

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

---

## **RIGORÓZNA PRÁCA**

**Biologicky aktivní metabolity rostlin**

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

**Biologically active metabolites of plants**

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

**Konzultant rigoróznejsj práce: Ing. Lucie Cahlíková, Ph.D.**

**Praha, 2012**

**Lucia Bednaříková**

Prehlasujem, že táto rigorózna práca je mojím pôvodným autorským dielom, ktoré som vypracovala samostatne. Všetka literatúra a ďalšie zdroje, z ktorých som pri spracovaní čerpala, sú uvedené v zozname použitej literatúry a v práci riadne citované. Práca nebola použitá na získanie iného ani rovnakého titulu.

Praha

Lucia Bednaříková

Táto rigorózná práca vznikla v rámci projektu Špecifického vysokoškolského výzkumu SVV UK 265002.

Moje poďakovanie patrí Ing. Lucii Cahlíkovej, Ph.D. za odborné konzultácie pri vypracovaní rigoróznej práce, za venovaný čas a poskytnuté materiály. Ďakujem tiež Ing. Kateřine Macákovej, Ph.D. za stanovenie biologických aktivít izolovaných látok, Doc. PharmDr. Jiřímu Kunešovi, Ph.D. za zmeranie NMR spektier izolovaných látok, celej katedre Farmaceutickej botaniky a ekológie za príjemné pracovné prostredie a mojej rodine a priateľovi za psychickú pomoc a podporu.

# OBSAH

1. ÚVOD .....	7
2. CIEĽ PRÁCE .....	9
3. TEORETICKÁ ČASŤ.....	10
3.1. Alzheimerova choroba.....	10
3.1.1. Patofyziológia .....	10
3.1.1.1. Patologické proteíny.....	10
3.1.1.2. Ďalšie patofyziologické mechanizmy .....	11
3.1.2. Rizikové faktory.....	12
3.1.3. Klinický obraz.....	13
3.1.4. Liečba Alzheimerovej choroby.....	13
3.1.4.1. Farmakoterapia porúch kognitívnych funkcií .....	14
3.1.4.1.1. Acetylcholinergný systém .....	14
3.1.4.1.2. Glutamátergny systém.....	15
3.1.4.1.3. Neurónový metabolizmus .....	15
3.1.4.1.4. Ďalšie možnosti farmakoterapie .....	16
3.1.4.2. Farmakoterapia porúch nekognitívnych funkcií .....	16
3.1.4.3. Nefarmakologická liečba.....	17
3.2. <i>Eschscholtzia californica</i> CHAM. (Papaveraceae) .....	18
3.2.1. Popis.....	19
3.2.2. Obsahové látky.....	19
3.2.2.1. Alkaloidy .....	19
3.2.2.1.1. Pavinanové alkaloidy .....	20
3.2.2.1.2. Benzofenantridínové alkaloidy.....	21
3.2.2.1.3. Aporfínové alkaloidy.....	23
3.2.2.1.4. Protopínové alkaloidy .....	25
3.2.2.1.5. Benzylizochinolíkové alkaloidy .....	26
3.2.2.1.6. Protoberberínové alkaloidy .....	27
3.2.2.1.7. Morfinanové alkaloidy .....	28
3.2.2.2. Flavonoidy.....	28
3.2.2.3. Karotenoidy .....	29

3.3. Príbuzné rastliny .....	29
3.3.1. <i>Eschscholtzia californica</i> CHAM. ....	30
3.3.2. <i>Eschscholtzia glauca</i> GREENE.....	30
3.3.3. <i>Eschscholtzia douglasii</i> HOOK. et ARN.....	31
3.3.4. <i>Eschscholtzia oregana</i> GREENE .....	31
3.3.5. <i>Eschscholtzia lobbii</i> GREENE .....	32
3.4. Biologická aktivita izochinolínových alkaloidov z <i>E. californica</i> .....	32
3.4.1. Inhibičná aktivita voči ľudskej AChE a BuChE.....	33
3.4.2. Antifungálna aktivita .....	34
3.4.3. Sedatívne a anxiolytické vlastnosti.....	34
3.4.4. Inhibícia cytochrómu P 450 .....	35
4. EXPERIMENTÁLNA ČASŤ .....	36
4.1. Všeobecné postupy .....	36
4.1.1. Destilácia a odparovanie .....	36
4.1.2. Chromatografia .....	36
4.1.2.1. Tenkovrstvová chromatografia .....	36
4.1.2.2. Stĺpcová chromatografia .....	36
4.2. Materiál a vybavenie .....	36
4.2.1. Rozpúšťadlá .....	36
4.2.2. Chemikálie .....	37
4.2.3. Chemikálie a materiál pre stanovenie inhibičného účinku izolovaných látok voči erytrocytarnej AChE a sérovej BuChE .....	37
4.2.3.1. Chemikálie .....	37
4.2.3.2. Materiál .....	37
4.2.4. Chemikálie a materiál pre stanovenie antioxidantnej aktivity izolovaných látok.....	37
4.2.5. Prístroje použité pri stanovení biologických vlastností izolovaných látok.....	38
4.2.6. Detekčné činidlá.....	38
4.2.7. Chromatografické adsorbenty .....	38
4.2.8. Vytvárajúce systémy pre tenkovrstvovú chromatografiu (TLC) .....	38
4.2.8.1. Analytická TLC.....	38
4.2.8.2. Preparatívna TLC .....	39
4.3. Príprava a spracovanie chloroformového výtrepku J <sub>2</sub> z <i>E. californica</i> .....	39

4.3.1. Pôvod drogy .....	39
4.3.2. Príprava sumárneho extraktu a alkaloidných výtrepkov.....	39
4.3.2.1. Príprava alkaloidného výtrepku J <sub>2</sub> .....	39
4.3.3. Stĺpcová chromatografia výtrepku J <sub>2</sub> z <i>E. californica</i> .....	40
4.3.4. Spracovanie frakcií č. 6 – 11.....	41
4.3.5. Spracovanie frakcií č. 22 – 38.....	41
4.3.6. Spracovanie frakcií č. 93 – 95.....	42
4.4. Určenie štruktúry izolovaných látok.....	43
4.4.1. Meranie hmotnostného spektra (MS).....	43
4.4.2. Meranie NMR spektra.....	43
4.5. Stanovenie inhibičnej aktivity izolovaných alkaloidov voči erytrocytarnej AChE a sérovej BuChE .....	43
4.5.1. Podmienky merania .....	43
4.5.2. Príprava erytrocytárnych puzdier.....	44
4.5.3. Stanovenie cholinesterázovej inhibičnej aktivity ( hodnoty IC <sub>50</sub> ) .....	44
4.6. Stanovenie antioxidačnej aktivity (EC <sub>50</sub> ) izolovaných alkaloidov .....	44
5. VÝSLEDKY .....	46
5.1. Štruktúrna analýza (-)-7- <i>O</i> -metyl-éterneokaryachín- <i>N</i> -metyljodidu.....	46
5.1.1. MS štúdie (-)-7- <i>O</i> -metyl-éterneokaryachín- <i>N</i> -metyljodidu.....	46
5.1.2. NMR štúdie (-)-7- <i>O</i> -metyl-éterneokaryachín- <i>N</i> -metyljodidu .....	47
5.1.2.1. <sup>1</sup> H-NMR spektrum (-)-7- <i>O</i> -metyl-éterneokaryachín- <i>N</i> -metyljodidu .....	48
5.1.2.2. <sup>13</sup> C-NMR spektrum (-)-7- <i>O</i> -metyl-éterneokaryachín- <i>N</i> -metyljodidu .....	48
5.2. Inhibičná aktivita voči HuAChE a HuBuChE.....	48
5.3. Antioxidačná aktivita.....	50
6. DISKUSIA .....	51
7. LITERATÚRA.....	54
8. ZOZNAM SKRATIEK.....	60

# 1. ÚVOD

Pokrok vedy a techniky prebieha v dnešnej dobe výrazne aj na poli medicíny. Uplatňujú sa čoraz dokonalejšie diagnostické a terapeutické postupy, k dispozícii sú čoraz modernejšie a citlivejšie prístroje a kvalita poskytovanej zdravotnej starostlivosti rastie. Zvyšuje sa celková životná úroveň, klesá úmrtnosť v mladom veku a priemerná dĺžka života stúpa. Vyšší vek obyvateľstva však veľmi úzko súvisí aj s častejším rozvojom mnohých, vo vyššom veku sa prejavujúcich chorôb. Popri ochoreniach kardiovaskulárneho a metabolického charakteru sa stretávame i s častejším výskytom neurodegeneratívnych chorôb, najmä Alzheimerovej, Parkinsonovej a Huntingtonovej choroby.

Alzheimerova choroba (AD) je progresívne atroficko-degeneratívne ochorenie mozgu, ktoré sa prejavuje syndrómom demencie a je zároveň jednou z jej najčastejších príčin. Postihuje predovšetkým osoby nad 65 rokov, avšak jej výskyt je možný aj v nižšom veku<sup>1</sup>. Pri chorobe dochádza najmä k poškodeniu kognitívnych funkcií, ktoré sa manifestuje ako porucha pamäti, reči a orientácie v čase a priestore. Obraz choroby dopĺňajú aj pridružené poruchy nekognitívnych funkcií prejavujúce sa depresiou, úzkosťou, poruchami spánku, agresivitou či niektorými psychotickými príznakmi. S postupujúcim rozvojom choroby klesá schopnosť pacienta vykonávať bežné činnosti a starať sa sám o seba, až sa napokon stáva úplne závislým od pomoci druhých<sup>2,3,4</sup>.

Súčasná medicína umožňuje rozvoj Alzheimerovej choroby spomaliť či ho na určité obdobie pozastaviť, nie je však možné chorobu kauzálne liečiť a vyliečiť<sup>3</sup>. V terapii sa uplatňujú dva základné, na dôkazoch založené liečebné postupy. Prvým postupom, určeným najmä na liečbu ľahkých až stredne ťažkých štádií choroby, je ovplyvnenie cholinergného systému pomocou liečiv zo skupiny inhibítorov cholinesteráz. Používanými látkami z tejto skupiny sú donepezil, rivastigmín a galantamín. Pre liečbu pokročilejších štádií choroby je uprednostňovaný druhý postup spočívajúci v inhibícii glutamátových NMDA-receptorov. Jediným dnes používaným liečivom s týmto účinkom je memantín<sup>3</sup>.

Výskum liečiv v oblasti neurodegeneratívnych chorôb však neustále pokračuje. Hlavným dôvodom a motiváciou je na jednej strane fakt, že stále neexistuje liečivo schopné AD úplne vyliečiť, a na strane druhej neustály nárast počtu pacientov trpiacich touto chorobou a jej sociálny a ekonomický dopad. Zdrojom nových liečiv môže byť chemická syntéza vedúca

k vzniku nových štruktúrálnych typov molekúl ako aj obmena už existujúcich aktívnych látok. Iným spôsobom získavania potenciálnych liečiv je izolácia látok z prírodného materiálu <sup>5</sup>. O možnosti uplatnenia rastlín v liečbe rôznych ochorení nás presviedča hlboká tradícia ľudovej medicíny. Liečivé účinky rastlín sa postupom času začali pripisovať látkam v nich obsiahnutým, čo podnietilo snahu o izoláciu týchto látok v čistej forme.

Jednými z najvýznamnejších biologicky aktívnych látok nachádzajúcich sa v rastlinách sú alkaloidy. Tieto dusíkaté látky bázického charakteru sú v rastlinách tvorené ako sekundárne metabolity vznikajúce premenou aminokyselín <sup>6</sup>. Nachádzajú sa v podzemných i nadzemných častiach rastliny, vždy v závislosti od konkrétneho druhu a čeľade. Takisto aj zastúpenie jednotlivých alkaloidov v rôznych rastlinách je odlišné, no pre danú čeľaď spravidla typické. Existujú však rozdiely v zložení či pomernom zastúpení konkrétnych alkaloidov i v rámci jedného druhu v závislosti od lokality, podnebia, zloženia pôdy a pod <sup>7</sup>.

Alkaloidy sú látky so širokým spektrom biologických účinkov. U niektorých bola zaznamenaná aj inhibičná aktivita voči cholinesterázam (acetylcholinesteráze (AChE) a butyrylcholinesteráze (BuChE)), čím nachádzajú možné uplatnenie v liečbe AD a sú preto i naďalej predmetom hlbšieho skúmania. Alkaloid, ktorý svoje významné terapeutické uplatnenie v liečbe AD už našiel, je galantamín izolovaný s cibuliek snežienky *Galanthus woronowii* Losinsk. (Amaryllidaceae) <sup>8</sup>. Galantamín je dlho účinkujúcim, selektívnym, reverzibilným, kompetitívnym inhibítorom acetylcholinesterázy, u ktorého bol zaznamenaný pozitívny vplyv na pamäťové funkcie u pacientov s AD <sup>9</sup>. Práve tento objav sa stal jedným z dôvodov návratu k izolácii látok z rastlinného materiálu. Ďalšie látky, u ktorých bola pozorovaná určitá inhibičná aktivita voči cholinesterázam, možno na základe ich chemickej štruktúry priradiť k izochinolínovým alkaloidom vyskytujúcim sa hlavne v čeľadiach Papaveraceae, Fumariaceae, Ranunculaceae, Rutaceae, Berberidaceae, Amaryllidaceae, Menispermaceae a iných <sup>10, 11, 12</sup>.

Rastlinou, ktorej obsahové látky sú dnes tiež predmetom štúdií, je okrasná rastlina *Eschscholtzia californica* z čeľade Papaveraceae.



## 2. CIEĽ PRÁCE

Cieľ rigorózneho práce:

1. Spracovanie alkaloidnej frakcie z *Eschscholtzia californica* CHAM. (kvartérne jodidy bázické).
2. Izolácia aspoň dvoch alkaloidov v čistej forme.
3. Identifikácia izolovaných alkaloidov pomocou spektroskopických metód.
4. Stanovenie biologických aktivít izolovaných látok (cholinesterázová inhibičná aktivita, antioxidačná aktivita).

## 3. TEORETICKÁ ČASŤ

### 3.1. Alzheimerova choroba

Alzheimerova choroba (AD) je progresívne atroficko-degeneratívne ochorenie mozgu prejavujúce sa syndrómom demencie. Je zodpovedná za 50 až 60 % všetkých demencií, predstavuje teda jednu z jej najčastejších príčin<sup>3</sup>. Etiológia choroby nie je zatiaľ jednoznačne a uspokojivo určená. Podľa času nástupu klinických prejavov ju možno rozdeliť na dva základné typy: AD so skorým začiatkom (nástup príznakov do 65 roku života) a choroba s neskorým nástupom (klinické prejavy zvyčajne po 65 roku života)<sup>2</sup>.

V dnešnej dobe je Alzheimerovou chorobou postihnutých približne 5 % populácie staršej 65 rokov, počet pacientov však neustále rastie<sup>13</sup>.

#### 3.1.1. Patofyziológia

AD má určité typické patomorfologické prejavy. Z makroskopického hľadiska dochádza pri AD k atrofii mozgu na kortiko-subkortikálnej úrovni. Začiatok atrofie je lokalizovaný v mediálnych temporálnych štruktúrach a je sprevádzaný rozširovaním temporálnych rohov postranných mozgových komôr. Miera narušenia kognitívnych funkcií vo veľkej väčšine prípadov koreluje so stupňom atrofie, boli však zaznamenané aj prípady s úplnou absenciou makroskopickej atrofie<sup>3</sup>.

##### 3.1.1.1. Patologické proteíny

Na mikroskopickej úrovni dominuje ukladanie patologických proteínov. Jedným z takýchto proteínov je  $\beta$ -amyloid vznikajúci ako produkt nefyziologického štiepenia amyloidového prekurzorového proteínu (APP), ktorý ako transmembránový proteín tvorí prirodzenú súčasť neurónov. Za fyziologických podmienok enzým  $\alpha$ -sekretáza štiepi APP na krátke, rozpustné fragmenty. V prípade patologických podmienok dochádza k výraznému zvýšeniu aktivity  $\alpha$ -sekretázy za vzniku nadmerného množstva fragmentov, či naopak k úplnému potlačeniu činnosti tohto enzýmu. Za týchto okolností sa uplatňujú enzýmy  $\beta$ - prípadne  $\gamma$ -sekretáza, čo má za následok tvorbu dlhších fragmentov. V oboch prípadoch dochádza k následnej koagulácii vzniknutých fragmentov za tvorby  $\beta$ -amyloidu, ktorý sa kumuluje v extracelulárnom priestore a tvorí základ tzv. Alzheimerovských plakov. Plaky sa nachádzajú

najmä v mozgovej kôre, možný je aj ich výskyt v podkôrovej šedi či kôre mozočku, kde poškodzujú nervové tkanivo a podieľajú sa na mobilizácii neurogliových buniek. Ukladanie  $\beta$ -amyloidu do stien mozgových ciev vedie k vzniku amyloidnej angiopatie. Nadmerná koagulácia fragmentov je dávaná do súvisu i s výskytom apolipoproteínu E4<sup>2,4</sup>.

Za povšimnutie stojí skutočnosť, že  $\beta$ -amyloidné plaky boli v porovnateľných množstvách pozorované aj v mozgoch postarších ľudí netrpiačich demenciou. Hlbšie skúmanie ukázalo, že  $\beta$ -amyloidné plaky u pacientov s AD obsahujú tzv. fibrilárny  $\beta$ -amyloid, ktorý je vo forme  $\beta$ -skladaných listov a sú mu pripisované neurotoxické vlastnosti. Na druhej strane,  $\beta$ -amyloidné plaky u ľudí bez demencie sú tvorené nefibrilárnou formou  $\beta$ -amyloidu, ktorá je považovaná za netoxickú<sup>14</sup>.

K vzniku ďalšieho patologického proteínu dochádza pri hyperfosforylácii  $\tau$ -proteínu, ktorý tvorí prirodzenú súčasť mikrotubulov nervových buniek. V dôsledku nadmernej fosforylácie dochádza k polymerizácii produktov a tvorbe párovo heliakálnych filamentov. Tieto dvojzávitnice tvoria základ vnútrobunkových neurofibrilárnych uzlíčkov, tzv. tangles. Neuróny postihnuté týmto procesom podliehajú bunkovej smrti – apoptóze<sup>3</sup>.

#### 3.1.1.2. Ďalšie patofyziologické mechanizmy

Poškodenie tkaniva, napr. v oblasti plakov, vyvoláva imunitnú reakciu, pri ktorej dochádza k zvýšenej produkcii cytokínov a voľných radikálov gliovými bunkami. Takto vzniknutý sterilný zápal ešte viac prehĺbuje mozgové poškodenie<sup>2</sup>.

