

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

---

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

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

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

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

Vedoucí katedry: Prof. RNDr. Luděk Jahodář, Csc.

Hradec Králové, 15.května 2006

Dagmar Kubincová

Děkuji panu doc. RNDr. Lubomíru Opletalovi, CSc. za odborné vedení, materiály, cenné rady a připomínky při vypracování mé diplomové práce. Dále děkuji panu Mgr. Danu Junovi, Ph.D. a panu Ing. Kamilu Kučovi, Ph.D z Univerzity obrany v Brně, fakulty vojenského zdravotnictví v Hradci Králové za provedení testu vlivu mého alkaloidu na aktivitu acetylcholinesterasy a vypracování metodiky tohoto testu. Poděkovat bych také chtěla ostatním pracovníkům katedry farmaceutické botaniky a ekologie za vytvoření příjemného prostředí a vhodných podmínek k práci a jejich pomoc a ochotu při řešení problémů.

## OBSAH

<b>1.</b>	<b>ÚVOD</b>	<b>9</b>
<b>2.</b>	<b>CÍL PRÁCE</b>	<b>12</b>
<b>3.</b>	<b>TEORETICKÁ ČÁST</b>	<b>14</b>
<b>3.1.</b>	<b>ALZHEIMEROVA CHOROBA A JEJÍ TERAPIE</b>	<b>15</b>
<b>3.1.1.</b>	<b>Alzheimerova choroba</b>	<b>15</b>
<b>3.1.2.</b>	<b>Terapie AD</b>	<b>17</b>
3.1.2.1.	<i>Inhibitory mozkových choliesteras</i>	17
3.1.2.2.	<i>Antagonisté NMDA- receptorů</i>	20
<b>3.1.3.</b>	<b>Fytoterapie</b>	<b>20</b>
3.1.3.1.	<i>Látky ovlivňující osud ACh a AChE</i>	21
3.1.3.2.	<i>Inhibitory ACAT</i>	23
3.1.3.3.	<i>Látky ovlivňující produkci amyloidu</i>	23
3.1.3.4.	<i>Neuroprotektiva</i>	23
3.1.3.5.	<i>Inhibitory prolylendopeptidasy (PEPI)</i>	23
<b>3.2.</b>	<b>CHELIDONIUM MAJUS L. (VLAŠTOVIČNÍK VĚTŠÍ)</b>	<b>24</b>
<b>3.2.1.</b>	<b>Synonyma</b>	<b>25</b>
<b>3.2.2.</b>	<b>Systematika</b>	<b>25</b>
<b>3.2.3.</b>	<b>Botanický popis</b>	<b>25</b>
3.2.3.1.	<i>Původ</i>	25
3.2.3.2.	<i>Popis rostliny</i>	25
<b>3.2.4.</b>	<b>Ekologie</b>	<b>26</b>
<b>3.2.5.</b>	<b>Celkové rozšíření</b>	<b>26</b>
<b>3.2.6.</b>	<b>Rozšíření v ČR</b>	<b>27</b>

<b>3.3.</b>	<b>DROGY ZÍSKÁVANÉ Z <i>CHELIDONIUM MAJUS L.</i></b>	<b>27</b>
3.3.1.	<b>Chelidonii radix (kořen vlašovičnicku většího)</b>	<b>27</b>
3.3.2.	<b>Chelidonii herba (nať vlašovičnicku většího)</b>	<b>27</b>
<b>3.4.</b>	<b>OBSAHOVÉ LÁTKY <i>CHELIDONIUM MAJUS L.</i></b>	<b>28</b>
3.4.1.	<b>Alkaloidy</b>	<b>28</b>
3.4.1.1.	<i>Alkaloidy podle chemické struktury</i>	28
3.4.1.2.	<i>Alkaloidy kořene (Chelidonii radix)</i>	32
3.4.1.3.	<i>Alkaloidy nati (Chelidonii herba)</i>	32
3.4.1.4.	<i>Alkaloidy plodu (Chelidonii fructus)</i>	33
3.4.1.5.	<i>Alkaloidy semene (Chelidonii semen)</i>	33
3.4.2.	<b>Ostatní obsahové látky</b>	<b>34</b>
3.4.2.1.	<i>Rostlinné kyseliny</i>	34
3.4.2.2.	<i>Minoritní složky</i>	34
<b>3.5.</b>	<b>BIOLOGICKÁ AKTIVITA OBSAHOVÝCH LÁTEK</b>	<b>35</b>
<b>3.6.</b>	<b>FARMAKOLOGICKÉ ÚČINKY</b>	<b>36</b>
3.6.1.	<b>Protinádorové a antivirové působení</b>	<b>37</b>
3.6.2.	<b>Hepatotropní a spasmolytické účinky</b>	<b>38</b>
3.6.3.	<b>Biologické účinky hlavních obsahových látek</b>	<b>39</b>
3.6.3.1.	<i>Aktivita látek typu benzofenanthridinu</i>	39
3.6.3.2.	<i>Aktivita látek typu protoberberinu</i>	40
3.6.3.3.	<i>Aktivita ostatních obsahových látek</i>	41
<b>3.7.</b>	<b>VYUŽITÍ <i>CHELIDONIUM MAJUS L.</i></b>	<b>41</b>
<b>4.</b>	<b>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b>	<b>42</b>
4.1.	<b>VŠEOBECNÉ POSTUPY</b>	<b>43</b>
4.1.1.	<b>Destilace a odpařování rozpouštědel</b>	<b>43</b>
4.1.2.	<b>Chromatografie</b>	<b>43</b>
4.1.2.1.	<i>Tenkvrstvá chromatografie</i>	43

4.1.2.2. <i>Sloupcová chromatografie</i>	43
<b>4.1.3. Stanovení anticholinesterasové aktivity</b>	<b>37</b>
<b>4.2. MATERIÁL A VYBAVENÍ</b>	<b>43</b>
4.2.1. <b>Rozpouštědla</b>	<b>43</b>
4.2.2. <b>Chemikálie</b>	<b>44</b>
4.2.3. <b>Detekční činidla</b>	<b>44</b>
4.2.4. <b>Vyvíjecí soustavy pro tenkovrstvou chromatografii</b>	<b>45</b>
4.2.5. <b>Chromatografické adsorbenty</b>	<b>46</b>
<b>4.3. STANOVENÍ INHIBICE AKTIVITY ACETYLCHOLINESTERASY</b>	<b>46</b>
4.3.1. <b>Přístroje</b>	<b>46</b>
4.3.2. <b>Materiál</b>	<b>46</b>
4.3.3. <b>Příprava homogenátů</b>	<b>47</b>
4.3.4. <b>Inhibice cholinesteras</b>	<b>47</b>
4.3.5. <b>Matematické vyhodnocení experimentálních dat</b>	<b>47</b>
<b>4.4. IZOLACE</b>	<b>48</b>
4.4.1. <b>Postup extrakce alkaloidů z <i>Chelidonium majus</i> L.</b>	<b>48</b>
4.4.1.1. <i>Původ drogy</i>	48
4.4.1.2. <i>Příprava extraktu a jeho čištění</i>	48
4.4.2. <b>Výtřepok A z primárního extraktu</b>	<b>49</b>
4.4.3. <b>Výtřepok B z primárního extraktu</b>	<b>49</b>
4.4.4. <b>Výtřepok J z primárního extraktu</b>	<b>49</b>
4.4.5. <b>Výtřepok E z primárního extraktu</b>	<b>50</b>
4.4.6. <b>Zbýlý vodný extrakt</b>	<b>50</b>
<b>4.5. CHELIDONIUM MAJUS L.- SEPARACE VÝTŘEPKU B</b>	<b>50</b>
<b>4.6. CHROMATOGRAFIE VÝTŘEPKU B</b>	<b>51</b>
4.6.1. <b>Kontrolní tenkovrstvá chromatografie výtřepku B</b>	<b>51</b>
4.6.2. <b>Sloupcová chromatografie výtřepku B</b>	<b>52</b>

4.6.3.	Tenkvrstvá chromatografie jednotlivých frakcí výtřepku B	53
4.6.4.	Zpracování frakce 27-46	54
4.7.	CHARAKTERISTIKA ALKALOIDU CH-M/B-1	54
4.7.1.	Reakce s detekčními činidly	54
4.7.2.	Teplota tání	55
4.8.	VÝSLEDKY TESTU VLIVU LÁTKY CH-M/B-1 NA AKT. ACHE	55
5.	DISKUSE	56
6.	SOUHRN	61
7.	LITERATURA	63

## Zkratky

AcCoA	Acetylkoenzym A
ACAT	AcetylkoenzymA-cholesterol acyltransferasa
AD	Alzheimerova choroba
ACh	Acetylcholin
AChE	Acetylcholinesterasa
ATP	Adenosintrifosfát
BuChE	Butyrylcholinesterasa
CAT	Cholinacetyltransferasa
CNS	Centrální nervová soustava
COX-2	Cyklooxygenasa-2
CT	Počítačová tomografie
EBM	Medicína založená na důkazech
GIT	Gastrointestinální trakt
HPLC	Vysokokapacitní kapalinová chromatografie
Hup A	Huperzin A
IC <sub>50</sub>	Inhibiční koncentrace 50% enzymu
ICP	Inductively coupled plasma
IgG	Imunoglobulin G
IL-1b	Interleukin-1b
IL-6	Interleukin-6
iNOS	Induktibilní NO- synthasa
KBA	Kvartérní benzo[c]fenanthridinové alkaloidy

LD <sub>50</sub>	Letální dávka u 50 % jedinců
5-, 12- LOX	5-, 12- lipooxygenasa
LPS	Lipopolysacharid
MRI	Magnetická rezonance
MS	Hmotnostní spektrometrie
NGF	Nervový růstový faktor
NMDA-receptor	N-methyl-D-aspártátový receptor
NO	Oxid dusnatý
PAF	Destičkový aktivační faktor
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandin E <sub>2</sub>
PEP	Serinové peptidasy
PET	Pozitronová emisní tomografie
SFE	Superkritická fluidní extrakce
TNF $\alpha$	Tumor nekrotizující faktor alfa
TRH	Thyreotropin-releasing hormon



## **1. ÚVOD**

V posledních 50ti letech stoupá počet onemocnění, které byly dříve považovány za ojedinělé až vzácné. Za tento trend je ve velké míře odpovědný rozvoj zdravotnictví a vědeckých poznatků na poli výzkumu chorob, jejich podstaty a léčby. Zvyšuje se průměrný věk obyvatelstva, přežívají lidé dříve nevyлéčitelně nemocní. Tu právě dostávají prostor onemocnění, napadající člověka, který je zmožen vysokým pracovním tempem, neustálým shonem, a stresem, se špatnou životosprávou a často minimálním pohybem. U člověka žijícího v civilizaci ve větší míře vyskytuje stres, svalové napětí, špatný krevní oběh, nervozita, bolesti hlavy a páteře, špatné trávení a bolesti žaludku, celková únava.

K civilizačním chorobám patří řada zdánlivě nesouvisejících nemocí, jsou to např.: cukrovka, obezita, vysoký krevní tlak, ateroskleróza a jiná kardiovaskulární onemocnění, zhoubné nádorové bujení, některé vývojové vady nervového systému novorozenců, deprese, chronický únavový syndrom, revmatická onemocnění kloubů. V neposlední řadě se k civilizačním chorobám řadí i demence. Nejčastější formou demence je Alzheimerova choroba, která se řadí mezi neurodegenerativní onemocnění.

Neurodegenerativní choroby postihují centrální i periferní nervový systém, přičemž dochází k předčasnému zániku nebo degeneraci nervových buněk. K neurodegenerativním onemocněním se řadí: <sup>1</sup>

**Parkinsonova nemoc:** prevalence Parkinsonovy nemoci se odhaduje asi na 160/100 000 a incidence na 20/100 000 obyvatel. Tyto hodnoty stoupají s věkem, nad 65 let je prevalence už 1 000/100 000 obyvatel. V České republice se odhaduje počet nemocných na 10 000 - 15 000.<sup>2</sup> Parkinsonova nemoc je způsobena nedostatkem dopaminu, a tedy relativní převahou acetylcholinové stimulace. Pacienti trpí svalovou ztuhlostí, zpomalením pohybů a třesem, zejména horních končetin. Charakteristické jsou drobné krůčky při chůzi a nestabilita postojů, později i časté pády. Dále se přidávají i psychické komplikace, jako jsou psychózy, deprese, demence. V současné době je nemoc nevyлéčitelná, existuje však celá řada léků, které příznivě ovlivňují příznaky onemocnění. Lékem volby je L-DOPA, podává se spolu s inhibitory DOPA-dekarboxylasy v různých kombinacích.

