. *Acta Pharmacologica Sinica* (2011), 32(3), 295-302.
83. Cucinotta, D: Dihydroergokryptine vs. placebo in dementia of Alzheimer type: interim results of a randomized multicenter study after a 1-year follow-up. *Archives of Gerontology and Geriatrics* (1996), 22(2), 169-180.
84. Saletu, Bernd: Nicergoline in senile dementia of Alzheimer type and multi-infarct dementia: a double-blind, placebo-controlled, clinical and EEG/ERP mapping study. *Psychopharmacology (Berlin)* (1995), 117(4), 385-95.
85. http://otlichnoezdorovie.ru/wp-content/uploads/2008/12/papaver_somniferum1.jpg, staženo 21.11.2011.
86. <http://ayllu.blog.cz/0706/opium>, staženo 21.11.2011.
87. Blaschek, W., Ebel, S., Hackenthal, E., Holtzgrabe, U., Kellner, K., Reichling, J., Schnetz, V. (eds.): *Hager ROM 2004: Hager's Handbuch der Drogen und Arzneistoffe*, Springer & Info II Uni. Würzburg, Würzburg, 2005.
88. Jahodář L.: *Farmakobotanika, semenné rostliny*. Karolinum, Praha 2006.
89. <http://followers.thcnet.cz/CyberNet/Punk-Rock%20Rebels%20Library/7.%20Relaxation/XTRAS/BIOTOX/www.biotox.cz/enpsyro/pj3rpa.html>, staženo 27.3.2012.
90. Kapoor L.D.: *Opium poppy: Botany, chemistry, and pharmacology*. Food Products Press, New York, 1995.
91. <http://www.kvetenacr.cz/detail.asp?IDdetail=228>, 27.3.2012.
92. http://sdruzeni.ceskyamak.cz/download/obcasnik_04.pdf, str. 20, staženo 27.3.2012.
93. BERNATH J., TETENYI P. Production characteristics of *Papaver somniferum* L. cultivars of different origin and vegetation cycles. 1982/01/01.
94. http://www.poppiesinternational.com/papaver_somniferum/papaver_somniferum.html staženo 30.3.2012.

95. <http://opiates.net/>, staženo 30.3.2012.
96. Hartl J.: *Farmaceutická chemie II*. Karolinum, Praha 2000.
97. http://www.henriettesherbal.com/eclectic/bpc1911/papaver_narc1.html, staženo 2.4.2012.
98. http://www.henriettesherbal.com/eclectic/bpc1911/papaver_narc.html, staženo 2.4.2012.
99. Bae DS: Protopine reduces the inflammatory activity of lipopolysaccharide-stimulated murine macrophages. *BMB Rep.* 2012 Feb;45(2):108-13.
100. <http://www.henriettesherbal.com/eclectic/bpc1911/papaver.html>, staženo 2.4.2012.
101. Shin, Eun-Joo: Neuropsychopharmacological understanding for therapeutic application of morphinans. *Archives of Pharmacal Research*, Volume: 33, Issue: 10, Pages: 1575-1587, Journal; General Review; Online Computer File, 2010, CODEN: aphrdq, issn: 0253-6269, doi: 10.1007/s12272-010-1009-4.
102. Rollinger, Judith, m.: Morphinan-6-one compounds for the treatment or prevention of neurodegenerative diseases. june 30, 2011.