Ďalší patofyziologický mechanizmus spočíva v ovplyvnení cholinergného nervového systému. Dochádza k poklesu počtu niektorých, najmä presynaptických neurónov, ich plasticity, klesá aj počet nervových synapsíí. Poškodené sú predovšetkým acetylcholinergné nervové vlákna, ktoré vedú z nucleus basalis Meynerti do oblasti hippocampu a asociačných kôrových oblastí. Znižuje sa hladina enzýmu cholinacetyltransferázy, ktorý syntetizuje neurotransmitter acetylcholín z cholínu a acetylkoenzýmu A. Mení sa aj pomer enzýmov zabezpečujúcich odbúravanie acetylcholínu. Klesá relatívna aktivita acetylcholinesterázy a vo zvýšenej miere sa uplatňuje enzým butyrylcholinesteráza, ktorý je tvorený patologicky gliovými bunkami v oblasti plakov<sup>3</sup>.

Na spojitosť medzi zvýšenou aktivitou BuChE a  $\beta$ -amyloidnými plakmi poukázal aj S. Darvesh a kol. v práci publikovanej v roku 2012<sup>15</sup>. Na základe histochemickej analýzy

mozgového tkaniva u myši s rozvinutými  $\beta$ -amyloidnými plakmi dospel k záveru, že súvislosť medzi aktivitou BuChE a výskytom  $\beta$ -amyloidných plakov skutočne existuje a že práve BuChE môže zohrávať veľkú úlohu v rozvoji a dozrievaní týchto plakov <sup>15</sup>. Na potvrdenie tohto predpokladu a na objasnenie presného patofyziologického mechanizmu sú však potrebné ďalšie štúdie.

I v hladinách ostatných neurotransmiterov a neuromodulátorov nastávajú zmeny. Typický je aj nedostatok somatostatínu, v menšej miere tiež dopamínu, serotonínu a iných <sup>2</sup>.

Ďalším faktorom podieľajúcim sa na rozvoji AD je oxidačný stres a tvorba voľných kyslíkových radikálov. Pôsobením týchto chemicky vysoko aktívnych látok dochádza k poškodeniu mnohých enzýmov a k apoptóze nervových buniek. To sa vysvetľuje väzbou kyslíkových radikálov na lipidy neuronálnej membrány <sup>2</sup>.

V patogenéze AD sa uplatňuje aj hyperexcitácia iónotropných NMDA (N-metyl-D-aspartátových) receptorov, ktoré sú spojené s otvaraním kalciových kanálov. To vedie k nadmernému influxu vápenatých iónov do nervových buniek a spôsobuje ich apoptózu. Nasleduje uvoľnenie excitačných aminokyselín a opakovaná aktivácia NMDA-receptorov. Táto kaskádovitá reakcia má za následok poškodenie mozgového tkaniva <sup>3</sup>.

V spojitosti s AD bola pozorovaná aj porucha mitochondriálneho metabolizmu prejavujúca sa znížením oxidácie glukózy. Tento jav je priamo úmerný stupňu demencie <sup>3</sup>. Ďalším možným faktorom je vysoký obsah enzýmu monoaminoxidázy B, nedostatok nervových rastových faktorov a niektorých biofaktorov, napr. vit. B12 <sup>2</sup>.

### 3.1.2. Rizikové faktory

Základnými rizikovými faktormi rozvoja AD sú vysoký vek, ženské pohlavie, genetické predpoklady, ako napr. mutačné zmeny na chromozómoch 1, 14 a na dlhom ramienku chromozómu 21, výskyt Downovho syndrómu u príbuzných 1. generácie; pozorovaná bola aj súvislosť s výskytom apolipoproteínu E4 <sup>16</sup>. Z ovplyvniteľných rizikových faktorov je významné fajčenie, abúzus alkoholu a rôzne poranenia hlavy. Na rozvoj choroby vplýva aj depresia, poruchy imunity (autoimunitné ochorenia, imunodeficiencia), sklon k infekciám a chronickým zápalom, hormonálne a metabolické poruchy, znížená hladina antioxidantov v krvi a taktiež nedostatočný prísun živín <sup>17</sup>.

### 3.1.3. Klinický obraz

Nástup klinických prejavov AD je pozorovaný väčšinou u pacientov vo veku 65 až 80 rokov, u choroby so skorým začiatkom je to už medzi 45. až 60. rokom. Pre Alzheimerovskú demenciu je charakteristický pomalý, pozvoľný nástup príznakov. Rozvoj choroby je vo väčšine prípadov lineárny, niekedy však bývajú pozorované aj obdobia určitého spomalenia priebehu choroby<sup>2</sup>.

Za prvý príznak choroby je považované poškodenie recentnej epizodickej slovnej pamäti, ktoré sa prejavuje zabúdaním bežných denných udalostí. Nasleduje porucha reči charakterizovaná plynulou, no veľmi jednoduchou a väčšinou i obsahovo prázdnu rečou. V tomto štádiu choroby bývajú narušené aj vizuospeciálne funkcie. Pacient sa prestáva orientovať v priestore a čase, blúdi na známych miestach, zabúda cestu domov. Stráca schopnosť plánovať a dodržiavať poradie známych činností, jeho logické myslenie je značne obmedzené. Typická je pomerne skorá strata záľub a záujmov, osobnosť pacienta sa dost' výrazne mení<sup>2,4</sup>.

Približne u 40 % pacientov dochádza postupne aj k poškodeniu nekognitívnych funkcií prejavujúcemu sa ako úzkosť, depresia, poruchy spánku, agresivita či psychotické príznaky (paranoidné bludy, paranoidne-halucitatórny syndróm). Z dôvodu straty nadhľadu nad svojou chorobou si pacienti chorobu často nepripúšťajú, stavajú sa k liečbe odmietavo a nechcú spolupracovať.

S rozvojom choroby pacienti strácajú schopnosť postarať sa o seba a dodržiavať osobnú hygienu. V pokročilom štádiu už nespoznávajú ani svojich blízkych, sú afatickí, zmätení, prestávajú komunikovať so svojím okolím. Poruchy príjmu potravy a vylučovania moču a stolice dopĺňajú celkový obraz telesného i duševného chátrania.

Od nástupu klinických prejavov je priemerná doba prežitia približne 3 – 7 rokov. Tento čas je však veľmi individuálny a medzi jednotlivými pacientmi sú zaznamenané veľké rozdiely. Najčastejšou príčinou úmrtia pacientov s AD sú interkurentné choroby<sup>2,4</sup>.

### 3.1.4. Liečba Alzheimerovej choroby

Liečba AD zahŕňa farmakoterapiu poškodených kognitívnych funkcií i pridružených porúch nekognitívnych funkcií. Jej súčasťou by mala byť aj nefarmakologická liečba ako napr. psychoterapia, rehabilitácia či spolupráca s rodinou pacienta<sup>2</sup>.

Keďže etiológia choroby je dosiaľ nejasná, nie je možná kauzálna liečba AD. Tzv. kognitívnu terapiou vychádzajúcou zo známych etiopatogenetických procesov možno dosiahnuť spomalenie či stabilizovanie priebehu choroby aspoň na určitý čas. V liečbe sa uplatňujú dva základné, na dôkazoch založené (evidence based medicine, EBM) postupy. Je to jednak užívanie kognitív – liečiv zvyšujúcich centrálnu acetylcholinergnú transmisiu, ako aj užívanie látok ovplyvňujúcich glutamátergny nervový systém pôsobením na NMDA-iónotropné receptory<sup>3</sup>.

#### 3.1.4.1. Farmakoterapia porúch kognitívnych funkcií

##### 3.1.4.1.1. Acetylcholinergný systém

Acetylcholinergný systém je možné ovplyvniť viacerými spôsobmi. Jednou z možností je inhibícia enzýmov degradujúcich neurotransmitter acetylcholín, teda inhibícia enzýmu acetylcholinesterázy, prípadne butyrylcholinesterázy. Zvýšená hladina acetylcholínu upravuje narušený cholinergný prenos na nervových synapsiách v CNS, čo sa prejavuje zlepšením pozornosti a pamäťových funkcií pacienta. Látky s týmto účinkom sa označujú ako inhibítory cholinesteráz (IChE). Podmienkou ich účinku je dostatočný prechod hematoencefalickou bariérou (HEB) a prednostné pôsobenie na mozgové formy týchto degradačných enzýmov<sup>18</sup>. Zasahujú aj do neurodegeneratívnych mechanizmov AD, konkrétne sa podieľajú na znížení tvorby a toxicity  $\beta$ -amyloidu.

IChE sa používajú na liečbu ľahkých až stredne ťažkých štádií choroby<sup>1, 19</sup>. Prvými látkami tohto typu zavedenými do praxe boli indolový alkaloid fyzostigmín a akridínové deriváty takrín a velnacrín. Pre ich závažné hepatotoxické účinky boli neskôr nahradené reverzibilnými inhibítormi AChE, donepezilom, rivastigmínom a galantamínom. Piperidínový alkaloid donepezil sa vyznačuje relatívne dlhým biologickým polčasom a jeho výhodou je podávanie len jedenkrát denne<sup>18</sup>. Rivastigmín je karbamátový derivát, ktorý je na rozdiel od predošlej látky pseudoireverzibilným dualistom, inhibuje teda AChE aj BuChE<sup>1</sup>. Galantamín, alkaloid izolovaný z cibuliek snežienky, je pomerne selektívnym inhibítorom cholinesteráz. Jeho výhodou oproti vyššie spomínaným látkam je potlačené pôsobenie na periférny parasympatický nervový systém, čím dochádza k zníženiu nežiaducich gastrointestinálnych účinkov, predovšetkým nauzey, hnačky a bolestivých spazmov tráviaceho traktu. Okrem toho galantamín prostredníctvom alosterickej modulácie nikotínových receptorov tiež zvyšuje účinok acetylcholínu<sup>3, 19</sup>.

Ďalším možným, štúdiami však dosiaľ nedoloženým, spôsobom ovplyvnenia cholinergného nervového systému je podávanie prekursorov acetylcholínu ako napr. cholínu či sójového lecitínu. Samotný lecitín i jeho deriváty však prechádzajú HEB veľmi obmedzene, preto je nutné ich podávanie vo vysokých denných dávkach, rádovo až v desiatkach gramov<sup>3, 19</sup>.

Potenciálnym mechanizmom účinku je aj zvýšené uvoľňovanie acetylcholínu pôsobením hydergínov, nicergolínu či propentofylínu, podpora vstupu prekursoru acetylcholínu do neurónu vo forme acetyl-*L*-karnitínu alebo priama stimulácia muskarínových receptorov pôsobením arekolínu, pilokarpínu či xanomelínu a nikotínových receptorov účinkom nikotínu, galantamínu alebo epibatidínu<sup>3, 19</sup>.

#### 3.1.4.1.2. Glutamátergny systém

Ovplyvnenie glutamátergného systému je možné na úrovni glutamátergných NMDA-receptorov. Ich čiastočnou blokádou klesá nadmerný influx kalcia do nervových buniek, čím sa znižuje počet apoptotických zánikov neurónov a zlepšuje sa synaptický prenos v CNS. Výsledkom je okrem iného aj zlepšenie kognitívnych funkcií pacienta. Jediným dnes používaným inhibítorom glutamátergných NMDA-receptorov je parciálny inhibítor memantín. Jeho užívanie je v súlade s medicínou založenou na dôkazoch a je rezervované pre liečbu stredných až ťažkých foriem AD<sup>3</sup>.

#### 3.1.4.1.3. Neurónový metabolizmus

Znížený metabolizmus neurónov mozgovej kôry upravujú látky označované ako nootropiká. Tieto látky sa vyznačujú dobrým prestupom HEB za fyziologických aj patologických podmienok. Zlepšujú glukózový metabolizmus mozgových buniek a okysličovanie neurónov. Nemajú priamy vazodilatačný účinok, no sú schopné odstraňovať lokálne spazmy ciev v mikrocirkulácii mozgu a niektoré dokonca upravovať reologické vlastnosti erytrocytov. Typickými predstaviteľmi nootropných liečiv sú meklofenoxát, derivát pyridoxínu (vit. B6) pyritinol, cyklický derivát GABA (kyselina  $\gamma$ -aminomaslová) piracetam a jeho deriváty oxiracetam, pramiracetam a aniracetam. Tieto látky sú dostupné v perorálnej a injekčnej forme. Na dosiahnutie požadovaného terapeutického účinku je však nutné ich dlhodobé užívanie. Do skupiny nootropík sa radia aj dilatanciá mozgových ciev ako pentoxifylín, naftidrofuryl, cinarizín, flunarizín, dihydroergotoxín a vinpocetín<sup>2, 3, 19</sup>.

#### 3.1.4.1.4. Ďalšie možnosti farmakoterapie

Ďalším spôsobom ovplyvnenia priebehu AD je vychytávanie voľných kyslíkových radikálov, ktoré pri tejto chorobe vznikajú vo väčšom množstve<sup>18</sup>. Takýmito vychytávačmi, antioxidantmi, sú napr. vitamín C (kyselina askorbová), vitamín E ( $\alpha$ -tokoferol) a vitamín A (retinol). Schopnosť vychytávania má tiež hormón epifýzy melatonín, niektoré nootropiká (pyritinol, meklofenoxát), extrakt z *Ginkgo biloba* a látky steroidnej povahy označované ako lazaroidy. Na likvidácii voľných kyslíkových radikálov sa podieľajú aj látky s obsahom selénu, ktorý tvorí prirodzenú súčasť enzýmu glutationperoxidázy. Selegilín a rasagilín, známe ako inhibítory monoaminoxidázy B, prispievajú tiež malou mierou k antioxidačnému efektu. Blokujú degradáciu dopamínu, pri ktorej voľné radikály vznikajú. Znáмым antioxidantom je aj resveratrol, látka nachádzajúca sa v červenom víne. Používanie antioxidačne pôsobiacich látok v liečbe AD je považované skôr za pomocné a preventívne opatrenie, ich účinok nie je podložený klinickými štúdiami<sup>2,3</sup>.

Nádejným spôsobom zásahu do patogenézy AD je tzv. antiamyloidná farmakoterapia. Princípom je modulácia funkcie enzýmov  $\beta$ - a  $\gamma$ -sekretázy a následná blokáda tvorby  $\beta$ -amyloidu. Spúbným liečivom s týmto pôsobením je nesteroidné antiflogistikum, R-enantiomér flurbiprofenu, tarenflurbil. Perspektívnou možnosťou je aj ovplyvnenie aktivity enzýmu  $\alpha$ -sekretázy v zmysle jej stimulácie za použitia látok zo skupiny statínov ako napr. simvastatínu či atorvastatínu. Testované sú aj látky podporujúce rozpustnosť  $\beta$ -amyloidu, ktorých príkladom je glykosamíntramiprosát, látky blokujúce agregáciu či monoklonálne protilátky proti  $\beta$ -amyloidu v rámci antiamyloidnej imunoterapie<sup>1,3</sup>.

Dosiaľ neprebádanou oblasťou je možnosť využitia nervových rastových faktorov v liečbe AD. Na základe predpokladu, že ich množstvo je u pacientov s AD znížené, je možným riešením ich substitúcia vo forme hydrolyzátov bravčových mozgov. Toto riešenie sa javí ako potenciálne, žiadna štúdia však zatiaľ nepotvrdila jeho skutočnú účinnosť. Predmetom skúmania sú aj nízkomolekulárne látky, ktoré prechádzajú HEB, viažu sa na trk-receptory a uvoľňujú nervové rastové faktory bez vyvolania imunopresívneho účinku<sup>3</sup>.

#### 3.1.4.2. Farmakoterapia porúch nekognitívnych funkcií

U väčšiny alzheimerovských pacientov sa v priebehu choroby objavajú aj poruchy spánku, nálady či rôzne psychiatrické symptómy. Liečba psychofarmakami je indikovaná len u vážnych, pretrvávajúcich porúch správania a vždy len za súčasnej nefarmakologickej liečby.



Psychofarmaká sú podávané v čo najnižších dávkach a ich zvyšovanie býva veľmi opatrné a pozvoľné<sup>1</sup>.

Agresivita, agitovanosť a psychotické symptómy sa liečia antipsychotikami druhej generácie, najčastejšie melperonom a tiapridom. V prípade, že táto liečba nie je úspešná, je indikovaný butyrofenónový derivát haloperidol. Na liečbu halucinácií a bludov sa používa risperidon alebo niektoré z ďalších atypických antipsychotík ako napr. ziprasidon, olanzapín či kvetiapín. Antipsychotiká sú u pacientov s AD podávané v nižších dávkach než u pacientov s psychózou. Benzodiazepínové deriváty nie sú u týchto pacientov na liečbu psychotických symptómov vhodné, pretože ovplyvnením GABA systému majú anticholinergný účinok, čo sa prejavuje negatívnym ovplyvnením kognitívnych funkcií pacienta<sup>1,2</sup>.

Na liečbu úzkosti sa používajú anxiolytiká benzodiazepínového typu, predovšetkým látky s krátkym biologickým polčasom, napr. oxazepam, lorazepam a alprazolam. Na zvládnutie akútnych stavov slúži diazepam podávaný parenterálne. Benzodiazepíny nie sú vhodné na dlhodobé užívanie z dôvodu uvedeného vyššie. V prípade nutnosti dlhodobého podávania je vhodnou alternatívou antidepresívum trazodon, prípadne nízke dávky antipsychotík<sup>1</sup>.

Pridružené depresie sú korigované antidepresívami zo skupiny SSRI (selektívne inhibítory spätného vychytávania serotonínu), ktorými sú citalopram, sertralín, fluvoxamín a fluoxetín, alebo dualisticky pôsobiacimi antidepresívami zo skupiny SNRI (inhibítory spätného vychytávania serotonínu a noradrenalínu), ako napr. venlafaxínom, mirtazapínom či milnacipranom. Dobrý účinok sa dosahuje aj podávaním reverzibilného inhibítora monoaminoxidázy moklobemidu. Podávanie klasických tricyklických antidepresív sa neodporúča z dôvodu prehĺbenia cholinergného deficitu a následného zhoršenia kognitívnych funkcií či možnosti vyvolania krátkych delirantných stavov<sup>1,2</sup>.

Liekmi voľby u krátkodobých porúch spánku sú nebenzodiazepínové hypnotiká zolpidem a zopiklon. Na liečbu dlhodobých porúch spánku sú indikované antidepresíva trazodon, mirtazapín alebo amitriptylín. Poruchy cyklu spánok – bdenie sú liečené antipsychotikami tiapridom a melperonom<sup>1</sup>.