**Amyotrofická laterální skleróza (ALS),** kde dochází k zániku centrálního i periferního (míšního) motoneuronu, s postupným oslabením svalstva končetin, polykacího reflexu. Čítí i intelekt jsou ale netknuty.

**Dyskinetické syndromy** jsou poruchy extrapyramidového systému, charakterizované abnormálními pohyby hlavy, končetin a trupu, vymykající se volní kontrole. Hlavní typy

představují: Huntingtonova chorea, myoklonus (svalové záškuby), třes (esenciální, při Parkinsonově chorobě, blefarospasmus, torticollis).

**Alzheimerova nemoc (AD):** Alzheimerova choroba je nejčastěji se vyskytující neurodegenerativní choroba na světě. Patří mezi civilizační onemocnění, více je postiženo obyvatelstvo rozvojových zemí. Je to onemocnění projevující se ztrátou cholinergních neuronu a postupnou degenerací nervových funkcí. Existuje více názorů na to, čím je nemoc způsobena, dle toho se v praxi užívají různé léčebné postupy.

Prvními příznaky Alzheimerovy choroby bývají zpravidla poruchy paměti, řeči, zhoršená orientace v prostoru a čase. Při rozvoji nemoci můžeme u člověka sledovat problémy, které mu nedovolí vykonávat běžné každodenní činnosti. Postižený není schopen číst, psát, počítat, objevují se poruchy chování, bludy a halucinace. Nemoc se postupně zhoršuje až člověk ztratí všechny schopnosti potřebné k soběstačnosti a je plně závislý na okolí.

Předpokládá se, že stěžejní roli při tomto onemocnění hrají cholinesterasy (acetylcholinesterasa a butyrylcholinesterasa), enzymy rozkládající acetylcholin v neuronové štěrbině. Jednou z velmi perspektivních cest léčby je tedy ovlivnění aktivity těchto enzymů ve smyslu jejich inhibice a tím prodloužení životnosti acetylcholinu.

Na katedře farmaceutické botaniky a ekologie probíhá výzkum v oblasti přírodních látek. Velká pozornost je věnována izolaci látek potenciálně účinných v inhibici acetylcholinesterasy. Studují se i rostliny z čeledi Papaveraceae, Fumariaceae. Jednou z rostlin z čeledi Papaveraceae o které je známo, že její obsahové látky ovlivňují acetylcholinesterasu, je *Chelidonium majus* L. V další fázi se pracovníci katedry podílejí i na testování inhibičních účinků přírodních látek *in vivo* (na homogenátu z mozkové tkáně) ve spolupráci s fakultou vojenského zdravotnictví v Hradci Králové, Univerzity obrany v Brně.

## **2. CÍL PRÁCE**

Cílem mé diplomové práce bylo společně s ostatními diplomantkami (Šárkou Brožovou, Janou Nagyovou a Evou Vítkovou):

1. provést extrakci 41,8 kg suché nati s kořeny pomocí perkolátoru. Poté tento získaný primární extrakt vyčistit filtrací a následným oddestilováním rozpouštědla na vakuové odparce. Dále bylo nutno připravit sekvenčním postupem výtřepky s jednotlivými typy alkaloidů: šlo o dva diethyletherové výtřepky (získané po předchozí alkalizaci primárního extraktu uhličitanem sodným a hydroxidem draselným), které byly následně okyseleny kyselinou chlorovodíkovou, vzniklé kvartérní jodidy po přidání jodidu draselného vytřepány chloroformem a po následné alkalizaci extraktu amoniakem získány další kvartérní jodidy vytřepáním do směsi chloroform + ethanol 8,5:1,5,
2. zpracovat část diethyletherového výtřepku připraveného vytřepáním primárního extraktu roztokem uhličitanu sodného s cílem izolovat jeden alkaloid v čisté formě, stanovit jeho základní fyzikálně-chemické charakteristiky,
3. podílet se na stanovení aktivity vůči acetylcholinesterase (na homogenátu z mozku) *in vitro*.

### **3. TEORETICKÁ ČÁST**

### **3.1. ALZHEIMEROVA CHOROBA A JEJÍ TERAPIE**

#### **3.1.1. Alzheimerova choroba**

Alzheimerova choroba je nejčastější příčinou demence. Je to jedna z nejzávažnějších chorob vůbec, pokud se týká snížení kvality života nemocných i následků, včetně úmrtnosti a ekonomické zátěže.<sup>3</sup>

Alzheimerova choroba je primárně degenerativní onemocnění mozku. Projevuje se především poruchami paměti a intelektu. Představuje asi 50-60 % všech demencí. Začíná nenápadně a zvolna progreduje. Prvními příznaky jsou poruchy učení, paměti, řeči, ztráta schopnosti řešit běžné denní úkoly, zhoršená orientace v čase a prostoru, změny osobnosti, nálady, chování. Stav se postupně zhoršuje, až dochází k naprosté ztrátě soběstačnosti a plné závislosti na okolí.<sup>4</sup>

Alzheimerova choroba vzniká především u lidí staršího věku. Onemocnění začíná mezi 50. - 70. rokem života s nejčastějším začátkem kolem 60 let věku. Do 60 let se v literatuře hovoří o Alzheimerově chorobě, po 60. roce o senilní demenci Alzheimerova typu. Ve skupině 65letých je postiženo zhruba 2-3% populace, každých 5 let se toto procento zdvojnásobuje. Ve věku 80 let je postižena asi polovina lidí. Existují ale i vzácnější formy s časným začátkem vzniku, např. již kolem 40. - 50. roku, pak se jedná o presenilní demenci Alzheimerova typu. V současné době se odhaduje, že je ve světě kolem 20 miliónů lidí, trpících Alzheimerovou chorobou. V České republice se počet postižených odhaduje na cca 80 000.<sup>4</sup>

Dodnes nejsou přesné příčiny vzniku Alzheimerovy choroby známy. Kromě věku jsou prokázány rizikovými faktory vývoje AD genetická zátěž a nosičství alely ApoE e4. Dále existují faktory, které zvyšují riziko výskytu Alzheimerovy choroby a to: věk, hormony, dědičnost, časté pády a údery, postižení Downovým syndromem, nízký stupeň dosaženého vzdělání.

AD se projevuje ve 3 stádiích: 1. stádium je mírná forma (lehká demence) trvající 2-4 roky, pacient často ztrácí věci, zabloudí na známých místech, dochází ke změnám osobnosti, podezřívavosti, dezorientaci a obtížnému hledání slov, mohou se projevit i první známky deprese. 2. stádium je forma středně těžká trvající 5-10 let, zhoršují se mentální funkce, dochází k výrazným výpadkům paměti, poruchám chování, nesnášenlivosti, hašteřivosti, zhoršení řečové schopnosti a halucinacím. Tento stav vyžaduje trvalý dohled. 3. stádium už je těžkou formou, která trvá 1-3 roky, kdy je pacient plně závislý na pečovateli, dochází

k rozkladu celé osobnosti, člověk není schopen poznat ani členy rodiny, trpí inkontinencí, poruchami v příjmu potravy, má sklon k podvýživě, infekcím a proleženinám.

Etiologie AD je neznámá. Klinicky se AD diagnostikuje obtížně, na základě sledování kognitivních funkcí a změn v chování. K odlišení od jiných typů demence se začínají používat moderní zobrazovací metody (CT, MR, PET) a sledování biochemických markerů. Histopatologické změny vzniklé v mozku pacientů s AD jsou prokazatelné většinou až *post mortem* a patří k nim:

- extracelulární beta-amyloidní plaky a intraneuronální neurofibrilární uzlíky
- snížené množství acetylcholinu (ACh) a cholinacetyltransferasy (CAT)
- změny vyvolané nadměrnou tvorbou reaktivních forem kyslíku (ROS) a oxidačním stresem

Molekulární mechanismy vedoucí k těmto změnám jsou ve velké míře objasněny, ale vzájemné vztahy mezi nimi nikoliv.<sup>5</sup>

U Alzheimerovy demence je podezření na genetický podklad choroby s úzkým vztahem k chromozómu 21, na jehož dlouhém raménku se nachází gen odpovědný za tvorbu bílkovinného prekurzoru amyloidu, který senacházejícího se u Alzheimerovy demence. To nabádá k úvahám o genetické příbuznosti s Downovým syndromem. Jde o systémové postižení celého organismu, nikoliv jen mozku. U Alzheimerovy demence se nachází řada abnormit ve stavbě erytrocytů, trombocytů, leukocytů, ale i fibroblastů. Zatím se nepodařilo prokázat žádný externí agens typu toxinu nebo viru, který by Alzheimerovu demenci působil.

Vlivem různých faktorů, jako jsou zánětlivé změny, toxiny, faktory životního prostředí, defektní gen pro amyloidní prekurzorový protein (presenilin 1 a 2) dochází k tomu, že vlákna amyloidu reagují s receptory na povrchu buněk. Ty pak ve zvýšené míře tvoří kyslíkové radikály, které způsobují depolarizaci buněčné membrány a tím zvýšení hladiny  $Ca^{2+}$  uvnitř buňky. Zvýšená koncentrace vápníkových iontů spolu s kyslíkovými radikály pak způsobí smrt buňky. Stimulace mikroglíí vede ke zvýšenému uvolňování NO, prostaglandinů, excitotoxinů, cytokinů, TNF- $\alpha$ . Vzniklý zánět také postihuje neuron. Zánik neuronů může být urychlen i nedostatkem NGF. Zánik neuronů následně vede ke snížené tvorbě a tím pádem nedostatku neurotransmiterů v mozku. Při Alzheimerově chorobě se to týká acetylcholinu - v mozku se snižuje koncentrace CAT (enzym potřebný k tvorbě ACh), dále také klesají koncentrace ostatních neurotransmiterů, např. noradrenalinu, somatotropinu, serotoninu, neuropeptidu Y a substance P.<sup>6</sup>



### 3.1.2. Terapie AD

V současné době ještě není etiologie AD zcela objasněna, proto se v terapii vychází ze známých etiologických řetězců. Nejrozšířenějším typem léčby je farmakoterapie, zaměřená především na zlepšení výkonných a paměťových funkcí. V současné době jsou založeny na důkazech (EBM) dva farmaterapeutické přístupy:

- užití inhibitorů cholinesteras
- užití parciálních nekompetitivních inhibitorů NMDA receptorů excitačních aminokyselin.<sup>3,7</sup>

#### 3.1.2.1. Inhibitory mozkových cholinesteras

Užití inhibitorů mozkových cholinesteras je nejčastěji užívaný postup v terapii lehkých a středně závažných forem AD. Tyto látky patří do skupiny kognitiv, protože zlepšují pozornost a paměťové schopnosti především svým cholinomimetickým působením, případně dalšími účinky.<sup>8</sup>

U AD je porušena především presynaptická část acetylcholinergního neuronu. Je snížena aktivita enzymu CAT, syntetizujícího acetylcholin z cholinu a z acetyl-koenzymu A.<sup>5</sup> Nižší je také tzv. vysoko afinitní natrium- dependentní cholinový uptake, a tedy nabídka substrátu pro syntézu acetylcholinu.<sup>3</sup> Pre- i postsynaptické muskarinové i nikotinové receptory zůstávají relativně dobře zachovány. U AD je sníženo uvolnění ACh z presynaptických zakončení. Toto uvolnění je usnadňováno stimulací nikotinových presynaptických receptorů. Po uvolnění z vazby na receptory je ACh odbouráván acetylcholinesterasami a u AD i butyrylcholinestrasami.

Acetylcholinesterasy se vyskytují v několika různých formách; v mozku zdravého člověka převládá tetramerní forma G 4, pouze v malém množství se vyskytuje monomerní forma G 1. V mozku člověka s AD roste podíl G 1 a klesá množství G 4.<sup>9</sup> Navíc v mozku s AD se uplatňuje i další enzym, za normálních podmínek minoritní: butyrylcholinesterasa. Ta je totiž produkována aktivovanými gliemi v oblastech neuritových plaků a podílí se na odbourávání Ach. V případě mozku s AD se podíl molekul BuChE progresivně zvyšuje, zatímco aktivita (a množství) AChE zůstává nezměněna, resp. se snižuje.<sup>7,10</sup>

AChE a BuChE jsou odlišeny geneticky, strukturně a také reakční kinetikou. V lidském mozku se BuChE nachází v neuronech, gliových buňkách, stejně tak jako v neuritovém plaku a tangles u pacientů s AD. Zatímco acetylcholinová aktivita snižuje

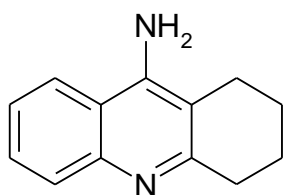
progresivitu AD v mozku nemocných pacientů, BuChE aktivita může zvýšit progresivitu, záleží však na dalších faktorech. Na základě různých modelů (a u pacientů s pokročilou AD) se však zdá, že BuChE může určitou měrou nahradit AChE při hydrolýze mozkového acetylcholinu.<sup>11</sup> BuChE se ukázala novým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

Inhibitory acetylcholinesteras jsou chemicky nestejnorodou skupinou. Jednotlivé inhibitory se liší typem inhibice, mírou inhibice, a také tím, zda kromě AChE odbourávají ve větší míře i BuChE. V současnosti je spektrum klinicky použitelných látek relativně úzké.<sup>12,13,14</sup> Liší se selektivitou inhibice jednotlivých cholinesteras. Např. donepezil a ikopenezil jsou selektivní vůči AChE, takrin a heptylfysostigmin mají vysokou selektivitu k BuChE; všechny 4 sloučeniny zvyšují hladinu Ach v myším mozku. Donepezil a ikopenezil mají výhodnější terapeutický index než neselektivní inhibitory takrin a heptylfysostigmin (z hlediska posouzení centrálních a periferních účinků).<sup>12</sup> Atraktivní skupinou látek se zdají být léčiva s duálním účinkem- inhibitory AChE (např. galanthamin) a serotoninové transportery, např.<sup>15,16</sup>

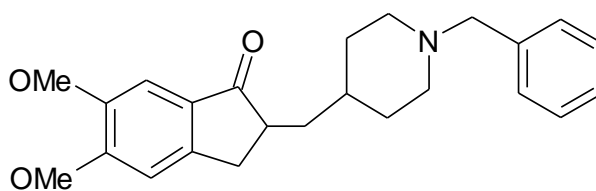
V České republice jsou prakticky používané 3 inhibitory AChE: donepezil, rivastigmin, galanthamin.<sup>5</sup>

Inhibitory AChE se dělí podle typu inhibice:

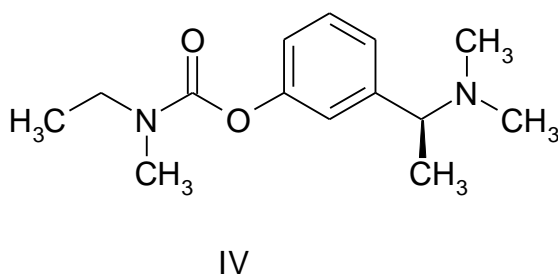
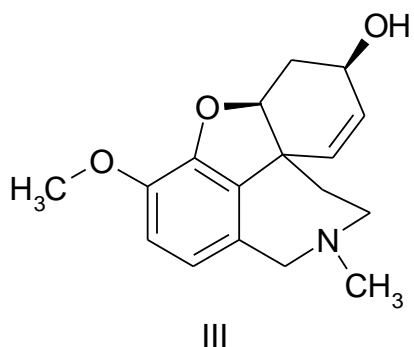
- reverzibilní AChE inhibitory- **takrin** (I) (Cognex®), **donepezil** (II) (Aricept®), **galanthamin** (III) (Reminyl®)
- pseudoirreverzibilní AChE inhibitory- **rivastigmin** (IV) (Exelon®)
- irreverzibilní- metrifonát (dichlorvos), který se v praxi neuzívá<sup>5</sup>



I



II



**Galanthamin (Reminyl®)** – terciární alkaloidní acetylcholinesterasový inhibitor. Je uznáván v mnoha zemích jako prostředek k symptomatické léčbě senilní demence Alzheimerova typu. Získává se z hlíz a cibulí rostlin čeledi Amaryllidaceae a byl dlouho užíván v anestézii ke zrušení neuromuskulární paralýzy vyvolané tubokurarinem. Galanthamin je reverzibilní selektivní kompetitivní inhibitor AChE, v mnohem menší míře inhibuje i činnost BuChE. Navíc stimuluje pre- i postsynaptické nikotinové receptory, nejspíš vazbou na allosterické místo receptoru. Aktivace presynaptických nikotinových receptorů vede ke zvýšenému uvolňování ACh, ale i glutamátu, serotoninu a GABA. Dlouhodobé podávání galanthaminu navozuje zvýšení denzity nikotinových receptorů v určitých oblastech mozku, které se podílejí na paměti a procesu učení<sup>17</sup>. Do jaké míry je za klinický účinek galanthaminu odpovědný nikotinový efekt není jisté, je nutné provést další výzkumy.<sup>18</sup> V současnosti je hlavní uplatnění galanthaminu v terapii Alzheimerovy choroby (AD). Zlepšuje kognitivní, funkční i behaviorální symptomy této choroby. Výhodou galanthaminu proti ostatním inhibitorům AChE používaných v terapii AD je tedy jednak jeho schopnost interagovat s nikotinovými receptory, a také selektivně inhibovat AChE bez ovlivnění plazmatické butyrylcholinesterasy. Tato selektivita galanthaminu k AChE může snižovat riziko nežádoucích účinků při porovnání galanthaminu s neselektivními inhibitory cholinesteras (např. fysostigmin nebo takrin). Byly vyvinuty i četné analogy galanthaminu, lišící se velikostí inhibiční aktivity vůči AChE.<sup>19</sup> Po p.o. podání se galanthamin rychle vstřebává, Tmax dosahuje za 52 minut, eliminační poločas je 5,7 hod. Účinnost galanthaminu v léčbě AD byla prokázána řadou rozsáhlých klinických zkoušek.<sup>20</sup>

**Rivastigmin (Exelon®)** – je inhibitor AChE a BuChE karbamátového typu. Kovalentní vazbou na cílový enzym vzniká komplex enzym-inhibitor, který je posléze cholinesterasou rozkládán na dekarbamoylovaný metabolit. Rivastigmin je pseudoreverzibilní inhibitor.<sup>5</sup> Afinita rivastigminu k BuChE je 10krát nižší než k AChE.<sup>21</sup>

**Donepezil (Aricept®)** je selektivní, reversibilní inhibitor AChE. Je 1 000krát účinnější inhibitor AChE než inhibitor BuChE (která se vyskytuje hlavně mimo CNS). Klinické studie prokázaly, že podání donepezilu vede k inhibici AChE v erytrocytech o 63,6% (pro dávku 5 mg) a 77,3% (pro 10 mg/den). Inhibiční aktivita donepezilu silně koreluje se změnami v ADAS-cog, což je jeden z hodnotících testů AD (měřítko kognitivních funkcí). Aricept způsobil na dávce závislé signifikantní statistické zvýšení procenta nemocných, kteří byli vyhodnoceni jako respondéři na léčbu.<sup>20</sup>

### 3.1.2.2. Antagonisté NMDA- receptorů

Nekompetitivní antagonisté NMDA- glutamátových receptorů potlačují neurotoxicitu excitačních aminokyselin a tím chrání kortikální neurony a neurony v retinálních gangliích. Zatím jedinou klinicky používanou látkou z této skupiny je **memantin** (Exiba®). Memantin je registrován v některých evropských zemích, např. v Německu je již 10 let registrován pro léčení „syndromu demence“ a je do něj vkládána značná naděje. Kombinace memantin+ AChE inhibitory přináší v léčbě významný profit.<sup>7</sup>

### 3.1.3. Fytoterapie AD

V současné době je ve farmakoterapii AD perspektivní užití některých přírodních látek. Velmi významnou roli hraje studium přírodních látek proto, že struktura těchto poměrně složitých molekul významně modifikuje účinek nejen ve smyslu vlastního efektu, ale především vedlejších účinků. Inhibice AChE byla pozorována např. u obsahových látek z Tea Tree Oil<sup>22</sup>, steroidních alkaloidů ze *Sarcococca saligna* (Buxaceae)<sup>23</sup>,  $\alpha$ -onocerinu z *Lycopodium clavatum* (Lycopodiaceae).<sup>24</sup> Velmi významné je však studium (resp. použití) alkaloidů především isochinolinového typu vyskytujících se v různých zdrojích: zástupcích čeledi Amaryllidaceae: galanthaminu a jeho současných derivátů<sup>25,26,27,28</sup> a chinolinové baze z čeledi Lycopodiaceae, jako je huperzin A a jeho deriváty<sup>29,30,31,32</sup>. U některých přírodních látek byla pozorována spřažená aktivita: inhibují jak AChE tak BuChE.<sup>23,33</sup> Při syntéze

nových léčiv tohoto typu je velmi zásadní stereochemie- terapeuticky významně aktivní jsou pouze některé stereoizomery<sup>34</sup> (a tento stav se uplatňuje i z hlediska ovlivnění AChE a BuChE, jak je to vidět např. u stereoizomerů huperzinu A<sup>33</sup>). Tento faktor musí být zohledněn, protože jinak dochází v řadě případů k výraznému vzestupu nežádoucích účinků.

### 3.1.3.1. Látky ovlivňující osud ACh a AChE

- Antagonisté muskarinových M<sub>2</sub> receptorů: **himbacin** (*Galbulimima baccata*, Himantandraceae) je vysoce selektivní inhibitor M<sub>2</sub> receptorů, způsobuje neuronovou excitaci.
- Stimulátory nikotinových receptorů (nAChERs): **galanthamin**, **arekolin** a některé jeho analogy (provedeny studie *in vitro*)
- Látky jiného působení: **N- acetyl- L- karnitin** usnadňuje vstup prekurzoru ACh do neuronu, tím dochází ke zvýšené syntéze ACh. Pozitivně ovlivňuje nervový růstový faktor, působí proti úbytku glukokortikoidních receptorů (způsobeném stářím), zlepšuje pozornost a zvyšuje bdělost. U familiární AD výrazně zpomaluje progresi choroby.
- Inhibitory AChE:

a) **Galanthamin** (*Galanthus woronovii*, *Narcissus sp.*) je duální inhibitor, přičemž na BuChE má mnohem slabší efekt než na AChE. Je pacienty dobře snášen, vyskytují se určité periferní cholinergní účinky (nauzea, zvracení, průjem). Vykazuje 4x větší aktivitu než alkaloidy lykorinového typu a je podstatně účinnější než takrin. Deriváty galanthaminu jsou selektivní inhibitory AChE v centrální nervové soustavě, z čehož plyne i výrazně nižší výskyt některých vedlejších účinků. Mezi deriváty galanthaminu patří: karbamáty 6-demethylgalanthaminu (DMG), jsou 1000krát účinnější než galanthamin v inhibici AChEI; estery 6-demethylgalanthaminu, které jsou prodrug 6-DMG (acetát a oktanoát vykazují selektivní inhibici AChE v centrální nervové soustavě).<sup>5</sup>

b) **Huperzin** (Cerebra®) (*Huperzia serrata*, Lycopodiaceae) je dlouhodobě působící inhibitor AChE, vykazuje neuroprotektivní aktivitu a kognitivní efekt. Splňuje ideální kritéria pro symptomatickou léčbu Alzheimerovy nemoci. Byly izolovány 2 optické izomery: (-)-HupA je přibližně 38krát účinnější než (+)-HupA; LD<sub>50</sub> je 4,6 mg p.o., 3,0 mg s.c.(myš), aplikace 0,1mg p.o. (člověk). Je vypracována syntéza racemátu i přírodního (-)-HupA.<sup>19</sup>

c) **Salignenamid C** (*Sarcococca saligna*, Buxaceae) výrazněji zasahuje do BuChE aktivity.<sup>19</sup>

d) **Zeatin** (*Fiatoua villosa*, Orchideaceae, *Zea mays*, Poaceae) je obsažen v hospodářských rostlinách. Zeatin je přírodní cytokin, široce rozšířen. IC<sub>50</sub> je 1,9.10<sup>-4</sup>M. Navíc také inhibuje tvorbu β-amyloidu.<sup>19</sup>

e) **Dekrusinol** (*Angelica gigas*, Apiaceae) vykazuje vysokou inhibiční aktivitu vůči AChE *in vitro*.<sup>19</sup>

f) **Ursolová kyselina** (*Majorana hortensis*, *Rosmarinus officinalis*, *Salvia officinalis*, Lamiaceae) má vysoký inhibiční efekt vůči AChE.<sup>19</sup>

g) **Arisugaciny** (meroterpenoidy): zástupcem je arisugacin A (*Penicillium sp.*, IC<sub>50</sub> 1.10<sup>-6</sup>M). Byla provedena jeho totální syntéza. Dále sem patří: arisugacin B (IC<sub>50</sub> 25,8.10<sup>-6</sup>M) a cyklofostin (*Penicillium* WK-4164 e FO-4259), který ovlivňuje také BuChE.<sup>19</sup>

h) **Dehydroevodiamin** (*Evodia rutaecarpa*, Rutaceae) inhibuje AChE a má antiamnestický efekt. IC<sub>50</sub> je 37,8.10<sup>-3</sup>M. Je silnější než takrin. Působí navíc zvýšením vasodilatace.<sup>19</sup>

ch) (+)-**Homomoenjodaramin, moenjodaramin** (*Buxus hyrcana*, Buxaceae).<sup>19</sup>

i) **Cykloprotobuxin C, Cyklovirobuxein A, Cykolmikrofilin A** (*Buxus papillosa*, Buxaceae).<sup>19</sup>

j) **α-Onocerin** (*Ononis spinosa*, Fabaceae).<sup>19</sup>

k) **α-Viniferin** (*Caragana chamiague*, Fabaceae) je inhibitor reversibilní, nekompetitivní a vykazuje specifickou aktivitu.<sup>19</sup>

l) **Cynatrosidy A, B, C** (*Cynanchum atratum*, Ranunculaceae) vykazují signifikantní inhibici AChE. Patří sem: A-β-D-oleandropyranosid