### 3.1.4.3. Nefarmakologická liečba

Dôležitú súčasť komplexnej starostlivosti o pacientov trpiacich AD tvorí práve nefarmakologická liečba. Individuálny psychoterapeutický prístup sa odvíja od stupňa

poškodenia kognitívnych a nekognitívnych funkcií pacienta, od stupňa degradácie jeho osobnosti a od miery zachovania pacientovho nadhľadu nad chorobou. Liečba či kognitívna rehabilitácia prebieha pod dohľadom psychológa, prípadne i ďalších odborníkov. Osvedčenou metódou je tzv. reedukačná terapia založená na precvičovaní funkcií, ktoré zostali u pacienta zachované, pretože snaha o znovunadobudnutie už zabudnutých schopností býva zväčša neúspešná. Vhodným postupom je tiež tzv. kontrola realitou spočívajúca v pripomínaní základných faktov, napr. označenie dverí jednotlivých miestností, používanie kalendára na lepšiu orientáciu v čase atď.

Veľký dôraz by sa mal klásť na prácu s pacientovou rodinou, ktorá je dôležitým faktorom ovplyvňujúcim celkový priebeh choroby. Príbuzní by mali byť poučení o tom, ako sa k pacientovi správať, aký je štandardný priebeh choroby a aké sú súčasné možnosti liečby, aby od nej nemali priveľké očakávania<sup>2</sup>.

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



Obr. 1: *Eschscholtzia californica* CHAM.<sup>20</sup>

### 3.2.1. Popis

*Eschscholtzia californica* CHAM., známa aj pod slovenským názvom Slncovka kalifornská, je jednoročná, prípadne krátko žijúca trváca rastlina z čeľade Papaveraceae. Jej prirodzenou oblasťou výskytu sú slnečné trávnaté priestranstvá západného pobrežia Spojených Štátov Amerických, no dnes je možné ju nájsť už aj v iných subtropických oblastiach sveta<sup>20</sup>.

Dosahuje výšky 5 – 60 cm. Jej stonka je priama, šedozelená, so striedavými nepárne perovito zloženými listami. Kvety vyrastajúce na dlhej stopke sú tvorené štyrmi korunnými lupienkami zlatožltej až oranžovej farby a dvoma kališnými lístkami. Plodom je podlhovastá pukavá tobolka uvoľňujúca malé okrúhle semená tmavohnedej farby<sup>20, 21, 22</sup>.

V minulosti bola používaná pre jej anxiolytické a sedatívne účinky k navodeniu spánku najmä u detí. Slúžila ako analgetikum pri bolesti hlavy a zubov, ako spazmolytikum, emetikum či vo forme obkladov na liečenie rôznych kožných ochorení<sup>21, 23, 24</sup>.

Detailný morfológický popis rastliny, jej taxonomické zaradenie a výskyt sú bližšie rozobraté v mojej diplomovej práci<sup>25</sup>.

### 3.2.2. Obsahové látky

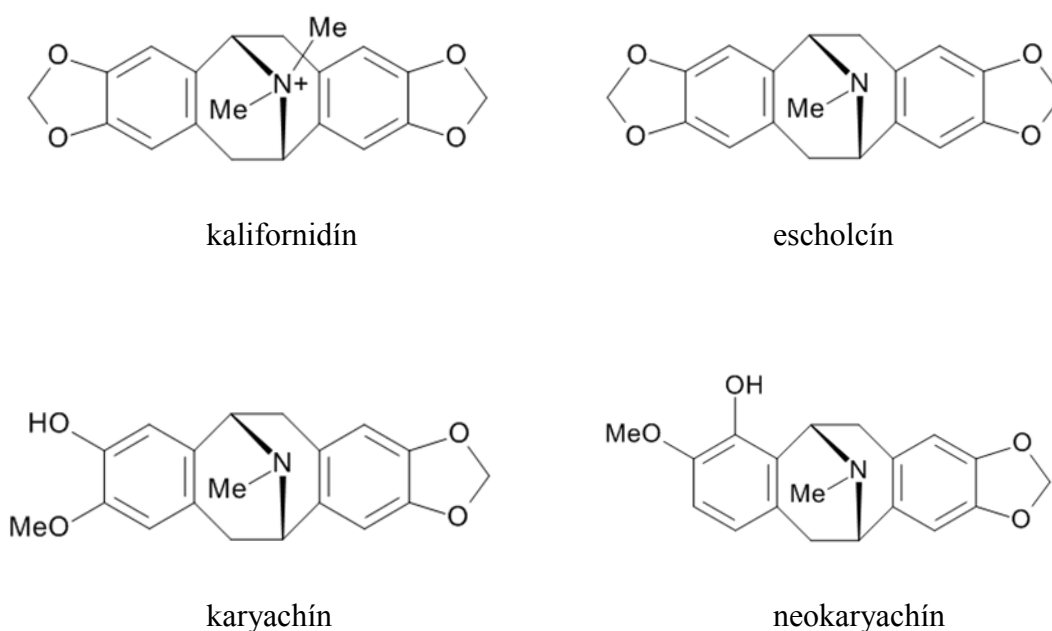
#### 3.2.2.1. Alkaloidy

Hlavnými obsahovými látkami *E. californica* sú alkaloidy izochinolínového typu. Izochinolínové alkaloidy predstavujú početnú a rôznorodú skupinu fyziologicky aktívnych látok so širokým výskytom v prírode<sup>26</sup>. Nachádzajú sa v čeľadiach Papaveraceae, Ranunculaceae, Fumariaceae, Rutaceae, Amaryllidaceae, Berberidaceae, Menispermaceae a ďalších<sup>10, 11, 12</sup>. Biosynteticky majú vzťah k aminokyseline tyrozínu a jej prekurzoru fenylalanínu. Z chemického hľadiska ich možno rozdeliť do niekoľkých štrukturálnych typov. Druh *E. californica* obsahuje typ pavinanový, benzofenantridínový, aporfinový, protopínový, benzylozochinolínový, protoberberínový a morfinanový<sup>6, 27, 28</sup>.

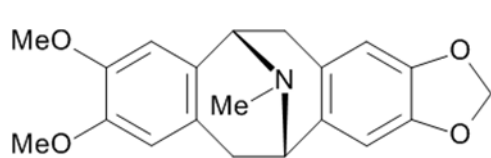
Najvyšší obsah izochinolínových alkaloidov je zaznamenaný v období kvitnutia<sup>29</sup>. Zastúpenie jednotlivých alkaloidov v rôznych častiach rastliny je do veľkej miery odlišné. Až na pár výnimiek platí, že vyššie koncentrácie alkaloidov sa vyskytujú v koreňoch. Napriek tomu sa pre ich obsah uplatnili v medicíne hlavne nadzemné časti rastliny<sup>21, 24</sup>.

### 3.2.2.1.1. Pavinanové alkaloidy

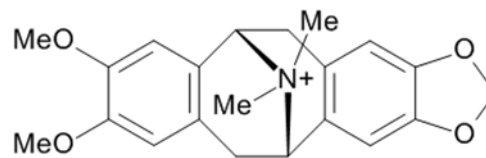
Alkaloidy pavinanového typu tvoria dominantnú skupinu alkaloidov izolovaných z rastliny *E. californica*. V najväčšej miere zastúpená a pre tento rod unikátna je silne polárna kvartérna báza kalifornidín. Nachádza sa v koreňoch i nadzemných častiach rastliny a vyznačuje sa sedatívnym účinkom<sup>30</sup>. Hojne zastúpená je aj terciárna nefenolická báza escholcín, označovaná tiež ako kalifornín<sup>29</sup>. Je typickou zložkou nadzemných častí rastliny, z koreňov zatiaľ izolovaná nebola<sup>30, 31</sup>. V menšom množstve sa v rastline nachádzajú terciárne bázy karyachín a neokaryachín, ktoré boli izolované aj z rastliny *Cryptocarya chinensis* HEMSL. (Lauraceae)<sup>32</sup>, *O*-metylkaryachín, nazývaný tiež escholcidín, *N*-metylescholcidín a argemonín<sup>33</sup>. Norargemonín a bisnorargemonín, látky odvodené od argemonínu, sú prítomné hlavne v koreňoch, v nadzemných častiach rastliny sa nachádzajú len v malom množstve. Ich derivát izonorargemonín bol detekovaný aj v dvoch druhoch rodu *Argemone* (Papaveraceae)<sup>34, 35</sup> a v *Thalictrum revolutum* DC. (Ranunculaceae)<sup>36</sup>. Z rastliny bola izolovaná aj polárna zlúčenina escholcín-*N*-oxid<sup>37</sup>. Štruktúry izolovaných pavinanových alkaloidov sú uvedené na nasledujúcich obrázkoch (Obr. 2, Obr. 3).



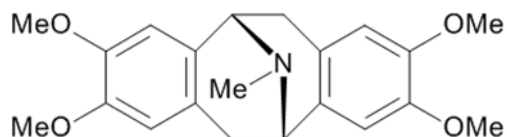
Obr. 2: Štruktúry pavinanových alkaloidov



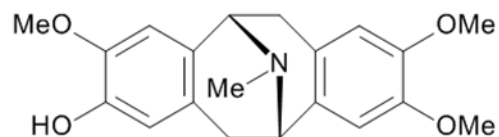
*O*-metylkaryachín



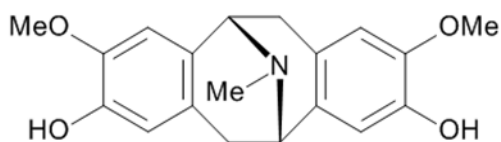
*N*-metylescholcidín



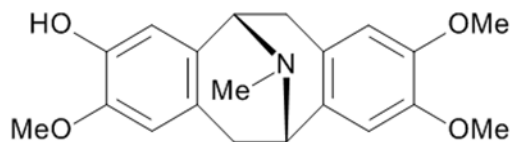
argemonín



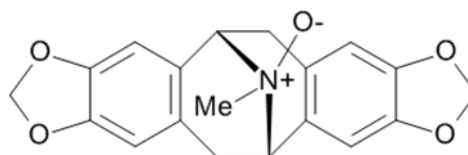
norargemonín



bisorargemonín



izonorargemonín



escholcín-*N*-oxid

Obr. 3: Štruktúry pavinanových alkaloidov

### 3.2.2.1.2. Benzofenantridínové alkaloidy

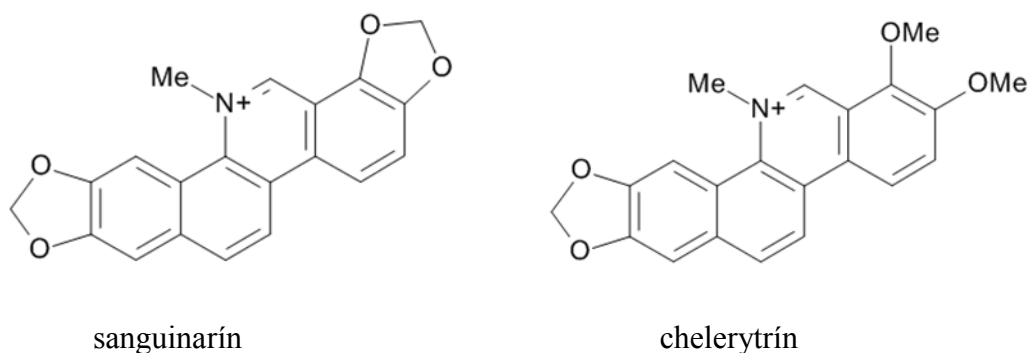
Významnými obsahovými látkami rastlín z čeľade Papaveraceae sú kvartérne benzofenantridínové alkaloidy. Základom ich štruktúry je *N*-metylbenzo[*c*]fenantridínový kation. Nositeľom kladného náboja je metylsubstituovaný atóm dusíka v polohe 5. Vo forme tejto kvartérnej soli sa benzofenantridíny vyskytujú v prostredí nízkeho pH. Vyznačujú sa výrazným

sfarbením, polaritou a relatívne dobrou rozpustnosťou vo vode. Alkalizáciou dochádza k ich premene na terciárne redukované zásady za súčasnej zmeny ich vlastností na bezfarebné, nepolárne a vo vode málo rozpustné zlúčeniny<sup>38</sup>.

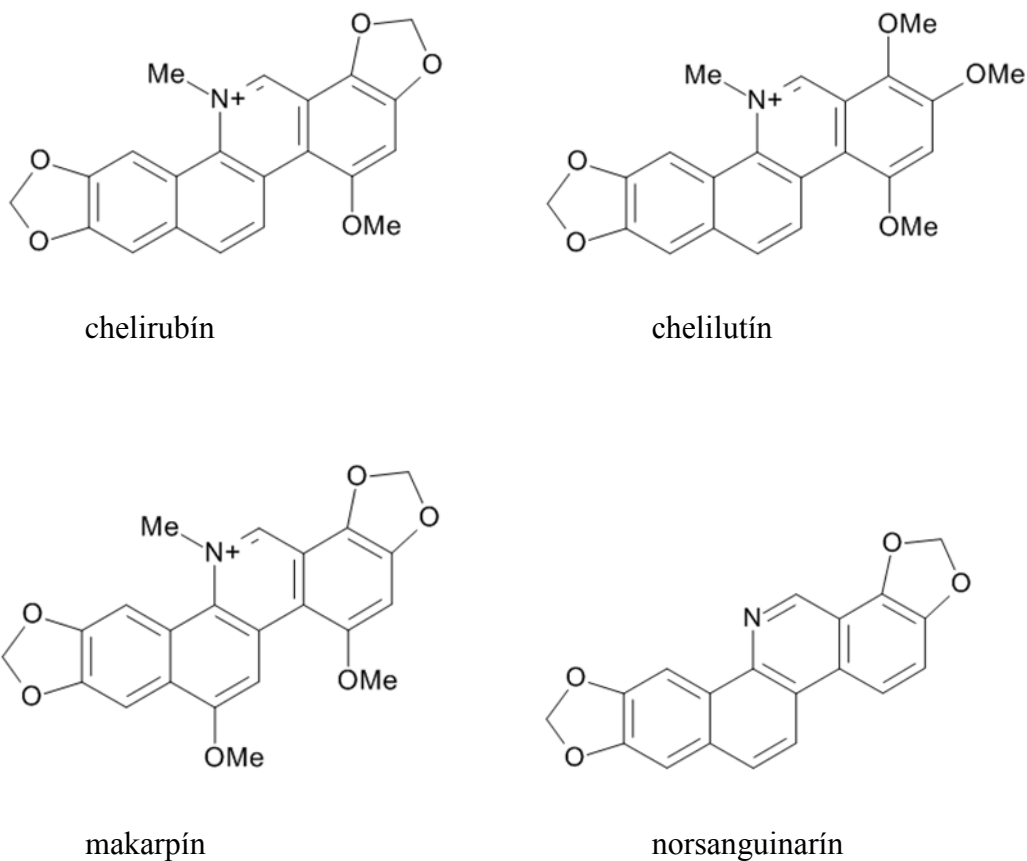
Z látok tohto typu sa v *E. californica* nachádza sanguinarín a chelerytrín. O objav sanguinarínu ako hlavnej farebnej zložky *Sanguinaria canadensis* L. (Papaveraceae) sa zaslúžil James Dan v roku 1827<sup>39</sup>. V súčasnosti sa sanguinarín javí ako perspektívne liečivo v terapii rakoviny<sup>40</sup>. Chelerytrín bol prvý krát popísaný Probstom v roku 1839 ako alkaloid rastliny *Chelidonium majus* L. (Papaveraceae)<sup>39</sup>. Vykazuje selektívnu inhibíciu proteinkinázy C a je taktiež považovaný za potenciálne antikancerózne liečivo<sup>41</sup>. Vďaka antibakteriálnej aktivite sú obe tieto látky používané ako súčasť dentálnych produktov<sup>42, 43</sup>.

Ďalšími benzofenantridínovými alkaloidmi nachádzajúcimi sa v rastline sú chelirubín a chelilutín. Po prvý krát ich izoloval Slavík v roku 1954 z koreňa *Chelidonium majus* L. (Papaveraceae). O rok neskôr izoloval z *Macleaya microcarpa* (Papaveraceae) ďalší benzofenantridínový alkaloid makarpín<sup>39</sup>. Všetky tieto látky boli izolované aj z nadzemných častí *E. californica*<sup>31</sup>. Z rastliny sa podarilo izolovať aj antifungálne aktívny terciárny alkaloid norsanguinarín<sup>44</sup>.

Benzofenantridíny sú ako minoritné zložky zastúpené aj v čeľadiach Fumariaceae, Ranunculaceae, Rutaceae, Meliaceae a Caprifoliaceae. Štruktúry izolovaných benzofenantridínových alkaloidov sú uvedené na nasledujúcich obrázkoch (Obr. 4, Obr. 5).



Obr. 4: Štruktúry benzofenantridínových alkaloidov



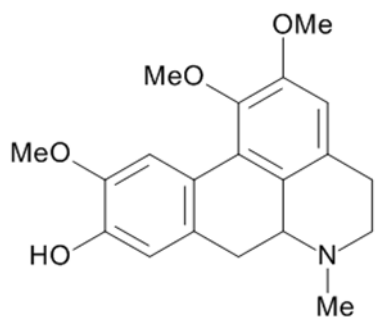
Obr. 5: Štruktúry benzofenantridínových alkaloidov

### 3.2.2.1.3. Aporfínové alkaloidy

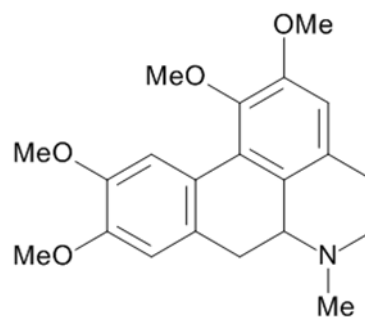
Alkaloidy odvodené od aporfínu sú taktiež významnými obsahovými látkami *E. californica*. Fenolická terciárna báza *N*-metyllaurotetanín, známa tiež pod označením lauroscolcín, bola izolovaná z nadzemných častí tejto rastliny<sup>45</sup>. Ďalšia obsahová látka glaucín sa vyznačuje antitusickým účinkom a je používaná ako súčasť čajových zmesí na liečbu kašľa a astmy. Kwartérny alkaloid magnoflorín (escholín) sa nachádza hlavne v koreňoch, v nadzemných častiach je obsiahnutý len v stopovom množstve.

Spomedzi ďalších aporfínových alkaloidov boli izolované korytuberín, izokorydín a korydín. Posledný menovaný bol z tejto rastliny po prvý krát izolovaný Slavíkom<sup>31</sup>.

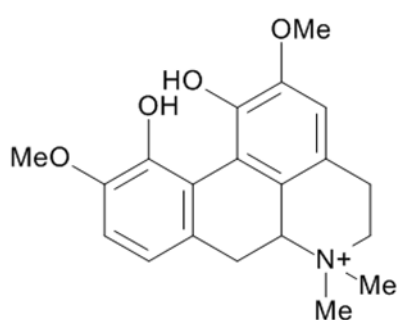
Aporfínové alkaloidy (Obr. 6) sa vyskytujú aj v čeľadiach Papaveraceae, Ranunculaceae a Menispermaceae<sup>46</sup>.