B-cymaropyranosyl-digitoxopyranosyl-β-D-oleandropyranosid-nejúčinnější

## C- cymaropyranosyl-digitoxopyranosyl- $\alpha$ -D-oleandropyranosid.<sup>19</sup>

### 3.1.3.2. *Inhibitory ACAT*

ACAT je integrovaný membránový enzym, lokalizovaný v endoplazmatickém retikulu. Katalyzuje vznik esterů z cholesterolu a AcCoA. Inhibice ACAT má za následek pokles hladin LDL-cholesterolu, a tím přímý antiaterogenní účinek<sup>35</sup>. Inhibitor ACAT je:

- **Pyripyropen A** (*Aspergillus fumigatus*).<sup>19</sup>

### 3.1.3.3. *Látky ovlivňující produkci amyloidu*

- **Tanshinon I** (*Salvia miltiorrhiza*, Lamiaceae).<sup>19</sup>

### 3.1.3.4. *Neuroprotektiva*

- **Ginkgolid B** (BN-520121, *Ginkgo biloba*, Ginkgoaceae; Ipsen-Beaufour) je antagonist PAF, používaný také k léčbě septického šoku. Chrání neurony při mozkové hypoxii (potřeba nižší tenze kyslíku), snižuje viskozitu krve. V současnosti je reálná i totální syntéza této molekuly.<sup>19</sup>

### 3.1.3.5. *Inhibitory prolylendopeptidasy (PEPI)*

PEP (serinové peptidasy) jsou široce rozšířeny v různých tkáních, také v lidském mozku, kde hydrolyzují neuropeptidy s obsahem prolinu, které se podílejí na učení a paměťových procesech (vasopresin, substance P, TRH). Zvýšená hladina je pozorována u neurodegenerativních chorob, jako je výrazná deprese, mánie, demence Alzheimerova typu. PEP jsou patrně odpovědné za metabolismus C-terminální části amyloidního prekurzorového proteinu, zodpovědného za degeneraci neuronů. Dále PEP také navozuje imunoreaktivitu, důsledkem je pak rychlejší stárnutí mozku. Inhibitory PEP mají anti-amnestický efekt.

- **Fenanthrenové deriváty** (*Salvia deserta*, Lamiaceae).<sup>19</sup>

Jednou z rostlin, která je v současnosti zkoumána pro své anticholinesterasové účinky je *Chelidonium majus* L. (Papaveraceae).

3.2. *CHELIDONIUM MAJUS* L. (VLAŠTOVIČNÍK VĚTŠÍ)



Obrázek 1: *Chelidonium majus* L.<sup>36</sup>



Obrázek 2: *Chelidonium majus* L., květ<sup>36</sup>



### 3.2.1. Synonyma

*Chelidonium grandiflorum* DC.; *Chelidonium haematodes* MOENCH;  
*Chelidonium japonicum* THUNB.; *Chelidonium laciniatum* MILL.; *Chelidonium luteum*  
GILIB.; *Chelidonium maius* L.; *Chelidonium murale* REN.; *Chelidonium ruderales* SALISB.;  
*Chelidonium umbelliferum* STOCK.<sup>37</sup>

### 3.2.2. Systematika

*Chelidonium majus* L. (vlaštovičník větší) je rostlinný druh z čeledi Papaveraceae (makovité).<sup>38</sup>

### 3.2.3. Botanický popis

#### 3.2.3.1. Původ

Vlaštovičník větší (*Chelidonium majus*) je druh z čeledi makovitých (*Papaveraceae*). Běžně rozšířen po celé Evropě, ve středomoří a v mírných až subarktických oblastech Asie. Zavlečen byl i do Severní Ameriky.<sup>38</sup>

#### 3.2.3.2. Popis rostliny

Je to vytrvalá bylina, 30-110 cm vysoká, s oblými, větvenými, roztroušeně chlupatými lodyhami.<sup>38, 39</sup> Má krátký, rozvětvený oddenek. Celá rostlina je protkána mléčnicemi se žlutým až oranžovým mlékem. Listy střídavé, přizemní i stonkové jednotvaré, dolní řapíkaté, horní přisedlé, přetrhovaně zpeřené.<sup>38</sup> Lístky vejčité, laločnatě vroubkované, terminální často trojlaločný. Listy na svrchní straně modrozelené, lysé, na spodní straně světlejší, zvláště na žilnatině roztroušeně chlupaté.<sup>39</sup> Květy stopkaté, v chudém okolíku (2-6 květů). Jsou oboupohlavné, zdánlivě pravidelné, žluté, 1-2 cm v průměru.<sup>38</sup> Kalich prchavý, korunní lístky 4, celokrajné, tyčinky žluté s kyjovitě ztlustlými nitkami. Plody jsou 3-8 cm dlouhé tobolky, kostrbaté, čárkovité, otvírají se od base k vrcholku dvěma chlopněmi.<sup>39</sup> Semena až 1,5 mm dlouhá, vejčitás hřebenitým přívěskem, černá. Kvete v květnu až září.<sup>38</sup>

Jde o jediný druh se 3-4 poddruhy, dle některé starší literatury považovanými za samostatné druhy<sup>37</sup>:

- var. *crenatum* FRIES: korunní lístky vroubkované; blizna dlouhá, otáčivá; u této variety musíme vzít v úvahu křížení mezi var. *maius* a var. *tenuifolium*

- var. *fumariifolium* (DC.) KOCH (syn. *Chelidonium laciniatum* MILL. var. *fumariaefolium* DC.): menšího vzrůstu, listy se zkrácenými řapíky

- var. *maius* listy poměrně pevné, čepele jen málo řezané, vroubkované, matné, všechny směřující dolů, nanejvýš ty nejspodnější postavené. Korunní lístky celokrajné. Podle toho může být *Chelidonium* označeno: - f. *grandiflorum* WEIN; - f. *latipelatum* MOLL.; - f. *loehrianum* (ORTH) MGF. (syn. *Chelidonium majus* L. var. *laciniatum* (MILL.) KOCH f. *serrata* (ORTH) FAST, *Chelidonium majus* L. var. *loehriana* ORTH, *Chelidonium majus* var. *serrata* ORTH); - f. *pleniflorum* CHRISTIANSEN (Syn. *Chelidonium majus* L. var. *pleniflorum* LAW.); - f. *semiplenum* DOMIN. Rozdělení var. *maius* do různých forem přesto zůstává sporné.<sup>37</sup>

- var. *tenuiflorum* LILJ. (syn. *Chelidonium laciniatum* MILL., *Chelidonium majus* L. var. *laciniatum* (MILL.) KOCH, *Chelidonium majus* L. var. *quercifolium* T HUIILL)<sup>39</sup>: rostliny s dřípenými listy a s dřípenými nebo vroubkovanými (vzácně jen špičatými) korunními lístky. U nás je tato varieta doložena pouze z botanických zahrad nebo zplanělá v jejich okolí. Odchytky ve vzrůstu, velikosti květů a odění stopek a kalichů mají nepatrnou taxonomickou hodnotu.<sup>39</sup>

Také existují různé karyotypy: V Evropě a Asii jsou diploidní (mají 12 chromozomů- $2n=12$ , ve východní Evropě  $2n=10$ , v Japonsku  $2n=20$ ). V České republice se volně vyskytují rostliny diploidní ( $2n=12$ ). V Polsku se vyskytuje i tetraploidní šlechtitelská odrůda, kdy  $2n=24$ . Tato kultura se nazývá *Chelidonium majus* L. cv. „Cynober“.<sup>37</sup>

### 3.2.4. Ekologie

Vlaštovičnický roste na návších, v zahradách a rumišťích, na okrajích cest, v humózních hájích a sutích, na mírně zastíněných, vlhkých a dusíkem bohatých půdách.<sup>39</sup>

### 3.2.5. Celkové rozšíření

Jižní a střední Evropa, jižní Skandinávie; mírné až subarktické pásmo Asie včetně Japonska a střední Číny. Zavlčen do Severní Ameriky.<sup>39</sup>

### 3.2.6. Rozšíření v ČR

V termofytiku a mezofytiku obecný až roztroušený, v oreofytiku vzácný. Těžiště výskytu v planárním a kolinním stupni, vzácně zasahuje až do stupně submontánního (max. Krkonoše, Obří důl, 850 m).<sup>39</sup>

## 3.3. DROGY ZÍSKÁVANÉ Z *CHELIDONIUM MAJUS* L.

### 3.3.1. *Chelidonii radix* (kořen vlaštovičnicku většího)

- Droga se získává sběrem volně rostoucích rostlin nebo sběrem rostlin pěstovaných. V Polsku se pěstují vysoce výnosné sazenice *Chelidonium majus* L. cv. „Cynober“.<sup>37</sup>
- Droga se užívá sušená.

### 3.3.2. *Chelidonii herba* (nat' vlaštovičnicku většího)

- Droga se získává sběrem: volně rostoucích rostlin; v Polsku z pěstované šlechtitelské odrůdy „Cynober“
- V současnosti se upřednostňuje používání sušené drogy (*Chelidonii herba*). Důležitý je fakt, že obsah alkaloidů může kolísat dle podmínek sušení. Vhodné je krátké zahřátí na 105 °C s následným sušením při pokojové teplotě, či při 60 °C. Zřetelně nižší obsah alkaloidů je získáván, pokud se suší jen při pokojové teplotě, či při 60 °C bez předchozího zahřátí na 105 °C. Základem pro tento poznatek je, že zahřátí přes 100 °C inaktivuje enzymy odbourávající alkaloidy. Vedle podmínek sušení ovlivňuje obsah a spektrum alkaloidů i původ a vegetační perioda rostliny.<sup>37</sup>

### 3.4. OBSAHOVÉ LÁTKY *CHELIDONIUM MAJUS* L.

#### 3.4.1. Alkaloidy

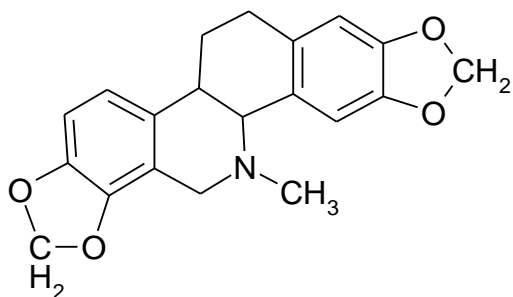
Alkaloidy jsou hlavní obsahové látky vlašovičnicku. V rostlině jich bylo popsáno již více než 30. Z tohoto počtu jich 15 poprvé izoloval a převážně i strukturně určil Slavík.<sup>37</sup>

##### 3.4.1.1. Alkaloidy podle chemické struktury

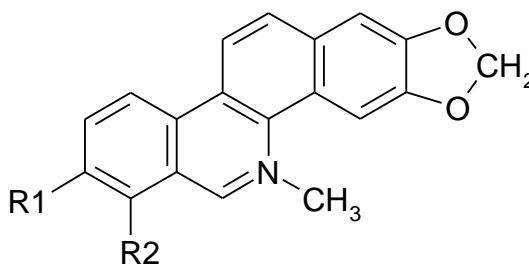
Dosud nalezené alkaloidy se dají rozdělit do následujících skupin dle struktury:<sup>37</sup>

a) Benzofenanthridinový typ ( $\alpha$ -nafthofenanthridinový typ): ve struktuře těchto alkaloidů je obsažen tetraisochinolinový kruhový systém (naftalenové jádro s navázanou isochinolinovou strukturou). Tato skupina se dá rozdělit na 2 podskupiny:

- **terciární** alkaloidy- obsahují terciární dusík (např. chelidonin (V), homochelidonin)
- **kvarterní** alkaloidy- obsahují kvarterní dusík s 2 centrálními aromatickými prstenci (např. sanguinarin (VI a) chelerythrin (VI b))