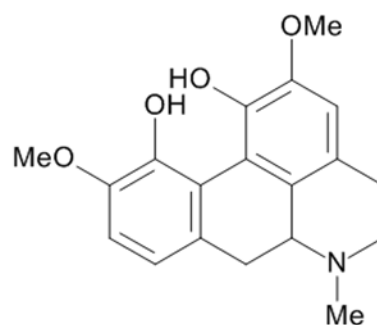
*N*-metyllaurotetanín



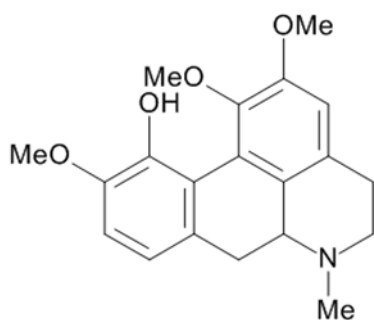
glaucín



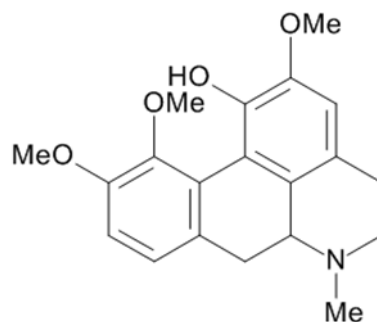
magnoflorín



koryuberín



izokorydín



korydín

Obr. 6: Štruktúry aporfínových alkaloidov

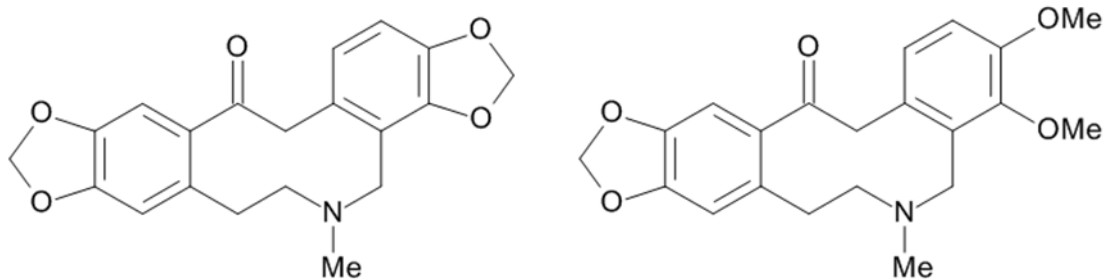


#### 3.2.2.1.4. Protopínové alkaloidy

Z *E. californica* boli izolované dva základné alkaloidy protopínového typu. Sú to terciárne nafenolické bázy protopín a allokryptopín (Obr. 7), ktoré sa nachádzajú predovšetkým v koreňoch. V nadzemných častiach rastliny sú prítomné v menšom množstve<sup>30</sup>. Protopín je relatívne bežne sa vyskytujúci alkaloid, predovšetkým u zástupcov čeľadí Papaveraceae a Fumariaceae<sup>29</sup>. Boli uňho pozorované inhibičné účinky na agregáciu krvných doštičiek<sup>47</sup>. Allokryptopín je kŕčový jed, ktorý vo vyšších dávkach spôsobuje lokálne umŕtvenie či centrálnu ochrnutie<sup>48</sup>.

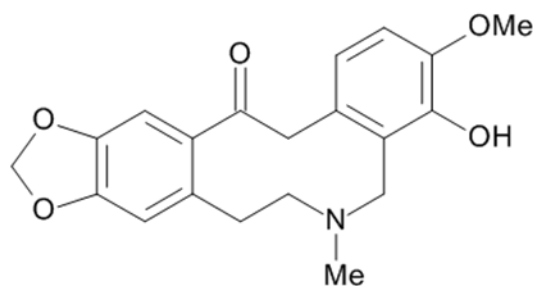
Z rastliny sa podarilo izolovať aj protopínový alkaloid hunnemanín (Obr. 7), u ktorého bola preukázaná antifungálna aktivita<sup>44</sup>.

Protopínové alkaloidy sa vyskytujú aj v čeľadiach Berberidaceae, Papaveraceae, Fumariaceae, Ranunculaceae a Rutaceae<sup>46</sup>.



protopín

allokryptopín



hunnemanín

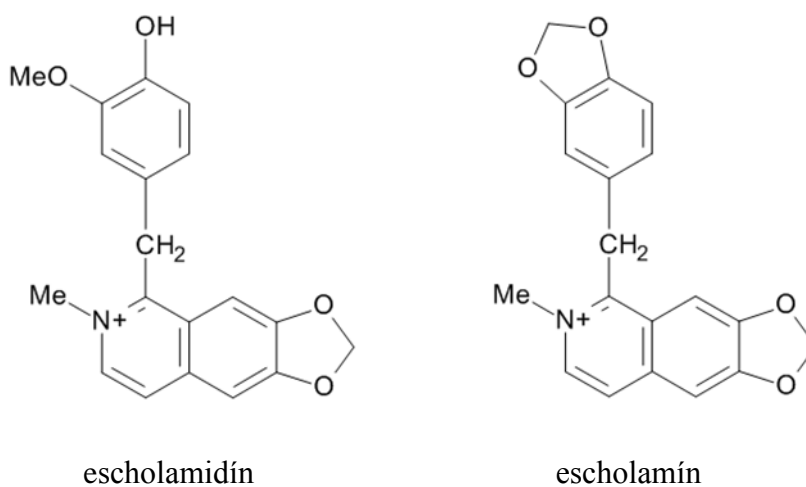
Obr. 7: Štruktúry protopínových alkaloidov

### 3.2.2.1.5. Benzylizochinolínové alkaloidy

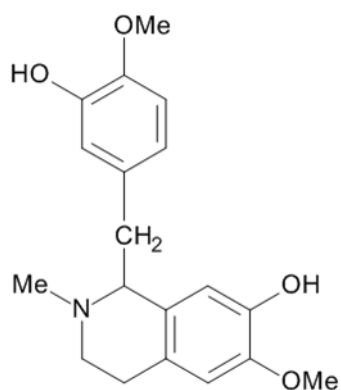
Alkaloidy benzylizochinolínového typu tvoria početnú skupinu látok odvodených od 1-benzylizochinolínu, resp. od 1-benzyl-1,2,3,4-tetrahydroizochinolínu. Môžeme sa s nimi stretnúť u zástupcov čeladi Papaveraceae, Fumariaceae, Menispermaceae, Ranunculaceae a Berberidaceae.

*E. californica* obsahuje fenolickú bázu escholamidín, ktorá bola už pred tým identifikovaná ako obsahová látka príbuznej rastliny *Eschscholtzia oregana* GREEN (Papaveraceae). Podobná báza escholamín, predstavujúca hlavný alkaloid druhu *E. oregana*, bola v *E. californica* detekovaná len v minimálnom množstve<sup>31</sup>. Terciárny benzylizochinolínový alkaloid retikulín, ktorý sa bežne vyskytuje u rôznych druhov čelade Papaveraceae, bol z *E. californica* po prvý krát izolovaný v roku 2010<sup>33</sup>.

Spomínané alkaloidy sú zobrazené na nasledujúcich obrázkoch (Obr. 8 a Obr. 9).



Obr. 8: Štruktúry benzylizochinolínových alkaloidov

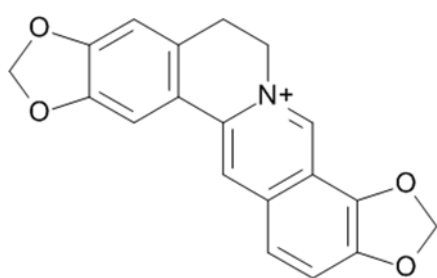


retikulín

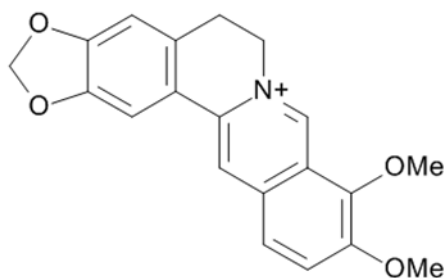
Obr. 9: Štruktúra benzylizochinolínového alkaloidu

### 3.2.2.1.6. Protoberberínové alkaloidy

Alkaloidy protoberberínového typu patria k látkam s pomerne širokým výskytom v prírode, napriek tomu sa v rastline *E. californica* nachádzajú len v malom množstve. V nadzemných častiach rastliny boli pozorované kvartérne alkaloidy koptizín, berberín (Obr. 10) a koryzamín (Obr. 11), všetky však len v zanedbateľnom množstve<sup>31</sup>. Z rastliny sa podarilo izolovať terciárnu bázu tohto typu skulerín<sup>33</sup> (Obr. 11).

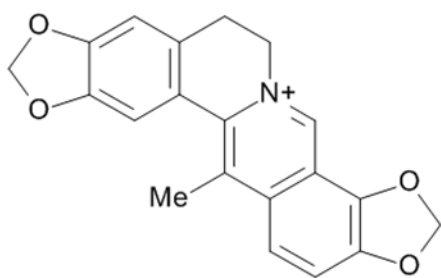


koptizín

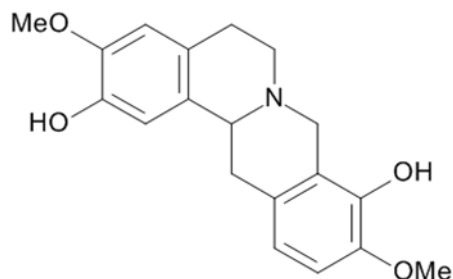


berberín

Obr. 10: Štruktúry protoberberínových alkaloidov



koryzamín

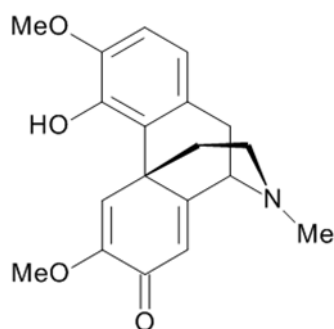


skulerín

Obr. 11: Štruktúry protoberberínových alkaloidov

### 3.2.2.1.7. Morfinanové alkaloidy

*Z. E. californica* bola izolovaná jediná báza morfinanového typu, terciárny alkaloid salutaridín (Obr. 12)<sup>33</sup>.



salutaridín

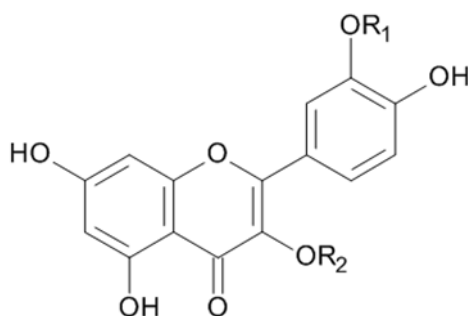
Obr. 12: Štruktúra morfinanového alkaloidu

### 3.2.2.2. Flavonoidy

V rastline boli identifikované aj látky typu flavonoidov, vyskytujúce sa predovšetkým ako glykozidy kvercetínu a izoramnetínu<sup>49</sup>. Sú to flavonolové glykozidy rutín, kvercitrín, kvercetín-3-*O*- $\beta$ -glukopyranozid, kvercetín-3-*O*-[ $\alpha$ -ramnopyranozyl-(1-4)- $\alpha$ -ramnopyranozyl-(1-6)- $\beta$ -glukopyranozid], izoramnetín-3-*O*- $\beta$ -glukopyranozid, izoramnetín-3-*O*-[ $\alpha$ -ramnopyranozyl-(1-6)- $\beta$ -glukopyranozid] a izoramnetín-3-*O*-[ $\alpha$ -ramnopyranozyl-(1-4)- $\alpha$ -ramnopyranozyl-(1-6)-

$\beta$ -glukopyranozid], izolované z nadzemných častí rastliny. Na izolácii posledných piatich uvedených flavonoidov z *E. californica* sa podieľali Beck a Häberlein v roku 1998. Samotné aglykony kvercetín a izoramnetín v rastline detekované neboli<sup>49</sup>.

Základná štruktúra flavonolových glykozidov je znázornená na nasledujúcom obrázku (Obr. 13).



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

Obr. 13: Základná štruktúra izolovaných flavonolových glykozidov

Spomedzi ďalších látok zo skupiny flavonoidov sa v rastline nachádzajú izoflavóny. V roku 1996 izoloval Jain a kol. dva izoflavóny: 2'-metoxyformononetín a 7-metoxy-2',4'-dihydroxyizoflavón<sup>50</sup>.

Z vodnej frakcie kvetov boli izolované antokyanidíny<sup>51</sup>.

### 3.2.2.3. Karotenoidy

V okvetných lístkoch rastliny boli detekované karotenoidy:  $\beta$ -karotén, escholcxantón, escholcxantín, luteín, zeaxantín, anteraxantín, mutatoxantín, violaxantín, luteoxantín, auroxantín a neoxantín<sup>52</sup>.

## 3.3. Príbuzné rastliny

Rod *Eschscholtzia* je taxonomicky zložitá skupina, ktorú možno na základe názoru niektorých botanikov rozdeliť na dva hlavné, veľmi tvárne druhy obsahujúce množstvo ekotypov a cytotypov. Iní ju členia na veľký počet malých druhov<sup>53</sup>. Fedde uvádza 123 druhov rozdelených do dvoch sekcií, *Eurycraspedontae* a *Stenocraspedontae*<sup>54</sup>.

Z biochemického hľadiska je možné v rámci rodu *Eschscholtzia* vyčleniť tri odlišné skupiny. Prvá skupina obsahuje rastliny zo sekcie *Eurycraspedontae*, konkrétne druhy *E. californica* CHAM., *E. glauca* GREENE a *E. douglasii* HOOK. et ARN., pre ktoré je typická prítomnosť pavinanových alkaloidov a vysoký obsah kvartérnych alkaloidov. Predstaviteľom druhej skupiny je druh *E. oregana* GREENE patriaci do sekcie *Stenocraspedontae* a charakterizovaný vysokým obsahom kvartérneho alkaloidu papaverínového typu, escholamínu. Tretiu skupinu tvorí druh *E. lobbii* GREENE taktiež zo sekcie *Stenocraspedontae*, ktorý obsahuje najmä protopínový typ alkaloidov a je charakteristický výskytom skulerínu, korytuberínu a len zanedbateľným množstvom kvartérnych alkaloidov<sup>55</sup>.

### 3.3.1. *Eschscholtzia californica* CHAM.

Druh *Eschscholtzia californica* je veľmi variabilný a obsahuje množstvo ekotypov a cytotypov (líšia sa chromozómovým číslom)<sup>53</sup>. Na základe zemepisného rozšírenia sa delí na dva poddruhy: *Eschscholtzia californica* subsp. *californica* GREENE rozšírená v Kalifornii a Oregone a *Eschscholtzia californica* subsp. *mexicana* GREENE, C. CLARK vyskytujúca sa najmä v Novom Mexiku, Texase a severnom Mexiku.

Varieta *E. californica* CHAM. var. *peninsularis* GREENE, MUNZ. je typická pre oblasť Baja California. Pre vnútrozemie je popísaná varieta *crocea* BENTH., JEPS., v piesočných dunách od Surfú po Monterey sa vyskytuje varieta *maritima* GREENE, JEPS.

Druh pestovaný v Európe od polovice 19. storočia ako okrasná rastlina pod názvom *Eschscholtzia californica* je krížencom rôznych poddruhov a variet druhu *E. californica*<sup>21</sup>.

### 3.3.2. *Eschscholtzia glauca* GREENE

*E. glauca* zo sekcie *Eurycraspedontae* je charakteristická vysokým obsahom kvartérnych alkaloidov. Hlavnou kvartérnou bázou izolovanou z koreňov je protoberberínový alkaloid escholidín<sup>56</sup>. Z ďalších kvartérnych alkaloidov nachádzajúcich sa v koreňoch boli izolované pavinanová báza kalifornidín, protoberberínová báza  $\alpha$ -kanadínmetylhydroxid, báza benzyltetrahydroizochinolinového typu escholinín<sup>56</sup>, benzofenantridínové bázy sanguinarín a chelerytrín a nevýznamné množstvo protoberberínových alkaloidov koptizínu a berberínu<sup>57</sup>. Izolované boli aj nekvartérne nefenolické bázy protopín a allokryptopín (protopínový typ) a fenolické bázy pavinanového typu norargemonín a v menšom množstve aj bisnorargemonín<sup>58</sup>.

Z nadzemných častí rastliny sa podarilo izolovať pavinanové alkaloidy kalifornidín a escholcín<sup>59</sup>, terciárne bázy protopínového typu protopín a allokryptopín, protoberberínové alkaloidy koptizín a berberín a kvartérne benzofenantridíny sanguinarín, chelerytrín, chelirubín a v nepatrnom množstve aj makarpín<sup>57</sup>.

### 3.3.3. *Eschscholtzia douglasii* HOOK. et ARN.

*E. douglasii* patrí do sekcie *Eurycraspedontae* a je botanicky aj chemicky veľmi blízka ostatným druhom z tejto sekcie, teda rastlinám *E. californica* a *E. glauca*.

Vyznačuje sa vysokým obsahom kvartérnych alkaloidov. Z koreňov bol ako hlavný kvartérny alkaloid izolovaná protoberberínová báza escholidín. Izolovaný bol aj  $\alpha$ -kanadínmetylhydroxid rovnakého štruktúrneho typu, pavinanový alkaloid kalifornidín, aporfínová báza escholín (magnoflorín) a alkaloid benzylizochinolínovej štruktúry escholinín<sup>56</sup>. Z kvartérnych báz benzofenantridínového typu sa podarilo izolovať chelerytrín, sanguinarín, chelirubín, chelilutín a malé množstvo makarpínu. V nepatrnom množstve boli izolované aj protoberberínové alkaloidy koptizín a berberín<sup>57</sup>.

Nekvartérne nefenolické bázy sú zastúpené allokryptopínom a protopínom. V porovnaní s druhmi *E. californica* a *E. glauca* obsahuje vyšší podiel nekvarterných fenolických alkaloidov, predovšetkým norargemonínu a bisnorargemonínu<sup>58</sup>.

Hlavnou kvartérnou bázou nadzemných častí rastliny je pavinanový alkaloid kalifornidín. Izolovaný bol aj terciárny alkaloid escholcín, taktiež pavinanového štruktúrneho typu<sup>58</sup>.

### 3.3.4. *Eschscholtzia oregana* GREENE

*E. oregana* je predstaviteľom sekcie *Stenocraspedontae*. Bol z nej izolovaný kvartérny alkaloid escholamín, prvý benzylizochinolínový alkaloid nájdený v tribuse *Eschscholtziae*<sup>57</sup>. Z celej rastliny boli izolované aj ďalšie terciárne a kvartérne alkaloidy: protopínové bázy protopín a allokryptopín, kvartérne benzofenantridínové bázy sanguinarín, chelerytrín, v minimálnom množstve aj chelirubín a chelilutín, protoberberínové alkaloidy koptizín, berberín, skulerín a  $\alpha$ -stylopínmetylhydroxid, benzylizochinolínová báza escholamidín, aporfínový alkaloid korydín a minimálne množstvo kvartérnej pavinanovej bázy kalifornidínu<sup>57, 60</sup>.

### 3.3.5. *Eschscholtzia lobbii* GREENE

*E. lobbii* patrí do sekcie *Stenocraspedontae* a v porovnaní s *E. glauca* a *E. oregana* sa vyznačuje nižším obsahom alkaloidov<sup>57</sup>. V najväčšej miere sú zastúpené terciárne protopínové alkaloidy protopín, ako hlavný alkaloid, a v menšom množstve tiež allokryptopín<sup>55</sup>. Izolované boli aj terciárne alkaloidy aporfínového typu korydín a korytuberín. Z protoberberínových alkaloidov sa podarilo izolovať terciárnu fenolickú bázu skulerín a malé množstvo kvartérnych báz koptizínu, berberínu a koryzamínu. Z kvartérnych benzofenantridínových alkaloidov je zastúpený sanguinarín, chelerytrín, chelirubín a makarpín. Uvedené kvartérne alkaloidy boli izolované len v zanedbateľnom množstve<sup>55</sup>.

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

*E. californica* je tradičná liečivá bylina, už v minulosti používaná pôvodným obyvateľstvom Kalifornie pre jej analgetické a sedatívne pôsobenie. Boli u nej pozorované tiež spazmolytické, diuretické a diaforetické účinky<sup>24</sup>. Farmakologické štúdie, ktoré skúmali biologickú aktivitu extraktov z tejto rastliny *in vitro* či na rôznych živočíšnych modeloch, dokázali značné anxiolytické, sedatívne a spánok navodzujúce vlastnosti. Štúdie neodhalili žiadne toxické účinky tejto rastliny<sup>61, 62</sup>. Na základe týchto zistení sú dnes nadzemné časti rastliny používané ako mierne sedatívum a vďaka minimálnej toxicite tiež k navodeniu spánku predovšetkým v pediatrii<sup>61</sup>.

Jednotlivé izochinolínové alkaloidy sa vyznačujú niektorými špecifickými vlastnosťami. U sanguinarínu a chelerytrínu, alkaloidov benzofenantridínového typu, boli preukázané antibakteriálne účinky a tieto látky sú preto používané ako zložky dentálnych produktov. Zároveň sú považované za perspektívne liečivá v terapii rakoviny<sup>40, 41, 42, 43</sup>. U protopínového alkaloidu hunnemanínu a benzofenantridínovej bázy norsanguinarínu bola pozorovaná antifungálna aktivita<sup>44</sup>.

Izolované izochinolínové alkaloidy sa vyznačujú určitým inhibičným pôsobením voči ľudským cholinesterázam<sup>33</sup>. Tieto ich účinky sú dnes za účelom možného uplatnenia v liečbe Alzheimerovej choroby hlbšie skúmané.



### 3.4.1. Inhibičná aktivita voči ľudskej AChE a BuChE

Acetylcholinesteráza (AChE) a butyrylcholinesteráza (BuChE) sú enzýmy, ktoré štiepia neurotransmitter acetylcholín. Podieľajú sa tak na regulácii jeho hladín v mozgu a tým ovplyvňujú celkovú cholinergnú transmisiiu. Látky, ktoré bránia pôsobeniu týchto enzýmov, tzv. inhibítory cholinesteráz, zvyšujú hladinu acetylcholínu na cholinergných synapsiách. Tento jav nachádza možné uplatnenie v terapii AD, u ktorej je práve hladina acetylcholínu znížená. Podávanie inhibítorov cholinesteráz má za následok zlepšenie pamäťových a kognitívnych funkcií u pacientov postihnutých AD<sup>1, 19</sup>.

V mozgu zdravých ľudí hrá kľúčovú úlohu enzým AChE. U pacientov trpiacich AD klesá aktivita AChE a tým narastá význam druhého enzýmu, BuChE. Pre liečbu AD sa preto javia ako významné látky s duálnou enzymatickou aktivitou, čiže látky schopné inhibovať oba vyššie spomínané enzýmy<sup>33</sup>.

V súčasnosti prebieha výskum aj s alkaloidnými látkami izolovanými z *E. californica*, ktoré sa taktiež považujú za potenciálne cholinesterázové inhibítory. U mnohých týchto alkaloidov už bola dokázaná určitá inhibičná aktivita voči jednému, prípadne i obom týmto enzýmom.

Štúdiá publikovaná v roku 2010 uviedla výsledky skúmania inhibičnej aktivity voči ľudským cholinesterázam u štrnástich izochinolínových alkaloidov izolovaných z *E. californica*. Pri práci bol použitý hemolyzát ľudských erytrocytov ako zdroj AChE, zdrojom BuChE bola ľudská plazma. Ako pozitívny štandard poslúžili látky galantamín a huperzín A<sup>33</sup>. Najpriaznivejšie výsledky voči AChE dosiahol terciárny pavinanový alkaloid karyachín ( $IC_{50} = 19,6 \pm 0,4 \mu M$ ) a kvartérna pavinanová báza kalifornidín ( $IC_{50} = 36,7 \pm 0,9 \mu M$ ), ktorá bola izolovaná vo forme jodidu. Najvýraznejšia inhibičná aktivita voči BuChE bola zaznamenaná pri terciárnom benzylizochinolínovom alkaloidu retikulíne ( $IC_{50} = 43,9 \pm 1,1 \mu M$ ) a pri alkaloidu, ktorý bol z prírodného zdroja izolovaný po prvý krát ( $IC_{50} = 27,8 \pm 0,4 \mu M$ ). U žiadnej testovanej látky nebola preukázaná dostatočná inhibičná aktivita voči obom týmto enzýmom súčasne<sup>33</sup>.

### 3.4.2. Antifungálna aktivita

Niektoré izochinolínové alkaloidy (berberín, tetrahydropalmitín, bikukulín, korypalmín, chaerofylín, fuyuzifín a *l*-korydalmín) dosahujú v určitých koncentráciách významnú inhibičnú aktivitu voči niektorým hubám<sup>44</sup>.

V roku 2009 bola zverejnená práca študujúca antifungálnu aktivitu dvoch izochinolínových alkaloidov, protopínovej bázy hunnemanínu a benzofenantridínovej bázy norsanguinarínu, ktoré boli izolované z metanolického extraktu celej rastliny *E. californica*. Antifungálne pôsobenie (inhibícia klíčenia výtrusov) bolo sledované na fytopatogénnych hubách *Alternaria melongenae*, *A. brassicola*, *A. brassicae*, *Curvularia lunata*, *C. maculans*, *Helminthosporium penniseti*, *H. oryzae*, *H. turbicum*, *Fusarium undum* a *F. lini*. Huby boli pestované na zemiakovo-dextrózovom agare a izolované z ich vlastných hostiteľov. Za referenčnú látku bola zvolená antifungálne účinná látka ditán. Antifungálne pôsobenie hunnemanínu bolo najvýraznejšie u *A. brassicae*, *H. penniseti* a *F. lini*, u ktorých všetky testované koncentrácie viedli k inhibícii klíčenia. 100% inhibícia bola dosiahnutá v koncentrácii hunnemanínu 1000 ppm. Norsanguinarín preukázal najväčší účinok voči *A. brassicola* a *C. maculans*, u ktorých bola 100% inhibícia dosiahnutá koncentráciou norsanguinarínu 1000 ppm<sup>44</sup>.

### 3.4.3. Sedatívne a anxiolytické vlastnosti

Sedatívne a anxiolytické pôsobenie *E. californica* sa už dlhodobo využíva v lečiteľstve a ľudovej medicíne. Bolo uskutočnených niekoľko štúdií potvrdzujúcich tieto vlastnosti<sup>61, 63</sup>. Predpokladaný mechanizmus účinku spočíva v ovplyvnení benzodiazepínových receptorov ako aj v inhibícii rozkladu katecholamínov blokovaním ich degradačných enzýmov dopamín- $\beta$ -hydroxylázy a monoaminoxidázy B. Podiel jednotlivých alkaloidov z *E. californica* na tomto účinku je veľmi pravdepodobný, žiadna štúdia ho však zatiaľ definitívne nepotvrdila<sup>61</sup>.

Práca zverejnená v roku 2006 hodnotila väzbový potenciál 70% etanolického extraktu z *E. californica* voči rôznym receptorom uplatňujúcim sa v procese sedácie a anxiolýzy<sup>64</sup>. Z testovaných receptorov boli najviac ovplyvnené serotonínové receptory 5-HT<sub>1A</sub> a 5-HT<sub>7</sub>. Cieľom práce bolo tiež zhodnotiť podiel jednotlivých alkaloidov obsiahnutých v etanolickom extrakte na tomto účinku. Za týmto účelom bolo z extraktu izolovaných šesť izochinolínových alkaloidov: kalifornidín, escholcín, *N*-metyllaurotetanín, karyachín, *O*-metylkaryachín a nový alkaloid pavinanovej štruktúry 7-*O*-metyléter-neokaryachín-*N*-metyljodid. U týchto izolovaných

čistých látok ako aj u komerčne získaného protopínu bola hodnotená schopnosť inhibovať väzbu [<sup>3</sup>H]8-hydroxy-2-(di-*N*-propylamino)tetralínu ([<sup>3</sup>H]8-OH-DPAT) na serotonínový receptor 5-HT<sub>1A</sub><sup>64</sup>. Výsledky testovania sú uvedené v nasledujúcej tabuľke (Tab. 1).

Tab. 1: Inhibícia väzby [<sup>3</sup>H]8-OH-DPAT na 5-HT<sub>1A</sub> receptor alkaloidmi z *E. californica*<sup>a 64</sup>

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

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

Ako je možné vidieť z tabuľky, najvýraznejšiu inhibičnú aktivitu preukázal aporfínový alkaloid *N*-metyllaurotetanín. Práve jemu je prisudzovaný najväčší podiel na účinku etanolického extraktu. U ostatných testovaných alkaloidov bola zaznamenaná len nízka inhibičná aktivita.

#### 3.4.4. Inhibícia cytochrómu P 450

Práca publikovaná v roku 2006 sledovala schopnosť látok obsiahnutých v *E. californica* inhibovať cytochróm P 450, konkrétne jeho izoenzým 3A4<sup>64</sup>. Testovanie bolo uskutočnené *in vitro* za použitia 70% vodného etanolického extraktu. Celkový extrakt preukázal určitú inhibičnú aktivitu (IC<sub>50</sub> = 128,6 μg/ml), preto boli testovaniu podrobené aj jednotlivé alkaloidy a flavonoidy nachádzajúce sa v extrakte. Z výsledkov možno vyvodit', že pavinanový alkaloid escholcín je silným inhibítorom CYP 3A4 *in vitro* (IC<sub>50</sub> = 13,4 ± 4,7 μM), zatiaľ čo ostatné látky nevykazujú takú výraznú aktivitu. Toto inhibičné pôsobenie môže mať za následok interakciu charakteru liečivo – rastlina, pretože veľké množstvo liečiv podlieha metabolizácii práve 3A4 izoenzýmom cytochrómu P 450<sup>64</sup>. Pri súčasnom užívaní liečiv metabolizovaných izoenzýmom 3A4 a rastlinných preparátov z *E. californica* je preto nutná zvýšená opatrnosť.

## 4. EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

### 4.1. Všeobecné postupy

#### 4.1.1. Destilácia a odparovanie

Rozpúšťadlá použité pri práci boli pred použitím prečistené destiláciou. Po zachytení predku (približne 5 %, väčšinou s vodným azeotropom) bolo vydestilovaných zvyšných asi 90 % rozpúšťadla. Rozpúšťadlá boli uchovávané v hnedých nádobách, aby boli chránené pred svetlom.

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

#### 4.1.2. Chromatografia

##### 4.1.2.1. Tenkovrstvová chromatografia

Pri tenkovrstvovej chromatografii bol použitý systém normálnych komôr. Komory boli sýtené mobilnou fázou približne 30 minút, u komôr pre preparatívnu tenkovrstvovú chromatografiu asi 60 minút. Chromatografia bola uskutočňovaná vzostupne.

##### 4.1.2.2. Stĺpcová chromatografia

Stĺpcová chromatografia bola uskutočňovaná systémom gradientovej elúcie za použitia oxidu hlinitého neutrálneho ako adsorbentu. Stĺpec bol naplnený štandardným spôsobom, naliatím suspenzie adsorbentu v rozpúšťadle. Na pripravený stĺpec bola nanosená vzorka vo forme rozteru s  $\text{Al}_2\text{O}_3$ .

### 4.2. Materiál a vybavenie

#### 4.2.1. Rozpúšťadlá

Dietylamín, p.a., Lachner

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

n-Hexán, p.a., PENTA

Chloroform, p.a., PENTA

Toluén, p.a., PENTA

#### 4.2.2. Chemikálie

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

Jodid draselný, p.a., PENTA

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

#### 4.2.3. Chemikálie a materiál pre stanovenie inhibičného účinku izolovaných látok voči erytrocytarnej AChE a sérovej BuChE

##### 4.2.3.1. Chemikálie

10mM acetylthiocholín jodid, Sigma – Aldrich

10mM butyrylthiocholín jodid, Sigma – Aldrich

Dimetylsulfoxid, Sigma – Aldrich

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

0,1M fosfátový pufor, pH 7,4; chemikálie na jeho prípravu:

Dihydrát dihydrogenfosforečnanu sodného, p.a., Lachema

Dodekahydrát hydrogenfosforečnanu disodného, p.a., Lachema

Galantamín hydrobromid, Changsha Organic Haerb Inc., China

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

##### 4.2.3.2. Materiál

Ako zdroj acetylcholinesterázy boli použité puzdrá ľudských erytrocytov, zdrojom butyrylcholinesterázy bola ľudská plazma. Meranie bolo uskutočňované v mikrotitračných doštičkách.

#### 4.2.4. Chemikálie a materiál pre stanovenie antioxidačnej aktivity izolovaných látok

2,2'-difenyl-1-pikrylhydrazyl radikál, Sigma – Aldrich

Kvercetín, Sigma – Adrich

Kyselina askorbová, Sigma – Adrich

Trolox, Sigma – Adrich

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

Centrifúga Boeco U-32R s rotorom Hettich 1611, Boeco, Germany

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

Reader Synergy<sup>TM</sup> HT Multi-Detection Microplate Reader, BioTek, USA

#### 4.2.6. Detekčné činidlá

D1: Dragendorffovo činidlo modifikované podľa Muniera<sup>65</sup>

Používa sa na detekciu alkaloidov a iných zlúčenín obsahujúcich dusík.

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

*Roztok B* vznikol rozpustením 16 g jodidu draselného v 40 ml vody.

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

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

#### 4.2.7. Chromatografické adsorbenty

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

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

A3: Oxid hlinitý neutrálny, 0,1 – 0,2 mm, deaktivovaný 5 % vody

#### 4.2.8. Vyvíjacie sústavy pre tenkovrstvovú chromatografiu (TLC)

##### 4.2.8.1. Analytická TLC

S1: Toluén + Et<sub>2</sub>NH (95:5)

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

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

#### 4.2.8.2. Preparatívna TLC

S4: CHCl<sub>3</sub> + EtOH + Et<sub>2</sub>NH (97:3:1)

### **4.3. Príprava a spracovanie chloroformového výtrepku J<sub>2</sub> z *E. californica***

#### 4.3.1. Pôvod drogy

Droga tvorená sušenou vňat'ou a koreňmi bola získaná zberom z introdukovanej kultúry (komerčné osivo). Jej dodávateľom bola firma Planta Naturalis (Markvartice u Sobotky).

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

Príprava sumárneho extraktu a jednotlivých alkaloidných výtrepkov nebola súčasťou tejto rigorózne práce. Bola uskutočnená Doc. RNDr. L. Opletalom, CSc. a Jakubom Doležalom na Katedre farmaceutickej botaniky a ekológie v roku 2007. Je možné ju nájsť v diplomovej práci Jakuba Doležala<sup>66</sup>.

##### 4.3.2.1. Príprava alkaloidného výtrepku J<sub>2</sub>

Príprava bázičných jodidov kvartérnych alkaloidov bola uskutočnená Doc. RNDr. L. Opletalom, CSc. v roku 2007. Pre priblíženie uvádzam popis tejto práce.

Extrakt z predchádzajúceho vytrepania bol zneutralizovaný 25% amoniakom na pH ≈ 9. Po niekoľkých hodinách stáťia bol odfiltrovaný žltý kryštalický (zdanlivo) sediment (J<sub>2</sub>sedim) a vysušený najskôr na vzduchu, potom vo vákuovom exsíkátore nad silikagelom (9,07 g).

Alkalický roztok bol vytrepávaný chloroformom (1200 ml extraktu + 300 ml chloroformu, 5×) a zmesou chloroform + etanol v pomere 9 : 1 (1200 ml extraktu + 300 ml zmesi, 1×). Spojené výtrepky boli odparené za vzniku tmavo hnedého, veľmi viskózneho odparku (14,12 g).

### 4.3.3. Stĺpcová chromatografia výtrepku J<sub>2</sub> z *E. californica*

5,8 g vzorky (odparok alkaloidov vo forme jodidov) bolo vo forme rozteru s EtOH a Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanesených na kolónu (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) a chromatografovaných za účelom izolácie čistých látok. Získané alkaloidné frakcie boli podrobené tenkovrstvovej chromatografii a frakcie s obsahom totožných alkaloidov boli následne spojené. Podmienky a priebeh stĺpcovej chromatografie sú zhrnuté v nasledujúcich tabuľkách (Tab. 2, Tab. 3).