V

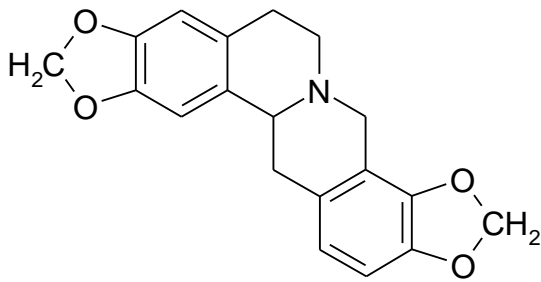


VI a)  $R_1 + R_2 = \text{OCH}_2\text{O}$

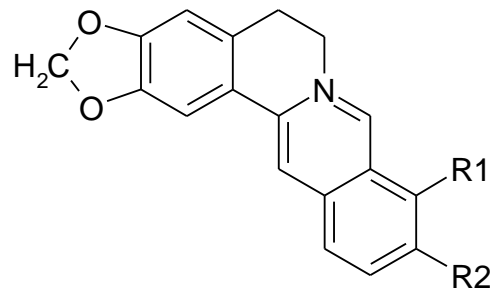
b)  $R_1 = R_2 = \text{OCH}_3$

b) Protoberberinový typ: alkaloidy toho typu jsou zde zastoupeny:

- tetrahydropROTOBERBERINY- jsou to **terciární** alkaloidy (např. stylopin (VII))
- protoberberiny- **kvarterní** alkaloidy (např. berberin(VIII a), koptisin(VIII b))



VII



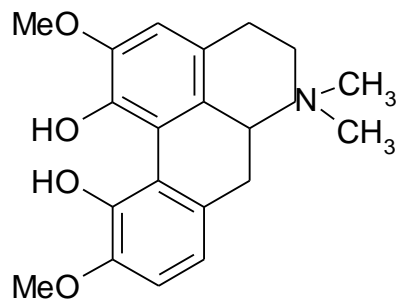
VIII

a)  $R_1=R_2=OCH_3$

b)  $R_1+R_2=OCH_2O$

c) Protopinový typ: sem náleží protopin, alkaloid typický pro čeleď Papaveraceae.

d) Ostatní alkaloidy: deriváty benzylisochinolinu – typy, které jsou zde zastoupeny v malém množství: chinolizidin, spartein (v *Chelidonii herba*) a magnoflorin (v *Chelidonii radix*).<sup>37</sup>



IX

Kvartérní benzo[c]fenanthridinové alkaloidy (KBA) tvoří relativně malou skupinu přírodních látek. Tyto isochinolinové deriváty jsou nápadné svými jasnými barvami. KBA jsou široce rozšířeny, vyskytují se v mnoha druzích čeledí Papaveraceae, Fumariaceae a Rutaceae. Nejhojnějšími zdroji KBA kromě *Chelidonium majus* L. jsou také *Sanguinaria canadensis*, *Dicranostigma lactucoides*, *Macleaya cordata*, *M. microcarpa* a některé druhy *Bocconia* a *Zanthoxylum*. Sanguinarin a chelerythrin, které byly objeveny už v 19.století, jsou 2 nejznámější a lépe dostupné KBA. KBA jsou velmi citlivé k nuklofilním činidlům.

V alkalickém prostředí se KBA změní na bimolekulární aminoacetalový derivát propojený můstkem s kyslíkovým atomem.<sup>40</sup>

Výzkumy mléčné šťávy získané z lodyhy *Chelidonium majus* ukázaly, že čerstvá, ještě nezoxidovaná, mléčná šťáva obsahuje větší množství dihydrokoptisinu, sanguinarinu, chelerythrinu, berberinu a koptistinu. Pokud necháme mléčnou šťávu stát několik dní na vzduchu nebo provádíme chromatografii bez použití redukčního činidla (jako např. 0,4% roztok merkaptoethanolu), dochází k oxidaci a už nelze prokázat žádný dihydrokoptisin, pouze koptisin. Lze předpokládat, že v čerstvém, neoxidovaném latexu z vlašovičnicku se vyskytují i jiné, lehce oxidovatelné alkaloidy jako např. dihydroberberin. Tyto se ale oxidují stejně jako dihydrokoptisin při zpracovávání rostliny, např. při sušení.<sup>37</sup>

Zajímavé je rozdělení obsahových látek čerstvého vlašovičnickového latexu: všech 5 prozkoumaných alkaloidů (berberin, chelerythrin, koptistin, dihydrokoptisin a sanguinarin) je obsaženo ve vakuolách spolu s chelidonovou kyselinou a enzymy, jako jsou hydrolasy a blíže nespecifikované fenolické sloučeniny. Sanguinarin a chelerythrin mají větší afinitu k obsahu vakuol, proto se z vakuol do mléčné šťávy uvolňují až naposled a při volném stání roztoku pak způsobují rozklad tonoplastu, což je zřejmě základ přesné izolace. V mléčné šťávě je obsažen enzym fenoloxidas. Přítomnost enzymů v rostlině, získávaných společně s aktivními alkaloidy může být odpovědná za „nejisté působení“ preparátu vlašovičnicku, protože právě přítomnost enzymů může vést k přeměnám alkaloidů či vzniku méně účinných látek.<sup>37,38</sup>

Byly provedeny extrakce alkaloidů *Chelidonium majus* L. různými metodami (tradiční vymačkávání a příprava čaje, mikrovlnná extrakce a SFE). Extrakty byly vodné a propylenglykolové. Pro srovnání extrakčních metod byl výtěžek hodnocen podle celkového obsahu alkaloidů zjištěného spektroskopii. Nejvyšší výtěžek alkaloidů byl získán mikrovlnovou extrakcí a klasickou infuzí. Distribuce alkaloidů v rostlině byla zkoumána tenkovrstvou chromatografií s densitometrií. Koncentrace alkaloidů v extraktu je značně rozdílná v závislosti na extrakční metodě. Roztok získaný SFE obsahuje koptisin a chelidonin, ale berberin může být získán pouze mikrovlnnou extrakcí. Extrakt s vysokým obsahem koptisinu můžeme získat jedině SFE následovanou mikrovlnnou extrakcí.<sup>41</sup>

Distribuce alkaloidů v rostlině je nerovnoměrná, mění se v závislosti na vegetační periodě rostliny, klimatických podmínkách, stáří a druhu rostliny. Kromě toho mohou získané hodnoty záviset na metodě izolace a stanovení alkaloidů.<sup>37,38</sup> V tabulce 1 jsou uvedeny alkaloidy izolované z vlašovičnicku.

Tabulka 1: Alkaloidy izolované z *Chelidonium majus* L. (Papaveraceae)<sup>38</sup>

Alkaloid	kořen	nadzemní část
<i>Kvarterní benzofenantridiny</i>		
Sanguinarin	+++	+++
Chelerythrin	+++	+++
Chelirubin	+	+
Chelilutin	+	+
Makarpin	+	+
<i>Terciární benzofenantridiny</i>		
Chelidonin	+++	+++
Homochelidonin	++	+
Chelimin	+	-
Chelamidin	+	-
Dihydrosanguinarin	+	+
Dihydrochelerythrin	+	+
Dihydrochelirubin	+	-
Dihydrochelilutin	+	-
N-Demethyl-9,10-dihydrooxysanguinarin	+	-
Norchelidonin	+	+
Izochelidonin	-	+
Oxysanguinarin	+	-
<i>Terciární protoberberiny</i>		
Stylopin	++	++ až +++
<i>Kvarterní protoberberiny</i>		
Methylstylopin	+	+
Berberin	++	+++
Koptisin	+++	+++
Korysamin	+	+
<i>Protopiny</i>		
Protopin	++	+
Allokryptopin	++	+
<i>Kvarterní aporfíny</i>		
Magnoflorin	+++	-
Sparteín	?	?

#### 3.4.1.2. Alkaloidy kořene (*Chelidonii radix*)

Nejbohatším orgánem z hlediska obsahu alkaloidů je kořen. Celkový obsah alkaloidů v něm dosahuje 0,8-2%<sup>37</sup>, a je nejvyšší na konci vegetačního období, zatímco při kvetení rostliny klesá. U víceletých rostlin je obsah alkaloidů v kořeni výrazně vyšší než v prvním roce vegetace.<sup>37,38</sup>

- **Hlavní alkaloidy** kořene jsou koptisin (0,15-0,57%), chelidonin (0,5-1,02%)<sup>37,38</sup> významný je i obsah sanguinarinu, chelerythrinu, berberinu a kvartérního aporfinového alkaloidu magnoflorinu.<sup>38</sup>
- Jako **vedlejší alkaloidy** jsou zde přítomny: 6-methoxydihydrochelerythrin, 6-methoxy dihydrosanguinarin, dihydrosanguinarin, oxysanguinarin, dihydrochelerythrin, homochelidonin,  $\beta$ -allocryptopin, chelilutin, chelamin a korysamin.<sup>37</sup> Mezi novější alkaloidy, které jsou v literatuře zmíněny jen zřídka kdy patří chelamin  $C_{20}H_{19}NO_6$  a chelamidin  $C_{21}H_{23}NO_6$ . Podle spektrální analýzy jim náleží struktura 10-hydroxychelidoninu a 10-hydroxyhomochelidoninu. Ojediněle byl izolován také alkaloid chelidimerin (meso-forma 1,3-bis-(hydrosanguinarinyl)acetonu).<sup>42</sup> Z kořene také byly izolovány 2 další aporfinové alkaloidy- corydin a norcorydin. Jejich identifikace byla provedena pomocí IR, UV,  $^1H$ -NMR a MS.<sup>43</sup>

#### 3.4.1.3. Alkaloidy nati (*Chelidonii herba*)

V nadzemní části vlašovičnicku je obsah alkaloidů nižší, dle původu a podmínek sušení od (0,5-1,5%). V průběhu vegetačního období dochází k výrazným změnám v zastoupení jednotlivých alkaloidů.<sup>38</sup> Dle jiné práce se obsah alkaloidů pohybuje od 0,01 do 1%.<sup>37</sup> Jde především o benzylochinolinové alkaloidy benzofenanthridinového, protoberberinového a protopinového typu. Jako **hlavní alkaloidy** nati jsou uváděny: chelidonin, koptisin, stylopin, sanguinarin, chelerythrin, berberin<sup>37,38</sup> a protopin<sup>37</sup>. V mnohem menším množství zde nalezneme ještě asi 20 alkaloidů. Ve velmi malém množství (0,3 mg/kg) je v droze přítomen aporfinový alkaloid spartein.<sup>37</sup> Byly sledovány změny v obsahu alkaloidů v nadzemní části rostliny v období duben až říjen pomocí HPLC a bylo zjištěno, že hlavním alkaloidem po celé vegetační období je koptisin. Jeho obsah v nadzemní části činil 0,4-0,8%. Na počátku vegetačního období byl jako druhý hlavní alkaloid nadzemní části stanoven stylopin, zatímco obsah chelidoninu, sanguinarinu a chelerythrinu byl v této době relativně nízký. Po odkvětu rostliny postupně obsah chelidoninu, sanguinarinu a chelerythrinu



narůstal a ke konci vegetačního období patřily k hlavním alkaloidům, zatímco obsah stylopinu výrazně poklesl. Rovněž bylo prokázáno, že hlavním alkaloidem nálevu z usušené nadzemní části sbírané v květnu (1 g sušené drogy *Chelidonii herba* se přelije 0,25 l vařící vody, ponechá se stát 10 minut) je taktéž koptisin (0,1- 0,2%), zastoupení ostatních alkaloidů je nepatrné (< 0,001%).<sup>38</sup>

#### 3.4.1.4. Alkaloidy plodu (*Chelidonii fructus*)

Z plodu rostlin *Chelidonium majus* L. byly izolovány 2 protoberberinové alkaloidy a 1 benzofenanthridinový. Na základě chemické a spektroskopické analýzy byly identifikovány jako koptisin, berberin a chelidonin.<sup>44</sup>

#### 3.4.1.5. Alkaloidy semene

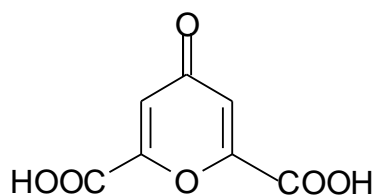
V semenech převažuje koptisin.<sup>37</sup>