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

Označenie vzorky	J <sub>2</sub> (jodidy kvartérne bázičné, pH ≈ 9 )
Hmotnosť a popis vzorky	5,8 g; tmavohnedá, pevná
Druh a množstvo adsorbentu	Oxid hlinitý neutrálny, 0,1 – 0,2 mm, 400 g, deaktivovaný 5 % vody
Vrstva s extraktom	4,2 × 7 cm
Deliaca vrstva	4,2 × 36 cm
Frakcia (ml) / doba prietoku (min.)	100 ml / 15 minút
Mŕtvy objem	500 ml

Tab. 3: Výsledky stĺpcovej chromatografie

Spojené frakcie	Frakcia	Elučný systém	Popis	Hmotnosť odparku
1 – 5	1 – 5	CHCl <sub>3</sub>	Číra, neobsahuje alkaloidy	0 g
6 – 11	6 – 11	CHCl <sub>3</sub>	Žltlooranžová olejovitá hmota	0,4759 g
12 – 18	12 – 18	CHCl <sub>3</sub>	Žltlooranžová olejovitá hmota	0,0437 g
19 – 21	19 – 21	CHCl <sub>3</sub>	Žltlooranžová olejovitá hmota	0,1065 g
22 – 30	22 – 30	CHCl <sub>3</sub>	Žltá olejovitá hmota	0,1534 g
31 – 38	31 – 38	CHCl <sub>3</sub>	Žltá olejovitá hmota	0,3812 g
39 – 50	39 – 50	CHCl <sub>3</sub>	Žltá olejovitá hmota	0,5694 g



Spojené frakcie	Frakcia	Elučný systém	Popis	Hmotnosť odparku
51 – 60	51 – 60	CHCl <sub>3</sub>	Žltá olejovitá hmota	0,6155 g
61 – 92	61 – 88	CHCl <sub>3</sub>	Žltá olejovitá hmota	1,0947 g
	89 – 92	CHCl <sub>3</sub> + EtOH (95:5)	Žltá olejovitá hmota	
93 – 95	93 – 95	CHCl <sub>3</sub> + EtOH (95:5)	Oranžová olejovitá hmota	0,8738 g
96 – 110	96 – 105	CHCl <sub>3</sub> + EtOH (95:5)	Oranžová olejovitá hmota	1,2407 g
	106 – 110	CHCl <sub>3</sub> + EtOH (90:10)	Hnedá olejovitá hmota	
	111 – 113	CHCl <sub>3</sub> + EtOH (80:20)	Hnedá olejovitá hmota	
111 - 120	114 – 116	CHCl <sub>3</sub> + EtOH (75:25)	Hnedočervená olejovitá hmota	0,0427 g
	117 – 120	CHCl <sub>3</sub> + EtOH (70:30)	Hnedá olejovitá hmota	

#### 4.3.4. Spracovanie frakcií č. 6 – 11

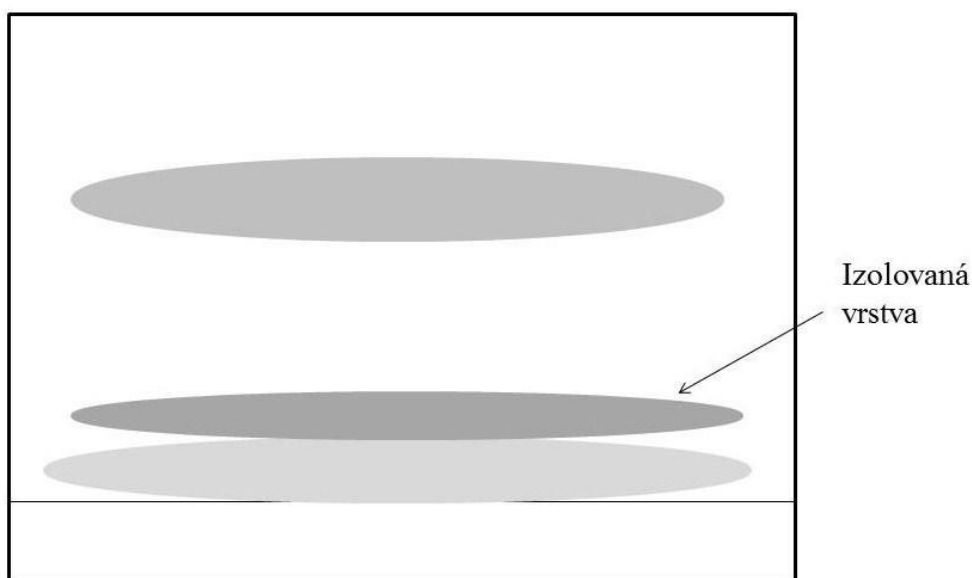
Frakcie č. 6 – 11 boli na základe zhodných výsledkov tenkovrstvovej chromatografie spojené a podrobené kryštalizácii za zníženej teploty zo zmesi chloroform – hexán. Vzniknuté kryštáliky boli oddekantované a niekoľkokrát premyté etanolom. Po rozpustení v chloroforme boli za účelom odstránenia mechanických nečistôt prefiltrované cez vrstvičku Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. Biele kryštáliky získané rekryštalizáciou z etanolu boli následne oddekantované a vysušené v exsikátore. Čistota izolovanej látky bola overená pomocou TLC za použitia mobilnej fázy S1. Čistá látka o hmotnosti 0,1372 g bola uložená pod označením LB1 a za účelom identifikácie následne podrobená štruktúrnej analýze (MS a NMR).

#### 4.3.5. Spracovanie frakcií č. 22 – 38

Frakcie č. 22 – 30 boli na základe zhodných výsledkov TLC spojené. Na izoláciu čistého alkaloidu bola využitá preparatívna tenkovrstvová chromatografia za použitia Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> ako stacionárnej fázy a zmesi rozpúšťadiel (CHCl<sub>3</sub> + EtOH + Et<sub>2</sub>NH v pomere 97:3:1) ako vyvíjacej sústavy. 150 mg odparku z frakcií č. 22 – 30 bolo rozpustených v chloroforme a nanesených na tri chromatografické dosky. Vyvíjanie každej dosky trvalo približne 20 – 25 minút a bolo uskutočnené dvakrát. Výsledok preparatívnej tenkovrstvovej chromatografie je schematicky

znázornený na obrázku č. 14. Na základe UV detekcie bola izolovaná stredná zóna. Vyškrabnutá stacionárna fáza bola premytá chloroformom a prefiltrovaná cez vrstvu  $\text{Al}_2\text{O}_3$ . Filtrát bol odparený a následne opäť rozpustený v chloroforme za mierneho zahriatia. Rekryštalizáciou z etanolu, zdekantovaním a vysušením v exsikátore boli získané kryštály čistej látky, ktoré boli uložené pod označením LB2.

Spojené frakcie č. 31 – 38 boli podrobené rovnakému spracovaniu ako frakcie č. 22 – 30. Bolo vyvinutých celkom 7 dosiek za použitia 350 mg odparku daných frakcií. Kryštály izolovaného alkaloidu boli po preukázaní totožnosti spojené s alkaloidom izolovaným z frakcií č. 22 – 30. Celkom sa podarilo získať 0,0457 g čistej látky, ktorá bola uložená pod spoločným označením LB2 a následne podrobená štruktúrnej analýze.



Obr. 14: Preparatívna tenkovrstvová chromatografia frakcií č. 22 – 30

#### 4.3.6. Spracovanie frakcií č. 93 – 95

Frakcie č. 93 – 95 boli na základe zhodnej TLC spojené. Odparok týchto spojených frakcií bol za tepla rozpustený v chloroforme a pridaním etanolu podrobený kryštalizácii. Vzniknuté kryštály boli oddekantované, niekoľkokrát premyté etanolom a znovu rozpustené v chloroforme. Z dôvodu odstránenia mechanických nečistôt boli prefiltrované cez vrstvičku  $\text{Al}_2\text{O}_3$ .

Rekryštalizáciou z etanolu vznikli kryštály, ktoré boli oddekantované, vysušené v exsikátore a následne zvážené (0,0829 g) a uložené pod označením LB3. Za účelom štruktúrnej identifikácie izolovanej látky bola uskutočnená NMR a MS analýza.

## **4.4. Určenie štruktúry izolovaných látok**

### **4.4.1. Meranie hmotnostného spektra (MS)**

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

### **4.4.2. Meranie NMR spektra**

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

Hodnoty chemických posunov sú v ppm a sú vzťahnuté k vnútornému štandardu (hexametyldisilan, 0,04 ppm, v  $^1\text{H}$  spektrách) alebo k signálu solventu (76,99 ppm, v  $^{13}\text{C}$  spektrách).

## **4.5. Stanovenie inhibičnej aktivity izolovaných alkaloidov voči erytrocytárnej AChE a sérovej BuChE**

### **4.5.1. Podmienky merania**

Experimenty boli uskutočnené za nasledujúcich podmienok:

- pri teplote 37 °C
- v prostredí fosfátového pufru (pH 7,4)
- pri vlnovej dĺžke spektrofotometra 436 nm
- v mikrotitračných doštičkách

#### 4.5.2. Príprava erytrocytárnych puzdier

Erytrocytárne puzdrá boli pripravené z čerstvo odobratej krvi, ku ktorej bol pridaný 1 ml citrátu sodného na 10 ml krvi podľa mierne upravenej metódy Stecka a Kanta <sup>67</sup>. Plazma (HuBuChE) bola odstránená z plnej krvi centrifugáciou pri rýchlosti 4000 ot./min. za použitia centrifúgy Boeco U-32R s rotorom Hettich 1611. Erytrocyty boli premiestnené do 50ml skúmaviek a trikrát premyté 5mM fosfátovým pufrom (pH 7,4) obsahujúcim 150 ml chloridu sodného (12000 ot./min., Avanti J-301, rotor JA-30.50). Premyté erytrocyty boli miešané s 5mM fosfátovým pufrom (pH 7,4) po dobu 10 minút, čím došlo k ich lýze. Následne boli centrifugované rýchlosťou 20 000 ot./min. a vzniknuté puzdrá (HuAChE) boli trikrát premyté fosfátovým pufrom.

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

Hodnoty IC<sub>50</sub> boli stanovené pomocou Ellmanovej spektrofotometrickej metódy s použitím 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoovej kyseliny (DTNB) <sup>68</sup>. Ako substráty boli použité estery thiocholínu, ktoré sú cholinesterázami štiepené na thiocholín a príslušnú kyselinu. SH-skupina thiocholínu sa naviaže na DTNB za vzniku žltu sfarbeného produktu, ktorý sa stanovuje spektrofotometricky pri vlnovej dĺžke 436 nm. Sleduje sa nárast absorbancie za jednu minútu. Hodnoty IC<sub>50</sub> boli vypočítané z nameraných hodnôt poklesu aktivity acetylcholinesterázy alebo butyrylcholinesterázy nelineárnou regresiou v programe GraphPaD Prism (verzia 3.02 pre Windows; výrobca Graph PaD Software, San Diego, CA, USA). Výsledky boli porovnané s hodnotami IC<sub>50</sub> známych inhibítorov cholinesteráz: galantamínom (IC<sub>50</sub> HuAChE = 1,710 ± 0,065 µM, HuBuChE = 42,30 ± 1,30 µM) a huperzínom A (IC<sub>50</sub> HuAChE = 0,033 ± 0,001 µM, HuBuChE >1000 µM). % I (inhibícia) bola počítaná podľa vzorca %I = 100-(ΔA<sub>BL</sub>/ΔA<sub>SA</sub>)\*100, kde ΔA<sub>BL</sub> je nárast absorbancie slepej vzorky za 1 minútu a ΔA<sub>SA</sub> je nárast absorbancie meranej vzorky.

### 4.6. Stanovenie antioxidačnej aktivity (EC<sub>50</sub>) izolovaných alkaloidov

Antioxidačná aktivita bola testovaná *in vitro* DPPH testom. Metóda je založená na reakcii stabilného 2,2'-difenyyl-1-pikrylhydrazylu (DPPH) so vzorkou. Zníženie absorbancie DPPH meranej pri 525 nm je závislé od koncentrácie antioxidantu v sledovanej vzorke. Antiradikálová aktivita vzoriek bola vyjadrená ako 50% účinná koncentrácia (EC<sub>50</sub>), ktorá bola vypočítaná

pomocou programu GraphPad Prism 3.02 a bola porovnaná so známymi antioxidantmi: kvercetínom  $EC_{50} = 11,11 \pm 0,25 \mu\text{M}$ , kyselinou askorbovou  $EC_{50} = 51,15 \pm 3,27 \mu\text{M}$  a troloxom  $EC_{50} = 20,45 \pm 1,31 \mu\text{M}$ .

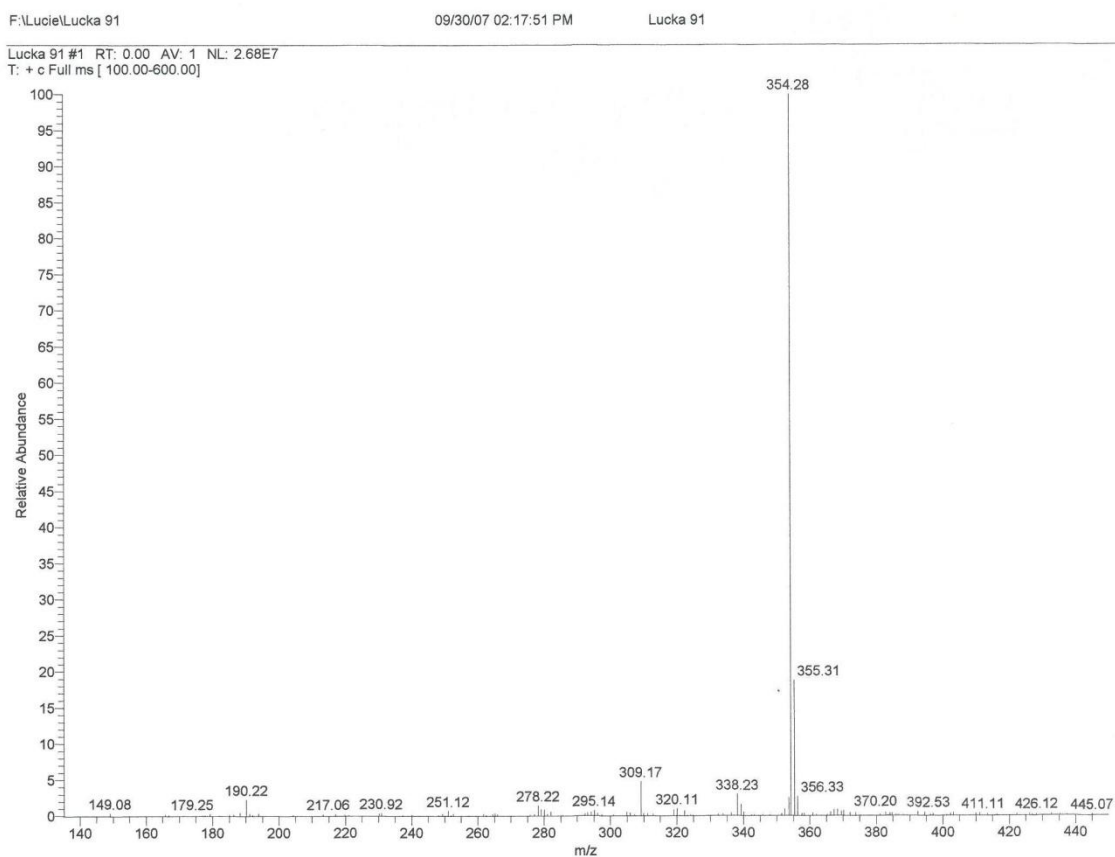
## 5. VÝSLEDKY

Na základe výsledkov MS a NMR štúdií a porovnania dát s literatúrou boli izolované látky identifikované ako allokryptopín (LB1), (-)-7-*O*-metyl-éterneokaryachín-*N*-metyljodid (LB2) a kalifornidín (LB3). Kompletne štruktúrne analýzy allokryptopínu a kalifornidínu je možné nájsť v mojej diplomovej práci<sup>25</sup>.

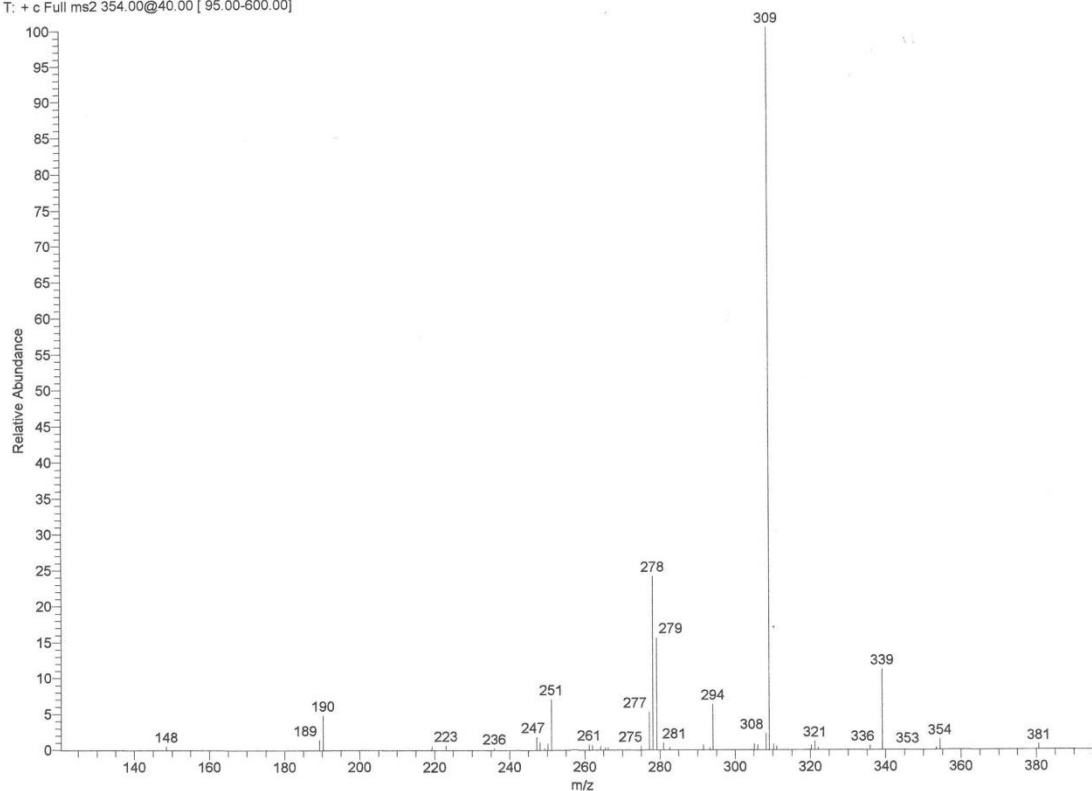
### 5.1. Štruktúrna analýza (-)-7-*O*-metyl-éterneokaryachín-*N*-metyljodidu

#### 5.1.1. MS štúdie (-)-7-*O*-metyl-éterneokaryachín-*N*-metyljodidu

ESI-MS  $m/z$  354.2  $[M]^+$  (100). MS/MS  $m/z$  339  $[M-CH_3]^+$  (112), 309  $[M+H-CH_3-OCH_3]^+$  (100), 294 (8), 278 (26).

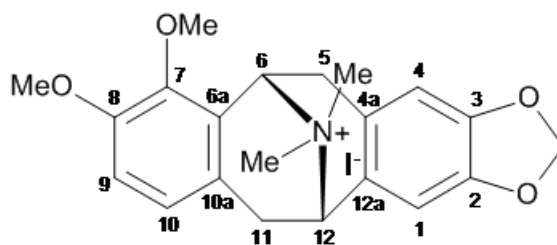


Obr. 15: MS spektrum (-)-7-*O*-metyl-éterneokaryachín-*N*-metyljodidu

LLC 22 MS2 354 #1 RT: 0.03 AV: 1 NL: 3.32E5  
T: + c Full ms2 354.00@40.00 [ 95.00-600.00]Obr. 16: MS/MS spektrum (-)-7-*O*-metyl-éterneokaryachín-*N*-metyljodidu

### 5.1.2. NMR štúdie (-)-7-*O*-metyl-éterneokaryachín-*N*-metyljodidu

Štruktúra izolovanej látky bola určená na základe interpretácie  $^1\text{H}$ - a  $^{13}\text{C}$ -NMR spektier a ich porovnania s dátami v literatúre<sup>64</sup>.