Kořen a nadzemní část rostliny se zásadně liší jak v obsahu, tak ve složení alkaloidů, proto byly prozkoumány obě části odděleně. V obou případech byl postup stejný: nejdříve byl okyselený vodný extrakt vytřepáván etherem, aby byly odděleny nebasické nebo velmi slabě bazické látky (*frakce L*). Potom byl vodný roztok slabě alkalizován a znovu vytřepáván etherem a byla získána *frakce A*. A nakonec silná alkalizace a vytřepávání etherem dala *frakci B*. Další alkaloidy byly získány po jejich převedení na jodidy extrakcí chloroformem. Kvartérní *frakce z kořene* obsahovala jako hlavní alkaloid magnoflorin jodid v relativně vysokém množství (0,19%), přičemž nadzemní část obsahuje znatelně nižší množství kvartérních alkaloidů. Z *nati* byl izolován (-)- $\alpha$ -stylopin methyljodid a (-)- $\beta$ -stylopin methyljodid. Oba tyto alkaloidy byly detekovány také v kořeni, ale pouze ve stopovém množství. Z *frakce L z kořene* byly získány v závislosti na oxysanguinarinu, který byl izolován už dříve, dihydrosanguinarin, dihydrochelerythrin a dihydrochelirubin. Také byla stanovena přítomnost menšího množství dihydrochelilutinu. V nadzemní části byly detekovány pouze stopová množství dihydrosanguinarinu a dihydrochelerythrinu. Nález dihydrochelirubinu a dihydrochelilutinu v *Chelidonium majus* L. je vůbec prvním důkazem výskytu těchto dvou látek v přírodě.<sup>42</sup>

### 3.4.2. Ostatní obsahové látky

#### 3.4.2.1. Rostlinné kyseliny

Ve vlašovičnicku byly nalezeny organické kyseliny, především kyselina chelidonová (X), kyselina citronová, jablečná a jantarová.<sup>37</sup>



X

Jedna z novějších prací uvádí také estery kyseliny kávové: 2- kafeoylglycerová k., 4- kafeoyltrihydroxymáselná k., k. kafeoyl-L-jablečná a ester k. kávové a 1,4-laktonu k. threonové<sup>37,38</sup>. Hydrolýsou vodno-methanolového extraktu se získá 0,4% kávové kyseliny a asi 0,1% p-kumarové, ferulové, gentistové a p-hydroxybenzoové kyseliny.<sup>37</sup> Dle starší práce byla v droze nalezena také kyselina mravenčí.<sup>45</sup>

Dřívější práce uvádějí přítomnost alkoholu chelidonolu,  $\beta$ -karotenu, kyseliny askorbové, flavovoidů rutinu a kvercetinu.<sup>37,45</sup> Ve šťávě z natě se vyskytuje hodně fosforečnanu vápenatého a hořečnato-amonného, v semenech olej a velmi účinná lipasa. Dále byla v rostlině prokázána proteasa, peroxydasa, glukosa a fruktosa, třísloviny, kaučuk.<sup>45</sup>

#### 3.4.2.2. Minoritní složky

Byly prokázána přítomnost nescifických triterpenoidů, silic, saponinů a kyseliny nikotinové.<sup>38</sup> Dále se zde nalezneme biogenní aminy: cholin, methylamin, histamin, tyramin.<sup>37,38</sup> V celé rostlině je obsaženo velké množství pryskyřičnatých látek, z nichž jedna – žlutě zbarvená – je pravděpodobně příčinou toxicity čerstvé rostliny.<sup>38,45</sup>

## Minerální látky

Nově bylo zjištěno, že droga *Chelidonii herba* obsahuje 24 prvků: Al, As, B, Ba, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, K, Li, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, P, Pb, S, Ti, V, Zn). Tyto prvky byly zjištěny v čerstvé droze (kořeni i nati), v jejím vodném roztoku a alkalickém extraktu.<sup>46</sup> Obsah prvků byl zkoumán pomocí ICP (inductively coupled plasma)<sup>41,46</sup> a emisní spektrometrií. Rozdíly v obsahu prvků v extraktu (kromě Cu, Mn a Na) jsou značné. Bylo zjištěno, že kořeny obsahují vyšší množství minerálních prvků až na B, Cu, P a S. Ve vodném extraktu je množství minerálů nejčastěji v rozmezí 10-65%, to platí hlavně pro K (65%) a P (54%). Koncentrace roztoku minerálů v případě tinktury klesá se stoupající koncentrací alkaloidů.<sup>46</sup> Obsah Mg se liší podle části rostliny.<sup>47</sup> Byly zkoumány vzájemné vztahy mezi obsahem, alkaloidů a minerálními a stopovými prvky v rostlině. Byla zjištěna korelace mezi Mg, Cr, Al, Co a Sr a protoberberinovými alkaloidy, stejně tak byl patrný vztah mezi Mg, Cr, Al a Zn a benzofenanthridinovými alkaloidy.<sup>48</sup>

Lze tedy potvrdit, jak obsah makroelementů, tak i mikroelementů v extraktu ovlivňuje jeho terapeutickou hodnotu.<sup>46</sup>

### 3.5. BIOLOGICKÁ AKTIVITA OBSAHOVÝCH LÁTEK

Byly prováděny studie ověřující inhibiční vliv některých isochinolinových alkaloidů na aktivitu butyrylcholinesterasy v lidském séru. Zkoumány byly protoberberiny, benzofenanthridiny, apomorfinové alkaloidy ve srovnání se 4 modelovými sloučeninami. Sloučeniny vykazovaly rozdílné typy interakcí s BuChE a AChE.

Bylo prokázáno, že některé sloučeniny, obsahující kvarterní dusík, fungují jako inhibitory butyrylcholinesterasy. Jejich účinek na BuChE se liší mírou inhibiční schopnosti vůči BuChE a mechanismem inhibice. Kvarterní benzofenanthridiny (sanguinarin a chelerythrin) a kvartérní protoberberiny (koptisin a protoberberinu) se váží na tzv.  $\gamma$ -anionickou stranu, která je umístěna mimo aktivní centrum enzymu.

Aktivní centrum BuChE se skládá, podobně jako u AChE, ze dvou funkčních komponent: esterového a anionického vazebného místa. Zatímco esterové místo je u obou enzymů stejné, anionické místo je odlišné. Anionické místo BuChE je totiž stéricky omezeno - vazba inhibitorů k BuChE je ovlivněna jejich geometrií a velikostí. Při interakci inhibitor-

BuChE hraje náboj anionického místa mnohem menší roli, než u AChE. Hlavní síly uplatňující se ve vazbě jsou Van der Waalsovy interakce a hydrofobní interakce. Je tedy zřejmé, že BuChE nemá anionické vazebné místo umístěno v terminální části. Na rozdíl od AChE se u BuChE všechny studované sloučeniny váží na aktivní centrum enzymu. Benzofenanthridinové alkaloidy, stejně jako slabé inhibitory BuChE se váží na anionické centrum. Rozdílná schopnost inhibice může být vysvětlena jejich rozdílnou hydrofobicitou a stereochemií molekuly.<sup>49</sup>

**Tab. 2 – Inhibice cholinesteras<sup>49</sup>**

Sloučenina	I <sub>50</sub> (mol/l) BuCHE	I <sub>50</sub> (mol/l) ACHE	% inhibice BuCHE <sup>b</sup>
Berberin	> 1.0×10 <sup>-4</sup>	9.8×10 <sup>-7</sup>	25 <sup>c</sup>
Koptisin	> 1.0×10 <sup>-4</sup>	5.8×10 <sup>-7</sup>	36 <sup>c</sup>
Sanguinarin	2.4×10 <sup>-5</sup>	3.5×10 <sup>-5</sup>	85
Chelerythrin	1.4×10 <sup>-5</sup>	9.4×10 <sup>-6</sup>	90
N-Methyl- isochinolin	> 1.0×10 <sup>-4</sup>	2.5×10 <sup>-5</sup>	21 <sup>c</sup>
Protoberberin	> 1.0×10 <sup>-4</sup>	3.4×10 <sup>-5</sup>	28 <sup>c</sup>
N-Methyl- fenanthridin	1.0×10 <sup>-5</sup>	4.8×10 <sup>-6</sup>	95

c.... slabé inhibitory

b.... pro koncentraci inhibitorů 1.0×10<sup>-4</sup>mol/l

Pozn.: Hodnota I<sub>50</sub> byla určena ze závislosti koncentrace alkaloidů vs. procento inhibice.

Všechny inhibitory AChE jsou terciární base. Ukázalo se však, že také kvartérní amoniové baze alkaloidního<sup>49</sup> i nealkaloidního typu<sup>50</sup> mají aktivitu vůči mozkové AChE a BuChE a mohou přecházet přes hematoencefalickou bariéru (HEB), ačkoliv se to zdá paradoxní.

### 3.6. FARMAKOLOGICKÉ ÚČINKY *CHELIDONIUM MAJUS L.*

Až do roku 1970 byla zkoumána výlučně čerstvá droga : „*Herba Chelidonii recens* – čerstvá, na začátku doby květu, sbíraná nať s kořeny“. Převládlo mínění, že droga při sušení ztrácí své účinné látky, což se může stát i při nejlepších podmínkách sušení. Většina farmakologických výzkumů byla tudíž provedena s extrakty z čerstvé rostliny, vzácněji pak se sušenou celou rostlinou nebo s výtažky z čerstvé rostliny (čerstvá nať nebo kořen), případně

s alkaloidy izolovanými z celé rostliny. Ale stabilita látek obsažených v čerstvé droze také nebyla optimální, proto se často popisoval nejistý účinek získaných preparátů. Výsledky těchto studií jsou proto jen obtížně převeditelné na sušený vzorek drogy. Přestože experimenty neprobíhaly za stejných podmínek, podařilo se objasnit, v čem spočívá základní působení drogy.<sup>37</sup>

### 3.6.1. Protinádorové a antivirové působení

Klinické použití vlašovičnicku při léčbě nádorů se datuje již od minulého století, kdy Botkin popsal dva případy karcinomu léčené extrakty z vlašovičnicku. Další klinické údaje z tohoto období popisují užití chelidoninsulfátu při rakovině žaludku, extraktu z vlašovičnicku při karcinomu prsu a dalších orgánů. Dále má droga dlouhou historii při léčbě bradavic, papilomů a kondylomat. Později při testování rostlinných extraktů na antitumorovou aktivitu byl pozorován inhibiční účinek extraktů z vlašovičnicku na sarkom 180 a Ehrlichův myší sarkom.<sup>37,38</sup> Při intenzivním výzkumu antitumorové aktivity v šedesátých letech byly popsány inhibiční účinky extraktů z vlašovičnicku na některé typy nádorů, současně však byla prokázána výrazná cytotoxicita alkaloidů sanguinarinu, chelerythrinu, chelidimerinu, chelidoninu, protopinu a koptisinu. V roce 1968 bylo v experimentech s tkáňovými kulturami zjištěno, že extrakty z rostliny vykazují slabou aktivitu proti viru Herpes simplex. Rovněž v pozdější práci byl potvrzen inhibiční efekt extraktu na virus Herpes simplex a některé adenoviry *in vitro*. Nejsilnější inhibiční účinek však vykazovala frakce neobsahující žádný z typických alkaloidů tohoto druhu. Aktivní složka extraktu zatím nebyla definována.<sup>38</sup>

V současné době opět roste zájem o využití vlašovičnicku při terapii karcinomů, a to především v souvislosti s přípravkem **Ukrain**. Ten byl vyvinut a patentován rakouskými autory. Ukrain obsahuje alkaloidy z *Chelidonium majus* L. konjugované s kyselinou thiofosforečnou a vyznačuje se silnou imunomodulační aktivitou.<sup>51</sup> Působí zvýšení počtu T-lymfocytů a normalizaci poměrů T-helpers/T-supresorových buněk, a snížení hodnot IgG. Přípravek byl aplikován pacientům s různými typy karcinomů i pacientům s recidivujícím bronchopulmonárním onemocněním.<sup>38,51</sup> Byl pacienty dobře snášen a vedl k obnovení buněčné imunity, provázené zlepšením stavů pacientů a v několika případech i regresí tumoru. V *in vivo* studiích na myších tumorech se potvrdilo, že i.v. podání Ukrainu snižuje rychlost růstu tumoru. V pokusech *in vitro* bylo doloženo, že preparát obnovuje schopnost makrofágu lyticky štěpit tumorové buňky pomocí stimulace LPS (lipopolysacharid,

endotoxin). Tato obnovená aktivita je nezávislá na TNF- $\alpha$ . Ukrajín tedy aktivuje alternativní cytolytický mechanismus u makrofágů. Studiu dalších vlastností je i nadále věnována značná pozornost.<sup>38</sup>

### 3.6.2. Hepatotropní a spasmolytické účinky

Zcela odlišnou oblastí indikace vlaštovičníku je jeho tradiční použití při onemocněních žlučových cest a jater. Droga je v současných přehledech fytotherapie doporučována jako spasmolytikum a cholagogum, názory na její účinnost jsou však nejednoznačné. Údaje o pozitivních účincích drogy na sekreci žluči, aktivitu  $\alpha$ -amylasy i spasmolytické účinky pochází vesměs ze starších prací. Významné zvýšení sekrece bilirubinu, cholesterolu a zvýšení aktivity pankreatických enzymů lipasy a  $\alpha$ -amylasy po aplikaci 100mg suchého extraktu je uvedeno zase v jiné práci. Příznivé účinky preparátu **Panchelidon** obsahujícího extrakt z čerstvých rostlin s obsahem 20% alkaloidů při léčbě chronické cholangitidy, cholelithiasy a dyskinesí popsal v roce 1977 Neumann-Mangoldt. Preparát vykazoval spasmolytický a středně analgetický účinek, výrazně omezoval diarrhoeu, vyvolanou léčbou antibiotiky.<sup>38</sup> Zpomalení střevní pasáže je zapříčiněno centrálním sympatomimetickým působením alkaloidů vlaštovičníku.<sup>37</sup> Weiss hodnotí účinky vlaštovičníku jako nekonstantní. S odvoláním na vlastní zkušenost uvádí, že účinnost drogy klesá delším uchováváním a je tedy nutné užívat extrakty vždy z čerstvé drogy. (Naproti tomu dle poznatků E. Tábořské a jejích kolegů se obsah alkaloidů v usušené droze uchováváním nemění, stejně jako se nemění alkaloidní složení tinktury uchovávané několik měsíců v chladu). I při podávání čerstvé šťávy však pozoroval, že zatímco v první polovině roku byl efekt jeho působení zřetelný a pacientům přinášel úlevu, po uplynutí této doby začal slábnout, až prakticky v krátké době vymizel. Je pravděpodobné, že uvedené poznatky souvisejí s nestandardním složením drogy.<sup>38</sup>

Ve 30-tých letech 20. století byla prováděna řada klinických studií, hlavně na pacientech s chorobami žaludku, střeva a jater. Pacienti byli léčeni preparáty z čerstvé rostliny (vylišované šťávy nebo celá rostlina rozetřena s mléčným cukrem) p.o.. Bylo pozorováno snížení bolesti a vymizení křečí (zlepšení subjektivních obtíží). Na podkladě těchto preklinických a klinických výzkumů (převážně na celé rostlině nebo na celkových alkaloidech → výsledky nejsou převoditelné na účinek sušené drogy) bylo vlaštovičníku přiřazeno spasmolytické působení na GIT a žlučové cesty. Toto působení bylo přičítáno chelidoninu. Také v monografii *Chelidonii herba* se udává: „Dostatečně jisté je papaverinu podobné, lehce

spasmolytické působení na horní část GIT.“. K otázce zda má vlašovičnický cholagogní působení či zda se jedná jen o efekt choleretický nebo cholekinetický neexistují žádné dostačující důkazy. Podle klinických studií mají mít preparáty celé čerstvé rostliny podávané p.o. u pacientů s cholestasou cholagogní působení.<sup>37</sup>

Větší uplatnění mezi galeniky používanými v současnosti v západoevropských zemích nacházejí směsné extrakty, obsahující vedle vlašovičnicku výtažky dalších drog. Např. preparát **Chelidonium-Strath** (Strath-Labor) obsahuje směs extraktů z *Chelidonii herba*, *Agrimoniae herba*, *Salviae folium* a *Hyperici herba*, přípravek **Hepatofalk** Planta (Falk) je směsí extraktů ze *Silybum marianum*, *Chelidonium majus* a *Curcuma xanthorrhiza*. Preparát obdobného složení **Aristochol** (Steiber and Co.) byl hodnocen Baumanem, který uvádí, že přípravek zvyšuje choleresi, sekreci lipasy a amylasy. Pozitivní účinky preparátu Hepaticum-Medice (Medice) na metabolismus žlučových kyselin popsal Matzekis.<sup>38</sup>

### 3.6.3. Biologické účinky hlavních obsahových látek

#### 3.6.3.1. Aktivita látek typu benzofenanthridinu

- Jeden z hlavních alkaloidů vlašovičnicku je **chelidonin**. Má významné spasmolytické účinky především na svalstvo gastrointestinálního traktu, bronchů, dělohy, uretry a cév. Jeho spasmolytický účinek je poloviční oproti účinkům papaverinu. Chelidonin působí přes *nervus vagus* – zpomaluje aktivitu srdce a snižuje tak krevní tlak. Snižuje spontánní motorickou aktivitu a tělesnou teplotu, potencuje účinek hypnotik. Má cholagogní účinek a ve žlučových cestách působí antisepticky. Chelidonin vykazuje stejně jako chelerythrin a sanguinarin antimitotické účinky – inhibuje polymeraci tubulinu.<sup>38</sup>
- **Sanguinarin** a **chelerythrin** jsou již dlouhou dobu známé a v praxi užívané alkaloidy. Byly izolovány i z jiných rostlinných druhů, kořen vlašovičnicku patří k jejich nejvýznamnějším zdrojům. Mají protizánětlivý a antimikrobiální účinek; v Rusku se vyrábí preparát Sangviritrin (obsahuje směs sanguinarinu a chelerythrinu), v USA přípravky ústní hygieny s obsahem benzofenanthridinů). Sanguinarin a chelerythrin vykazují inhibiční účinky na celou řadu enzymů, např. na cholinesterasy, alaninaminotransferasu,  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasu,  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasu. Oba alkaloidy rozpojují

respiraci a oxidační fosforylaci, vmezeřují se do dvouspirálové nativní DNA (interkalace) a tak zabraňují syntéze RNA a inhibují enzymovou hydrolýzu DNA. Nedávno byla popsána inhibice proteinkinasy C chelerythrinem. Většina těchto inhibičních účinků je připisována interakci benzofenanthridinů s SH-skupinami enzymů. Oba alkaloidy mohou reagovat v závislosti na pH buď ve formě kvartérního kationtu, nebo terciární base. Sanguinarin rovněž zvyšuje vodivost lipidové dvouvrstvy. Chelerythrin, sanguinarin a chelidonin mají též prokazatelné antimitotické účinky. Zdá se, že mechanismus jejich působení je inhibice polymerace tubulinu. Lze předpokládat, že antimikrobiální i cytostatická aktivita těchto alkaloidů je podmíněna výše uvedenými účinky na řadu klíčových enzymů buněčného metabolismu.<sup>38</sup>

### 3.6.3.2. Aktivita látek typu protoberberinu

- Jedním z hlavních alkaloidů v rostlině je **koptisin**, o jeho účincích je známo jen velmi málo. Ze starších prací pocházejí údaje o jeho cytotoxickém působení. Jsou popsány jeho antimikrobiální a protizánětlivé účinky. Podobně jako berberin inhiboval v dávkách 195mg/kg/den srážení trombocytů u krysu. Má též spasmolytickou a uterotonickou aktivitu. Strukturně se koptisin jen málo liší od berberinu, proto lze očekávat, že koptisin vykazuje i řadu dalších efektů analogických berberinu.<sup>38</sup>
- Řada významných fyziologických účinků byla popsána u **berberinu**. Jedním ze zdrojů tohoto alkaloidu je právě *Chelidonium majus* L. Berberin má některé účinky podobné jako chelidonin. V Evropě a na východě je tradičně užíván proti průjmům, žloutence a chronické dysenterii. Stimuluje sekreci žluče, snižuje krevní tlak (vasodilací) a působí sedativně. V *in vitro* pokusech bylo popsáno, že působí jako antagonist  $\alpha$ -2-adrenoreceptorů lidských krevních destiček. Působí inhibičně na některé enzymy a má antibakterální účinky. Řada prací se zabývá účinkem berberinu na srdeční aktivitu. V pokusech na zvířatech byly zjištěny jeho pozitivní ionotropní a dromotropní a negativní chronotropní efekty.<sup>38</sup>
- **Stylopin** je hlavní složkou listu vlašovičnicku. Ten byl užíván k odstraňování bradavic, papilomů, kondylomat, a v orientálních zemích i k léčení jaterních onemocnění. Stylopin potlačuje vznik NO a PGE<sub>2</sub> v makrofázích tím, že inhibuje expresi iNOS a COX-2. Dále také redukuje produkci TNF- $\alpha$  a interleukinů – IL-1b a



IL-6. Tyto biologické aktivity mohou mít podíl na protizánětlivé aktivitě celé rostliny *Chelidonium majus* L.<sup>52</sup>

### 3.6.3.3. Aktivita ostatních obsahových látek

Rovněž některé z nealkaloidních látek prokázaných v *Chelidonium majus* L. mají výrazné fyziologické účinky. Kyselina kávová i její estery mají spasmolytickou, cholagogní a antibakteriální aktivitu. Nebylo dosud zkoumáno, do jaké míry se na terapeutických efektech vlašovičnicku mohou podílet tyto látky.<sup>38</sup>

## 3.7. VYUŽITÍ *CHELIDONIUM MAJUS* L.

Využití rostliny má bohatou historii v lidovém léčitelství. Není téměř choroby, proti které vlašovičnick v průběhu staletí nebyl použit. Léčivá moc jí byla přisuzována již v době starověku a od té doby byla v léčitelství hojně používána. Byla doporučována proti chorobám jater, zimnici a vodnatelnosti, na zlepšení zraku, k odstranění bradavic a léčbě tumorů.

V novější době je vlašovičnick užíván ve fytoterapii jako droga s účinkem spasmolytickým, analgetickým, cholagogním, popř. jako dermatologikum, antihistaminikum a antiseptikum. *Chelidonii herba* i *Chelidonii radix* jsou popsány v řadě lékopisů. Na přípravu odvaru se doporučuje použít 0,5-1,0 g drogy z natě nebo 0,5 g drogy z kořene. *Tinctura chelidonii* s obsahem alkaloidů 4-5% se podává jako spasmolytikum v průměrných dávkách 1 g denně.

Extrakty z vlašovičnicku jsou součástí řady galeník, produkovaných zejména v západní Evropě. Jsou indikovány při hepatopatiích, poruchách funkce žlučníku a po jeho operacích. V Číně se extrakty z *Chelidonium majus* L. užívají při léčbě chronické bronchitidy, dávivého kašle a jako analgetikum. Vlašovičnick je součástí řady homeopatik. V lidovém léčitelství se stále traduje, použití rostliny, zejména čerstvé šťávy, jako prostředku k odstranění bradavic.<sup>38</sup>

## **4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST A VÝSLEDKY**

## **4.1. VŠEOBECNÉ POSTUPY**

### **4.1.1. Destilace a odpařování rozpouštědel**

Rozpouštědla byla před použitím destilována; nejprve byl zachycen předek (asi 5 %; většinou s vodným azeotropem), poté bylo vydestilováno zbylých cca 90 % rozpouštědla. Rozpouštědla byla uchovávána v hnědých nádobách. Odpařování chromatografických frakcí bylo prováděno na vakuové odparce při 40°C za sníženého tlaku.

### **4.1.2. Chromatografie**

#### *4.1.2.1. Tenkovrstvá chromatografie*

Chromatografie na tenké vrstvě byla použita v systému N (normálních) komor. Komory byly použity nasycené mobilní fází. V případě užití malých komor (válcových) trvalo sycení asi 30 minut. U klasických komor pak asi hodinu. Chromatografie byla prováděna vzestupně.

#### *4.1.2.2. Sloupcová chromatografie*

Sloupcová chromatografie byla prováděna systémem stupňovité eluce na basickém oxidu hlinitém. Sloupec byl plněn obvyklým způsobem – nalitím suspenze adsorbentu do rozpouštědla. Vzorek byl po vysušení v exsikátoru nanesen na roztěru s malým množstvím bazického oxidu hlinitého.

## **4.2. MATERIÁL A VYBAVENÍ**

### **4.2.1. Rozpouštědla**

Benzín, lékopisný ČsL 4

Cyklohexan, č.

Dichlormethan; CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, č.

Diethylether

Ethanol 95% denaturován 5% methanolu

Chloroform, p.a.

Kyselina mravenčí; HCOOH, č.

Kyselina octová bezvodá, č.

n-Propanol; n-PrOH, č.

#### 4.2.2. Chemikálie

Acetylcholin jodid, p. a.

Amoniak 25%, č.

Dusík 5.0

Hydroxid sodný, č.

Hydroxid sodný, p. a.

Chlorid sodný, p. a.

Jodid draselný, č.

Kyanid draselný, č.

Kyselina sírová 98%, č.

Kyselina chlorovodíková 36%, p.a.

Síran sodný bezvodý, č.

Uhličitan sodný bezvodý č.