Obr. 17: Štruktúra (-)-7-*O*-metyl-éterneokaryachín-*N*-metyljodidu

### 5.1.2.1. <sup>1</sup>H-NMR spektrum (-)-7-*O*-metyl-éterneokaryachín-*N*-metyljodidu

<sup>1</sup>H NMR (δ, CDCl<sub>3</sub>, 25°C):

6.89 (1H, d, *J* = 8.4 Hz, H-9); 6.82 (1H, d, *J* = 8.4 Hz, H-10); 6.76 (1H, s, H-1); 6.47 (1H, s, H-4); 5.95 a 5.92 (2 x 1H, s, -OCH<sub>2</sub>-); 5.50 (1H, d, *J* = 4.8 Hz, H-12); 5.04 (1H, d, *J* = 4.8 Hz, H-6); 4.03 (3H, s, OCH<sub>3</sub>-7) 3.86 (3H, s, - OCH<sub>3</sub>-8); 3.78 (1H, dd, *J* = 17.4, 4.8 Hz, H-11a); 3.58 (3H, s, N-CH<sub>3</sub>), 3.56 (3, s, N-CH<sub>3</sub>), 3.55 (1H, dd, *J* = 17.4, 4.8 Hz, H-5a); 3.07 (2H, d, *J* = 17.4 Hz, H-5b, H-11b)

### 5.1.2.2. <sup>13</sup>C-NMR spektrum (-)-7-*O*-metyl-éterneokaryachín-*N*-metyljodidu

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

151.8 (C-8), 149.8 (C-2), 148.5 (C-3), 145.7 (C-7), 125.3 (C-6a), 124.8 (C-12a), 124.4 (C-10), 120.4 (C-4a), 119.4 (C-10a), 112.9 (C-9), 108.3 (C-4), 107.6 (C-1), 101.8 (-OCH<sub>2</sub>O-), 65.4 (C-12), 62.6 (C-6), 62.0 (OCH<sub>3</sub>-7), 56.1 (OCH<sub>3</sub>-8), 51.0 (N-CH<sub>3</sub>), 51.0 (N-CH<sub>3</sub>), 33.6 (C-11), 32.5 (C-5).

## 5.2. Inhibičná aktivita voči HuAChE a HuBuChE

Izolované alkaloidy boli podrobené testovaniu ich inhibičnej aktivity voči ľudskej erytrocytarnej acetylcholinesteráze a sérovej butyrylcholinesteráze. Výsledky hodnotenia sú uvedené v nasledujúcej tabuľke (Tab. 4) a znázornené na nasledujúcich obrázkoch (Obr. 18, Obr. 19, Obr. 20).

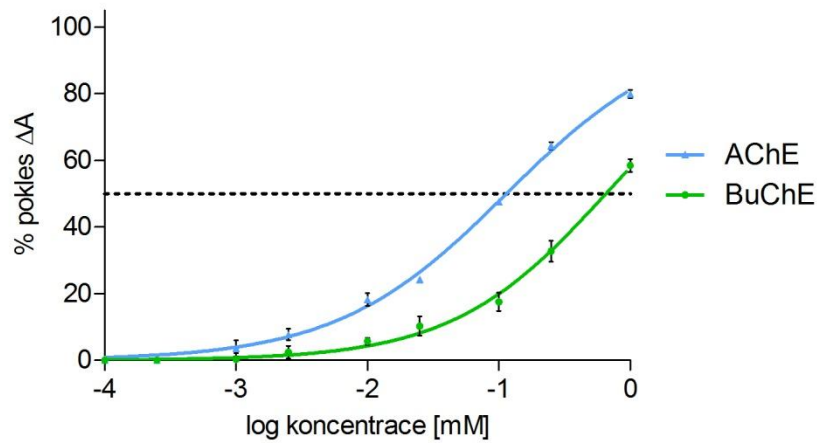
Tab. 4: *In vitro* inhibičná aktivita izolovaných alkaloidov voči HuAChE a HuBuChE

Látky	IC <sub>50</sub> (μM) <sup>a</sup>	
	HuAChE	HuBuChE
Allokryptopín	114,4 ± 3,2	655 ± 12
(-)-7- <i>O</i> -metyl-éterneokaryachín- <i>N</i> -metyljodid	148,2 ± 8,5	>1000
Kalifornidín	69,9 ± 2,9	>1000
Galantamín <sup>b</sup>	1,710 ± 0,065	42,30 ± 1,30
Huperzín A <sup>b</sup>	0,033 ± 0,001	>1000

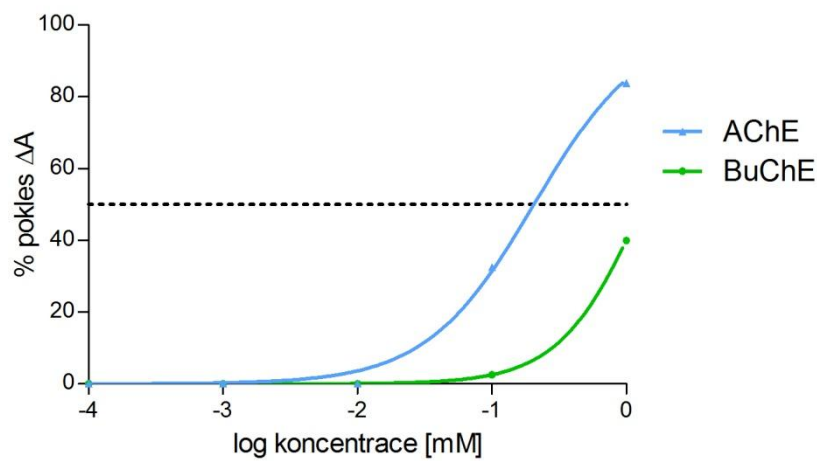
<sup>a</sup> Každé meranie bolo opakované trikrát

<sup>b</sup> Referenčná látka

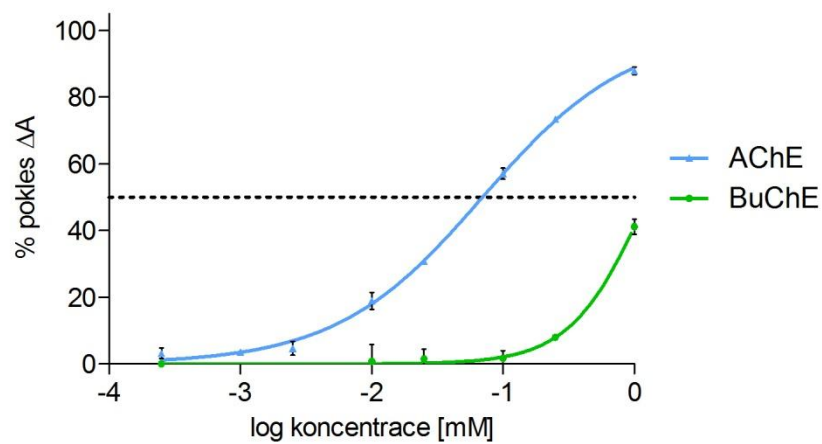




Obr. 18: Inhibičná aktivita allokryptopínu



Obr. 19: Inhibičná aktivita (-)-7-*O*-metyl-éterneokaryachín-*N*-metyljodidu



Obr. 20: Inhibičná aktivita kalifornidínu

### 5.3. Antioxidačná aktivita

U izolovaných alkaloidov bola testovaná aj ich antioxidačná aktivita. Výsledky hodnotenia sú uvedené v nasledujúcej tabuľke (Tab. 5).

Tab. 5: Antioxidačná aktivita izolovaných alkaloidov

Látky	EC <sub>50</sub> (μM) <sup>a</sup>
Allokryptopín	>1000
(-)-7- <i>O</i> -metyl-éterneokaryachín- <i>N</i> -metyljodid	>1000
Kalifornidín	>1000
Kvercetín <sup>b</sup>	11,11 ± 0,25
Kyselina askorbová <sup>b</sup>	51,15 ± 3,27
Trolox <sup>b</sup>	20,45 ± 1,31

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

<sup>b</sup> Referenčná látka

## 6. DISKUSIA

Predmetom tejto rigoróznejšej práce bolo spracovanie základného výtrepku kvartérnych alkaloidov vo forme jodidov z *Eschscholtzia californica* CHAM. (Papaveraceae). Za použitia bežných izolačných a chromatografických metód boli izolované tri alkaloidy v čistej forme. Za účelom štruktúrnej identifikácie izolovaných látok boli všetky tri alkaloidy podrobné MS a NMR analýze a následne tiež testovaniu ich biologickej aktivity.

Prvý izolovaný alkaloid, označený LB1, bol na základe výsledkov štruktúrnej analýzy a porovnania dát s literatúrou identifikovaný ako allokryptopín. Allokryptopín je terciárny izochinolínový alkaloid protopínovej štruktúry, ktorý sa vyskytuje v mnohých rodoch čeľade Papaveraceae (napr. *Chelidonium* spp., *Eschscholtzia* spp., *Glaucium* spp.<sup>69</sup>), Fumariaceae (napr. *Corydalis* spp.<sup>70</sup>), tiež v čeľadi Ranunculaceae (napr. *Thalictrum* spp.<sup>71</sup>) a Berberidaceae (napr. *Berberis densiflora*<sup>72</sup>). Prítomnosť tohto terciárneho alkaloidu vo frakcii kvartérnych alkaloidov možno vysvetliť tak, že pri príprave výtrepku terciárnych alkaloidov sa nepodarilo všetok allokryptopín vytrepať.

Druhým izolovaným alkaloidom, označeným LB2, bol (-)-7-*O*-metyl-éterneokaryachín-*N*-metyljodid, ktorého totožnosť bola určená na základe MS a NMR analýzy a porovnania získaných dát s literatúrou. Je to kvartérny izochinolínový alkaloid pavinanového typu, ktorý bol po prvýkrát z tejto rastliny izolovaný v roku 2006 S. Gafnerom a spol.<sup>64</sup> Z iného rastlinného druhu zatiaľ izolovaný nebol.

Alkaloid označený ako LB3 bol na základe výsledkov štruktúrnej analýzy a porovnania dát s literatúrou identifikovaný ako kalifornidín. Ide taktiež o kvartérny izochinolínový alkaloid pavinanovej štruktúry, ktorý bol z tejto rastliny v minulosti izolovaný už niekoľkokrát<sup>31, 64</sup>. Izolovať sa ho podarilo aj z iných druhov rodu *Eschscholtzia*, konkrétne z *Eschscholtzia douglasii* (HOOK. et ARN.) WALP. a z *Eschscholtzia glauca* GREENE<sup>31</sup>. Nie je známe, že by bol izolovaný aj zo zástupcov iných rodov, preto je pre rod *Eschscholtzia* považovaný za unikátny.

Všetky tri izolované alkaloidy boli podrobené testovaniu ich inhibičnej aktivity voči erytrocytarnej HuAChE a sérovej HuBuChE. Inhibičná aktivita bola hodnotená pomocou Ellmanovej spektrofotometrickej metódy s použitím 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoovej kyseliny (DTNB). Ako referenčné látky boli použité dva známe inhibítory AChE, galantamín a huperzín

A. Testovanie bolo uskutočnené na prístroji Reader Synergy™ zaručujúcom meranie pri štandardných podmienkach.

Hodnota  $IC_{50}$  allokryptopínu stanovená pre HuAChE bola  $114,4 \pm 3,2 \mu\text{M}$  a pre HuBuChE  $655 \pm 12 \mu\text{M}$ . V porovnaní s použitými štandardmi (galantamín:  $IC_{50}$  (HuAChE) =  $1,710 \pm 0,065 \mu\text{M}$ ,  $IC_{50}$  (HuBuChE) =  $42,30 \pm 1,30 \mu\text{M}$ , huperzín A:  $IC_{50}$  (HuAChE) =  $0,033 \pm 0,001 \mu\text{M}$ ,  $IC_{50}$  (HuBuChE) >1000  $\mu\text{M}$ ) sú namerané hodnoty allokryptopínu výrazne vyššie. Tieto hodnoty sa líšia od hodnôt nameraných pomocou spektrofotometra, ktoré sú uvedené v mojej diplomovej práci ( $IC_{50}$  (HuAChE) =  $250 \pm 22,2 \mu\text{M}$ ,  $IC_{50}$  (HuBuChE) =  $530 \pm 28,2 \mu\text{M}$ ). Vysvetlením môže byť použitie iného meracieho prístroja umožňujúceho meranie za konštantnej teploty. Inhibičná aktivita allokryptopínu sa však v oboch prípadoch javí ako nedostatočná a táto látka nemôže byť považovaná za perspektívne liečivo v terapii AD.

Pre (-)-7-*O*-metyl-éterneokaryachín-*N*-metyljodid boli namerané hodnoty  $IC_{50}$  (HuAChE) =  $148,2 \pm 8,5 \mu\text{M}$  a  $IC_{50}$  (HuBuChE) >1000  $\mu\text{M}$ . Inhibičná aktivita tejto látky voči HuAChE je nízka a voči HuBuChE úplne zanedbateľná. Napriek tomu, že sa jedná o látku kvartérneho charakteru, u ktorých obvykle býva inhibičná aktivita zaujímavá, nami namerané hodnoty  $IC_{50}$  sú pomerne vysoké a (-)-7-*O*-metyl-éterneokaryachín-*N*-metyljodid sa preto nejaví ako látka potenciálne využiteľná v liečbe AD.

Inhibičné hodnoty stanovené pre kalifornidín boli  $IC_{50}$  (HuAChE) =  $69,9 \pm 2,9 \mu\text{M}$  a  $IC_{50}$  (HuBuChE) >1000  $\mu\text{M}$ . Inhibičná aktivita kalifornidínu voči AChE bola testovaná už skôr (61% inhibícia AChE pri koncentrácii 10  $\mu\text{M}$ <sup>73</sup>). Zdrojom enzýmu však neboli puzdrá ľudských erytrocytov, ale elektrický úhor, preto získané výsledky nie je možné uspokojivo porovnať. Hodnoty  $IC_{50}$  kalifornidínu uvedené v mojej diplomovej práci ( $IC_{50}$  (HuAChE) =  $36,7 \pm 0,9 \mu\text{M}$ ,  $IC_{50}$  (HuBuChE) >1000  $\mu\text{M}$ ) sa od vyššie uvedených hodnôt líšia len mierne. Vysvetlením môže byť už spomenutá zmena spôsobu merania. Inhibičná aktivita kalifornidínu voči HuAChE sa zdá byť relatívne dobrá, limitujúcim faktorom jeho použitia je však kvartérny charakter jeho molekuly, čím je značne obmedzený prechod hematoencefalickou bariérou a tým aj jeho pôsobenie v mozgu. Ani u tejto látky preto nemožno predpokladať významné uplatnenie v terapii AD.

Na základe predpokladu, že významnú úlohu v patogeneze AD zohráva aj oxidačný stres a voľné kyslíkové radikály, boli všetky tri izolované alkaloidy podrobené aj testovaniu ich antioxidačnej aktivity (DPPH test). U žiadnej z týchto látok nebola preukázaná terapeuticky

významná antioxidantná aktivita, nakoľko hodnoty  $EC_{50}$  všetkých troch testovaných látok boli vyššie než  $1000 \mu\text{M}$ .

## 7. LITERATÚRA

1. Vlček J., Fialová D. a kol.: *Klinická farmacie I.* 1. vyd. Grada, Praha 2010.
2. Preiss M. a kol.: *Klinická neuropsychologie.* 1. vyd. Grada, Praha 1998.
3. Fišar Z. a kol.: *Vybrané kapitoly z biologické psychiatrie.* 2. vyd. Grada, Praha 2009.
4. Koukolík F., Jiráček R.: *Diagnostika a léčení syndromu demence.* 1. vyd. Grada, Praha 1999.
5. Hartl J., Palát K.: *Farmaceutická chemie I.* 2. vyd. Karolinum, Praha 2007.
6. Čeladník M. a kol.: *Organická chemie.* Avicenum, Praha 1990.
7. Tomko J. a kol.: *Farmakognózia.* 2. vyd. Osveta, Martin 1999.
8. Marco L., do Carmo Carreiras M.: Galanthamine, a natural product for the treatment of Alzheimer's disease. *Recent Pat. CNS Drug Discov.* 2006, 1, 105-111.
9. Sramek J. J., Franckiewicz E. J., Cutler N. R.: Review of the acetylcholinesterase inhibitor galanthamine. *Expert Opin. Investig. Drugs* 2000, 9, 2393-2402.
10. Hostettmann K., Borloz A., Urbain A., Marston A.: Natural product inhibitors of acetylcholinesterase. *Cur. Ogr. Chem.* 2006, 10, 825-847.
11. Jahodář L.: *Farmakobotanika - semenné rostliny.* Karolinum, Praha 2006.
12. Dewick P.: Medicinal natural products. *Wiley J. a Sons* 2002, 292, 339-341.
13. Rössner P.: Alzheimerova choroba – diagnostika a léčba. *Neurologie pro praxi* 2004, No. 1, 11-16.
14. Lorenzo A., Yankner B. A.: Beta-amyloid neurotoxicity requires fibril formation and is inhibited by Congo red. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994, 91, 12243-12247.
15. Darvesh S., Cash M. K., Reid G. A., Martin E., Mitnitski A., Geula C.: Butyrylcholinesterase Is Associated With  $\beta$ -Amyloid Plaques in the Transgenic APP<sup>swe</sup>/PSEN1<sup>dE9</sup> Mouse Model of Alzheimer Disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 2012, 71 (1), 2-14.
16. Silbernagl S., Lang F.: *Atlas patofyziologie člověka.* 1. vyd. Grada, Praha 2001.
17. Koukolík F., Jiráček R.: *Alzheimerova nemoc a další demence.* 1. vyd. Grada, Praha 1998.
18. Jiráček R.: Farmakoterapie Alzheimerovy choroby. *Klin. Farmakol. Farm.* 2004, 18, 212-214.
19. Lincová D., Farghali H., et al.: *Základní a aplikovaná farmakologie.* 2. vyd. Galén, Praha

2007.

20. botany.cz.: <http://botany.cz/cs/eschscholtzia-californica/>, vystavené dňa 8.11.2011.
21. Blaschek W., Ebel S., Hackenthal E., Holzgrabe U., Keller K., Reichling J., Schulz V.: *Hagers Handbuch der Drogen und Arzneistoffe*. HagerROM 2006. CD-Realisierung: Informatik II. Universität Würzburg. [ Programmversion 6.1 ]. Springer Medizin Verlag, Heidelberg 2006.
22. Könemann: *Botanika*, 1. vyd. Slovart, Praha 2007.
23. Cheney R. H.: Therapeutic potential of *Eschscholtzia californica* herba. *Q. J. Crude Drug Res.* 1963, 3, 413-416.
24. Duke J. A.: *CRC Handbook of Medicinal Herbs*. CRC Press, Boca Raton, FL. 1985.
25. Bednaříková L.: *Biologicky aktivní metabolity rostlin 4. Alkaloidy Eschscholtzia californica CHAM. a jejich biologická aktivita*. UK v Praze, Farmaceutická Fakulta v Hradci Králové. Hradec Králové 2011. Diplomová práce. 65 s.
26. Teuscher E., Lindequist U.: *Biogene Gifte: Biologie, Chemie, Pharmakologie*. 2. vyd. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart 1994.
27. Fabre N., Claparols C., Richelme S., Angelin M.-L., Fourasté I., Moulis C.: Direct characterization of isoquinoline alkaloids in a crude plant extract by ion-pair liquid chromatography - electrospray ionization tandem mass spectrometry: example of *Eschscholtzia californica*. *J. Chromatogr. A* 2000, 904, 35-46.
28. Cahlíková L., Hořčíčková Z., Opletal L., Macáková K., Kurfürst M.: Isochinolinové alkaloidy a jejich biologická aktivita. 38. *Konference Syntéza a analýza léčiv*. Hradec Králové 2009. Sborník abstraktů. s. 73.
29. Paul L. D., Maurer H. H.: Studies on the metabolism and toxicological detection of the *Eschscholtzia californica* alkaloids californine and protopine in urine using gas chromatography - mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* 2003, 789, 43-57.
30. Sturm S., Stuppner H.: Analysis of isoquinoline alkaloids in medicinal plants by capillary electrophoresis - mass spectrometry. *Electrophoresis* 1998, 19, 3026-3032.
31. Slavík J., Slavíková L.: On alkaloids from the aerial parts of three *Eschscholtzia* species. *Coll. Czech. Chem. Commun.* 1986, 51, 1743-1751.

32. Lee S.-S., Liu Y.-C., Chen C.-H.: Neocaryachine, a new pavine alkaloid from *Cryptocarya chinensis*, and NMR spectral properties of related alkaloids. *J. Nat. Prod.* 1990, 53, 1267-1271.
33. Cahlíková L., Macáková K., Kuneš J., Kurfürst M., Opletal L., Cvačka J., Chlebek J., Blunden G.: Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase Inhibitory Compounds from *Eschscholtzia californica* (Papaveraceae). *Nat. Prod. Commun.* 2010, 5 (7), 1035-1038.
34. Stermitz F. R., McMurtrey K. D.: Alkaloids of the Papaveraceae. X. New alkaloids of *Argemone gracilentia*. *J. Org. Chem.* 1969, 34, 555.
35. Stermitz F. R., Stermitz J. R., Zanoni T. A., Gillespie J. P.: Alkaloids of the Papaveraceae. XXI. Alkaloids of *Argemone subintegrifolia* and *A. munita*. *Phytochem.* 1974, 13, 1151.
36. Wu J., Beal J. L., Wu W.-N., Doskotch R. W.: Alkaloids of *Thalictrum*. XXIV. Isolation and identification of alkaloids from tertiary phenolic fraction of *Thalictrum revolutum* tops. *Lloydia* 1977, 40, 593.
37. Urzúa A., Mendoza L.: Eschscholtzine-N-oxide from *Eschscholtzia californica*. *J. Nat. Prod.* 1986, 49 (5), 922-923.
38. Suchomelová J., Táborská E.: *HPLC studium kvartérních benzofenanthridinových alkaloidů ve vybraných rostlinných druzích čeledi Papaveraceae*. Masarykova univerzita, Lékařská fakulta v Brně, Biochemický ústav, 2007. Dizertační práce. 81 s.
39. Dostál J., Slavík J.: Novější poznatky o sanguinarinu a příbuzných alkaloidech. *Chem. Listy* 2000, 94, 15-20.
40. Ahmad N., Gupta S., Husain M. M., Heiskanen K. M., Mukhtar H.: Differential antiproliferative and apoptotic response of sanguinarine for cancer cells versus normal cells. *Clin. Cancer Res.* 2000, 6, 1524-1528.
41. Chmura S. J., Dolan M. E., Cha A., Mauceri H. J., Kufe D. W., Weichselbaum R. R.: In vitro and in vivo activity of protein kinase C inhibitor chelerythrine chloride includes tumor cell toxicity and growth delay in vivo. *Clin. Cancer Res.* 2000, 6, 737-742.
42. Eley B. M.: Antibacterial agents in the control of supragingival plaque - a review. *Br. Dent. J.* 1999, 186, 286-296.
43. Grenby T. H.: The use of sanguinarine in mouthwashes and toothpaste compared with some other antimicrobial agents. *Br. Dent. J.* 1995, 178, 254-258.



44. Singh S., Jain L., Pandey M. B., Singh U. P., Pandey V. B.: Antifungal Activity of the Alkaloids from *Eschscholtzia californica*. *Fol. Microbiol.* 2009, 54 (3), 204-206.
45. Manske R. H. F., Shin K. H.: The alkaloids of Papaveraceae plants. LIII. *Eschscholtzia californica*. *Can. J. Chem.* 1965, 43, 2180.
46. Mištová T.: *Alkaloidy obsažené v čeledi Papaveraceae Juss.* Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická, 2009. Bakalárska práca. 40 s.
47. Ko F. N., Wu T. S., Lu S. T., Wu Y. C., Huang T. F., Teng C. M.: Antiplatelet effects of protopine isolated from *Corydalis tubers*. *Tromb. Res.* 1989, 56(2), 289-298.
48. Hrdina V. a spol.: *Přírodní toxiny a jedy*. Galén, Praha 2004.
49. Beck M.-A., Häberlein H.: Flavonol glycosides from *Eschscholtzia californica*. *Phytochemistry* 1999, 50, 329-332.
50. Jain L., Tripathi M., Pandley V. B., Rücker G.: Flavonoids from *Eschscholtzia californica*. *Phytochemistry* 1996, 41, 661-662.
51. Bilia A. R., Caldiroli L., Morelli I., Tomè F.: Pigments of *Eschscholtzia californica* Cham. flowers. *Plant Physiol. Biochem.* 1996, 34, 317.
52. Maoka T., Fujiwara Y., Hashimoto K., Takeda S., Takaragaki S., Ida K.: A New retro-Carotenoid from the Petals of the Californian Yellow Poppy *Eschscholtzia californica*. *J. Nat. Prod.* 2000, 63, 1288-1289.
53. Hegnauer R.: *Chemotaxonomie der Pflanzen*. Vol. 5. Birkhäuser, Basel a Stuttgart 1969.
54. Fedde F.: *Das Pflanzenreich - Regni vegetabilis conspectus*. Vol. 104. W. Engelmann, Leipzig 1909.
55. Slavík J., Novák V., Slavíková L.: Alkaloids from *Eschscholtzia lobbii* GREENE. *Collect Czech. Chem. C.* 1976, 41, 2429-2432.
56. Slavík J., Dolejš L., Sedmera P.: Alkaloids of the Papaveraceae. XLIV. Quaternary alkaloids from roots of three *Escholtzia* species and from the aerial part of *Hunnemannia fumariaefolia* SWEET: Constitution of escholidine. *Collect Czech. Chem. C.* 1970, 35, 2597-2612.
57. Slavíková L., Slavík J.: Alkaloide der Mohngewächse (Papaveraceae) XXXIII. Über die Alkaloide von drei Arten der Gattung *Eschscholtzia* und über die Konstitution des neuen Alkaloids Escholamin. *Collect Czech. Chem. C.* 1966, 31, 3362-3372.

58. Slavík J., Slavíková L.: Alkaloids of the Papaveraceae. XLV. Phenolic non-quaternary alkaloids from the roots of three *Eschscholtzia* species. *Collect Czech. Chem. C.* 1971, 35, 2067-2069.
59. Slavík J., Slavíková L., Haisová K.: Alkaloide der Mohngewächse (Papaveraceae) XXXVI. Über weitere Alkaloide aus den Arten *Eschscholtzia douglasii* (HOOK. et ARN.)WALP. und *E. glauca* GREENE und über die Konstitution von Californidin. *Collect Czech. Chem. C.* 1967, 32, 4420-4430.
60. Slavík J., Slavíková L., Dolejš L.: Quaternary alkaloids of an *Eschscholtzia* species (*E. oregana* GREENE?). *Collect Czech. Chem. C.* 1975, 40, 1095-1102.
61. Rolland A., Fleurentin J., Lanhers M. C., Younos C., Misslin R., Mortier F., Pelt J. M.: Behavioural effects of the American traditional plant *Eschscholtzia californica*: sedative and anxiolytic properties. *Planta Medica* 1991, 57, 212-216.
62. Vincieri F. F., Celli S., Mulinacci N., Speroni E.: An approach to the study of the biological activity of *Eschscholtzia californica* Cham. *Pharmacol. Res. Commun.* 1988, 20 (5), 41-44.
63. Hanus M., Lafon J., Mathieu M.: Double-blind, randomised, placebo-controlled study to evaluate the efficacy and safety of a fixed combination containing two plant extracts (*Crataegus oxyacantha* and *Eschscholtzia californica*) and magnesium in mild-to-moderate anxiety disorders. *Curr. Med. Res. Opin.* 2004, 20, 63-71.
64. Gafner S., Dietz B. M., McPhail K. L., Scott I. M., Glinski J. A., Russell F. E., McCollom M. M., Budzinski J. W., Foster B. C., Bergeron C., Rhyu M.-R., Bolton J. L.: Alkaloids from *Eschscholtzia californica* and Their Capacity to Inhibit Binding of [3H]8-hydroxy-2-(di-N-propylamino)tetralin to 5-HT<sub>1A</sub> Receptors in Vitro. *J. Nat. Prod.* 2006, 69, 432-435.
65. Stahl E.: *Thin-layer Chromatography, A Laboratory Handbook.* Springer Verlag, Berlin 1969.
66. Doležal J.: *Biologická aktivita obsahových látek rostlin VIII. Vliv alkaloidů z různých rostlinných taxonů na acetylcholinesterázu.* UK v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové. Hradec Králové, 2008. Diplomová práce. 65 s.
67. Steck T. L., Kant J. A.: Preparation of impermeable ghosts and inside-out vesicles from human erythrocyte membranes. *Methods Enzymol.* 1974, 31, 172.

68. Ellman G. L., Courtney K. D., Andres V. J., Feather-Stone R. M.: A new rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol* 1961, 7, 88.
69. Kintsurashvili L. G., Vachnadze V. Y.: Alkaloids of *Glaucium corniculatum* and *G. flavum* growing in Georgia. *Chem. Nat. Comp.* 2000, 36, 225-226.
70. Wang Q.-Z., Liang J. Y., Yuan Y.: Purification and identification of chemical constituents of *Corydalis saxicola*. *Zhongguo Tianran Yaowu* 2007, 5, 31-34.
71. Kintsurashvili L. G., Vachnadze V. Y.: Alkaloids from *Thalictrum triternatum* Rupr., growing in Georgia. *Seriya Khimicheskaya* 1997, 23, 172-173.
72. Khamidov I. I., Aripova S. F., Telezhenetskaya M. V., Karimov A., Dzhenberov I.: Berberis alkaloids. XXXIX. New alkaloids from *B. densiflora*. *Chem. Nat. Comp.* 1997, 33, 323-325.
73. Stejskal J., Kovář J., Slavík J.: Inhibition of acetylcholine esterase and butyrylcholine esterase with isoquinoline alkaloids. *Coll. Czech. Chem. Commun.* 1985, 50, 2471-2479.

## 8. ZOZNAM SKRATIEK

AD	Alzheimerova choroba
AChE	acetylcholinesteráza
APP	amyloidový prekurzorový proteín
BuChE	butyrylcholinesteráza
CE	kapilárna elektroforéza
CNS	centrálny nervový systém
CYP	cytochróm P
DPPH	2,2'-difenyl-1-pikrylhydrazyl
DTNB	5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina
<i>E. californica</i>	<i>Eschscholtzia californica</i>
<i>E. douglasii</i>	<i>Eschscholtzia douglasii</i>
<i>E. glauca</i>	<i>Eschscholtzia glauca</i>
<i>E. lobbii</i>	<i>Eschscholtzia lobbii</i>
<i>E. oregana</i>	<i>Eschscholtzia oregana</i>
EBM	medicína založená na dôkazoch (evidence based medicine)
EC	účinná koncentrácia
GABA	$\gamma$ -aminomaslová kyselina
GC	plynová chromatografia
HEB	hematoencefalická bariéra
HPLC	vysokoúčinná kvapalinová chromatografia
HuAChE	ľudská acetylcholinesteráza
HuBuChE	ľudská butyrylcholinesteráza
IC	inhibičná koncentrácia
IC <sub>50</sub>	inhibítor cholinesterázy
min.	minúta

MS	hmotnostná spektrometria
NMDA	N-metyl-D-aspartát
NMR	nukleárna magnetická rezonancia
Obr.	obrázok
ot.	otáčka
SNRI	inhibítory spätného vychytávania serotonínu a noradrenalínu
SSRI	selektívne inhibítory spätného vychytávania serotonínu
Tab.	tabuľka
TLC	tenkovrstvová chromatografia
vit.	vitamín

## ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra: Katedra farmaceutické botaniky a ekologie

Kandidát: Mgr. Lucia Bednaříková

Konzultant: Ing. Lucie Cahlíková, Ph.D.

Názov rigorózneho práce: Biologicky aktívne metabolity rastlín VII. Alkaloidy *Eschscholtzia californica* CHAM. a ich biologická aktivita

Predmetom rigorózneho práce bolo spracovanie základného výťreku kvartérnych alkaloidov vo forme jodidov z *Eschscholtzia californica* CHAM. (Papaveraceae). Pomocou bežných chromatografických metód boli izolované tri alkaloidy v čistej forme, ktoré boli následne podrobené štruktúrnej analýze (MS a NMR štúdie). Prvou izolovanou látkou bol terciárny alkaloid allokryptopín, druhá izolovaná látka bola identifikovaná ako kvartérna báza (-)-7-*O*-metyl-éterneokaryachín-*N*-metyljodid, tretím izolovaným alkaloidom bola kvartérna báza kalifornidín. Všetky tri alkaloidy boli z *E. californica* už v minulosti izolované.

Všetky izolované látky boli testované na ich inhibičnú aktivitu voči ľudskej erytrocytarnej acetylcholinesteráze (HuAChE) a ľudskej sérovej butyrylcholinesteráze (HuBuChE). Pre allokryptopín boli namerané hodnoty  $IC_{50}$  (HuAChE) =  $114,4 \pm 3,2 \mu\text{M}$  a  $IC_{50}$  (HuBuChE) =  $655 \pm 12 \mu\text{M}$ . Inhibičné hodnoty získané pre (-)-7-*O*-metyl-éterneokaryachín-*N*-metyljodid boli  $IC_{50}$  (HuAChE) =  $148,2 \pm 8,5 \mu\text{M}$  a  $IC_{50}$  (HuBuChE)  $>1000 \mu\text{M}$ . U kalifornidínu boli namerané hodnoty  $IC_{50}$  (HuAChE) =  $69,9 \pm 2,9 \mu\text{M}$  a  $IC_{50}$  (HuBuChE)  $>1000 \mu\text{M}$ . V porovnaní s použitými pozitívnymi štandardmi galantamínom a huperzínom A boli látky allokryptopín a (-)-7-*O*-metyl-éterneokaryachín-*N*-metyljodid len málo aktívne. Inhibičná aktivita kalifornidínu voči HuAChE bola o niečo priaznivejšia, limitujúcim faktorom je však kvartérny charakter jeho molekuly obmedzujúci prechod hematoencefalickou bariérou. Žiadna z testovaných látok sa teda nejaví ako perspektívna látka využiteľná v terapii Alzheimerovej choroby.

U všetkých troch látok boli uskutočnené aj testy ich antioxidačnej aktivity. Dosiagnuté hodnoty  $EC_{50}$  boli vo všetkých prípadoch vyššie než  $1000 \mu\text{M}$ . Tieto látky teda nevykazujú žiadnu terapeuticky významnú antioxidačnú aktivitu.

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

## ABSTRACT

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department: Department of Pharmaceutical Botany and Ecology

Candidate: Mgr. Lucia Bednaříková

Consultant: Ing. Lucie Cahlíková, Ph.D.

Title of Thesis: Biologically active metabolites of plants VII. Alkaloids from *Eschscholtzia californica* CHAM. and their biological activity

The aim of the thesis was to process the alkaline fraction of quaternary alkaloids in the form of their iodides from *Eschscholtzia californica* CHAM. (Papaveraceae). By means of common chromatographic methods three alkaloids were isolated in pure form and subsequently subjected to structural analysis (MS and NMR studies). The first isolated substance was a tertiary alkaloid allocryptopine, the second one was identified as a quaternary base (-)-7-*O*-methyl-etherneocaryachine-*N*-methiodide and the third one was a quaternary base californidine. All the isolated alkaloids have previously been isolated from *E. californica*.

The isolated substances were tested for their inhibitory activity against human erythrocyte acetylcholinesterase (HuAChE) and human plasma butyrylcholinesterase (HuBuChE). The measured values for allocryptopine were  $IC_{50}$  (HuAChE) =  $114.4 \pm 3.2 \mu\text{M}$  and  $IC_{50}$  (HuBuChE) =  $655 \pm 12 \mu\text{M}$ . The values for (-)-7-*O*-methyl-etherneocaryachine-*N*-methiodide were  $IC_{50}$  (HuAChE) =  $148.2 \pm 8.5 \mu\text{M}$  and  $IC_{50}$  (HuBuChE) >1000  $\mu\text{M}$ . Californidine's values were  $IC_{50}$  (HuAChE) =  $69.9 \pm 2.9 \mu\text{M}$  and  $IC_{50}$  (HuBuChE) >1000  $\mu\text{M}$ . In comparison to the used positive controls galanthamine and huperzine A the allocryptopine and (-)-7-*O*-methyl-etherneocaryachine-*N*-methiodide were only little active. Although the inhibitory activity of californidine against HuAChE was more promising the limiting factor is its quaternary structure which restricts the transport through the blood-brain barrier. Therefore none of the tested substances can be considered as a potential substance in Alzheimer's disease treatment.

All three isolated alkaloids were also subjected to studies of their antioxidant activity. The resulting  $EC_{50}$  values were higher than 1000  $\mu\text{M}$  in all cases. Therefore these substances do not show any therapeutically significant antioxidant activity.

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