#### 4.2.3. Detekční činidla

D 1: Dragendorff činidlo modifikované podle Muniera.<sup>53</sup>

Je určen pro alkaloidy a ostatní sloučeniny obsahující dusík.

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

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

Příprava *zásobní roztoku*: připraví se směs roztoků A a B v poměru 1:1. Ta může být uložena několik měsíců v lednici.

Příprava *činidla ve spreji*: k roztoku 5,0 ml kyseliny vinné rozpuštěné v 50,0 ml vody se přidá 5,0 ml zásobního roztoku.

Pozn.: Vlastní zásobní roztok se používá pro detekci vitamínu B<sub>1</sub>.

D 2: Erdmannovo činidlo:<sup>54</sup>

1 ml koncentrované kyseliny dusičné se rozpustí ve 100 ml koncentrované kyseliny sírové.

D 3: Fröhdeho činidlo:<sup>54</sup>

1 mg molybdenanu amonného se za tepla rozpustí v 1 ml koncentrované kyseliny sírové.

Činidlo je po ochlazení připraveno k použití. Fröhdeho činidlo se připravuje v čase potřeby.

D 4: Kyselina dusičná koncentrovaná:<sup>55</sup>

Kyselina dusičná 70%.

D 5: Kyselina sírová koncentrovaná:<sup>55</sup>

Kyselina sírová 96%.

D 6: Mandelinovo činidlo:<sup>54</sup>

1 mg vanadičnanu amonného se rozpustí v 1 ml koncentrované kyseliny sírové. Toto činidlo se připravuje v čas potřeby.

D 7: Marquisovo činidlo:<sup>54</sup>

1 mg formaldehydu (nebo paraformaldehydu) se rozpustí v 1 ml koncentrované kyseliny sírové. Toto detekční činidlo se připravuje těsně před postřikem.

D 8: Mayerovo činidlo:<sup>56</sup>

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

D 9: Wasickyho činidlo:<sup>54</sup>

Ve směsi 6g kyseliny sírové a 4 g vody se rozpustí 20 g p-dimethylaminobenzaldehydu.

#### 4.2.4. Vyvíjecí soustavy pro tenkovrstvou chromatografii

S1: n-PrOH+ HCOOH+ voda 90:10:9

#### 4.2.5. Chromatografické adsorbenty

Adsorbent 1: Oxid hlinitý bazický (Merck):

Komerční adsorbent zrnitosti 100-200 µm, stupně aktivity ~3; pH vodného výluhu 9-9,5.

Adsorbent 2: Kieselgel UV 254 (Merck):

Komerčně vyráběné hotové desky pro chromatografii na tenké vrstvě. Podložka: oxid hlinitý.

Chromatografický adsorbent: Silikagel 60 F254, tloušťka vrstvy 0,2 mm.

### 4.3. STANOVENÍ INHIBICE AKTIVITY ACETYLCHOLINESTERASY

Kvartérní inhibitory cholinesteras izolovány v této práci z vlašovičnicku většího (*Chelidonium majus* L.) Byly testovány pro jejich inhibiční schopnost standardním *in vitro* inhibiční testem.<sup>57</sup>

#### 4.3.1. Přístroje

Automatický titrátor RTS 822, Radiometer, Dánsko

Homogenizátor Ultra-Turrax , Janke–Kunkel, Německo

Ultratermostat typ U3, VEB Prüfgerate-werk Mendingen, Německo

Průtokoměr plynový, typ PF/PG, trubice č. PG03, VEB Prüfgerate-werk Mendingen, Německo

#### 4.3.2. Materiál

Homogenát mozkové tkáně.

### **4.3.3. Příprava homogenátu**

Z mozků tří experimentálních objektů byl odpreparován nucleus caudatus. Preparáty byly opláchnuty fyziologickým roztokem a po té homogenizovány přístrojem Ultra – Turrax jednu minutu při dvaceti tisíci otáčkách za minutu v poměru 1 : 10 s destilovanou vodou. Po té byl homogenát rozplněn do zkumavek po dvou mililitrech a zmrazen na – 35 °C.

### **4.3.4. Inhibice cholinesteras**

Cholinesterasy jsou kompetitivně inhibovány kvarténními látkami. Pokles aktivity je úměrný použité koncentraci inhibitoru. Stanovení aktivity enzymu je založeno na jeho reakci s nativním substrátem, kdy je tento štěpen na alkohol cholin a kyselinu octovou. Tato je při použití pH-statové instrumentace neutralizována kontinuálními přídávky roztoku hydroxidu sodného, tak aby bylo udrženo statované pH 8.

0,5 ml homogenátu bylo smíseno s 2,5 ml 3 M roztoku NaCl, 0,2 ml roztoku testované látky a objem doplněn destilovanou na 23 ml. Reakční směs byla vytemperována na 25 °C, oddělena od okolní atmosféry protékajícím dusíkem a pH bylo nastaveno na hodnotu 8 a spuštěn titrátor. Po té bylo k reakční směsi přidáno 2 ml 0,01 M roztoku substrátu – acetylcholin jodidu. Ploterem titrátoru byla následně zaznamenávána spotřeba 0,01 M roztoku NaOH nutná k udržení statovaného pH reakční směsi. Koncentrace testované látky byly zvoleny tak, aby oblast aktivit enzymu byla rovnoměrně pokryta měřícími body od stoprocentní po nulovou aktivitu. Měření byla opakována pro každou koncentraci testované látky nejméně třikrát.

### **4.3.5. Matematické zpracování experimentálních dat**

Hodnoty  $IC_{50}$  byly vypočítány z naměřených hodnot nelineární regrese v programu GraphPad Prism (verze 3.02 pro Windows; výrobce GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

## 4.4. IZOLACE

### 4.4.1. Postup extrakce alkaloidů z *Chelidonium majus* L.

#### 4.4.1.1. Původ drogy

Droga (sušená nať s kořeny) byla získána sběrem fy JUGODRVO AD v Chorvatsku v období července-září 2004 a po očištění sušena za normálních podmínek.

Makroskopickou, mikroskopickou a chemickou identifikaci provedl L. Opletal.

Metodou podle ČL 2002 bylo stanoveno:

Cizí příměsi (2.8.2.):	12,2 %
Ztráta sušením (2.2.32.):	8,68 %
Celkový popel (2.4.16.):	16,8 %
Stanovení obsahu (alkaloidy jako chelidonin):	1,02 %

#### 4.4.1.2. Příprava extraktu a jeho čištění

41,8 kg suché nati s kořeny bylo perkolováno 95% ethanolem (celkem získáno 480 l extraktu), extrakt byl zahuštěn na vakuové odparce při 60 °C do maximálního odstranění alkoholu, byly přidány asi 2 litry vody. Vznikl temně hnědý, dehtovitý, sirupovitý odparek. Při oddestilování lihu ze zahuštěného koncentrátu tékala nějaká látka do vakuové odparky ve formě nahnědlého náletu, nebyla však analyzována.

Tento extrakt byl rotací rozehrán na vodní lázni asi na 40 °C, bylo přidáno 8 litrů 1,5% kyseliny sírové (zahřáté na 40 °C) a směs byla tyčinkou dokonale promíchávána po dobu několika minut, potom byl oranžový roztok po zchlazení dokonale slit (dehtovité podíly plavaly jen málo na hladině, seděly více u dna), dehet byl seškrabán a umístěn do velké kádinky, přidáno 500 ml bezvodé kyseliny octové a na vodní lázni byla směs dokonale rozpuštěna na viskózní roztok. K tomuto roztoku bylo přidáváno po částech 7,5 l vody a promícháno; kalný oranžový roztok byl slit, černý pryskyřičnatý podíl rozpuštěn znova ve 200 l octové kyseliny, zase rozehrán a srážen 4 litry vody. Oba dekantáty byly spojeny, ponechány přes noc stát, poté byl tento oranžový roztok zfiltrován přes skládaný polyamidový filtr (filtr 1), ten byl promyt vodou a ponechán vykapat; vyloučil se práškovitý sediment hnědo-oranžové barvy. Oba kyselé filtráty (z kyseliny sírové i octové) byly spojeny; vyloučila



se bělavá sraženina, která na sebe adsorbovala oranžové soli alkaloidů. Suspenze byla zfiltrována přes polyamidovou plachetku (filtr 2) a filtr byl promyt vodou. Filtr 1 a filtr 2 byly roztrženy a suspendovány v 1,5 l 1,5% kyselině sírové, suspenze zfiltrována. Oranžový filtrát byl přidán ke kyselému roztoku extraktu (celkem 37 litrů filtrátu).

#### **4.4.2. Výtřeppek A z primárního extraktu**

Kyselý roztok síranů (37 litrů) byl neutralizován nejprve pevným práškovým bezvodým uhličitanem sodným na pH ca 9. Tekutina se výrazně zakalila a nabyla vzhledu světlého kaka. Tento roztok byl vytřepán 5x 15 litry etheru, etherové vrstvy byly spojeny, odděleny od zbytku vodné fáze a rozpouštědlo oddestilováno. Hned po prvním vytřepání se roztok vyčeřil (vodná fáze byla oranžová a čistá, čirá), vyloučil se však práškovitý, šedočerný podíl (PP), který byl z etheru oddělen, nakonec vytřepán v baňce 2x 400 ml etheru a ether byl přidán k etherovým výtřepkům.

#### **4.4.3. Výtřeppek B z primárního extraktu**

Sodový extrakt byl zalkalizován 50% hydroxidem sodným na pH 12,5 a tento roztok vytřepán 5x 15 litry etheru, etherové vrstvy byly spojeny, ostře odděleny od zbytku vodné fáze a rozpouštědlo oddestilováno.

#### **4.4.4. Výtřeppek J z primárního extraktu**

Vodná bazická (louhová) vrstva byla okyselena zředěnou kyselinou chlorovodíkovou (1:1, tj. asi 17%) na pH 3-3,5. K 16 litrům tohoto roztoku se přidal roztok 320 g jodidu draselného ve 480 ml vody, vše se promíchalo, za občasného třepání se nechalo 3 hodiny stát v klidu. Potom se extrakt vytřepal 5x 8,4 l chloroformu.

#### 4.4.5. Výtřepok E z primárního extraktu

Okyselená vodná fáze poskytovala ještě pozitivní reakci na Mayerovo činidlo, byla proto zalkalizována 25% amoniakem na pH 10 (na 1 litr ca 0,08 l 25% amoniaku) a vytřepána 5 x 8,4 l směsi chloroform+ EtOH 8,5:1,5 nasycené vodou. Organická vrstva byla po ostrém oddělení zahuštěna do sucha.

#### 4.4.6. Zbylý vodný extrakt

Tento vodný extrakt obsahoval už jen stopy alkaloidů (srážení - Mayerova reakce), nebyl dále použit.

Tabulka 3. Charakteristika jednotlivých typů výtřepků

Typ výtřepku	Hmotnost	Popis
A (diethylether, pH ~10)	182,0 g	Světlé medové barvy, vysoce viskózní, nekystalující
B (diethylether, pH ~12)	10,06 g	Temně hnědý, velmi viskózní s náznakem krystalů
J (CHCl <sub>3</sub> ; pH ~3,5, kvart. jodidy kyselé)	14,26 g 4,70 g	Tmavě hnědý, velmi viskózní Žlutý práškový sediment
E (CHCl <sub>3</sub> +EtOH 8,5:1,5, pH ~10, kvart. jodidy bazické)	12,45 g	Téměř černý, velmi viskózní

#### 4.5. CHELIDONIUM MAJUS L.- SEPARACE VÝTŘEPKU B

10,06 g tmavě hnědého výtřepku s náznakem vyloučených krystalů bylo rozpuštěno ve 400 ml 0,3 M kyseliny sírové, roztok byl zfiltrován přes polyamidový filtr, zalkalizován 50% hydroxidem sodným na pH ~12-12,5 a vytřepán 5x 250 ml diethyletheru. Etherový roztok byl promyt 2 x 30 ml chladné vody, po ostrém oddělení vody vysušen bezvodým síranem sodným a rozpouštědlo oddestilováno. Vzniklo 7,21 g žlutohnědého odparku s náznakem vyloučených krystalů (v práškové formě).

2 g této směsi bylo rozpuštěno v dichlormethanu, smíseno s 8 g bazického oxidu hlinitého, rozpouštědlo bylo odstraněno ve vakuu odparky (25 °C, 1,33 kPa) a roztěr byl chromatografován.

#### 4.6. CHROMATOGRAFIE VÝTŘEPKU B

##### 4.6.1. Kontrolní tenkovrstvá chromatografie výtřepku B:

Adsorbent: 2 ( desky o rozměrech 5,0 x 7,5 cm)

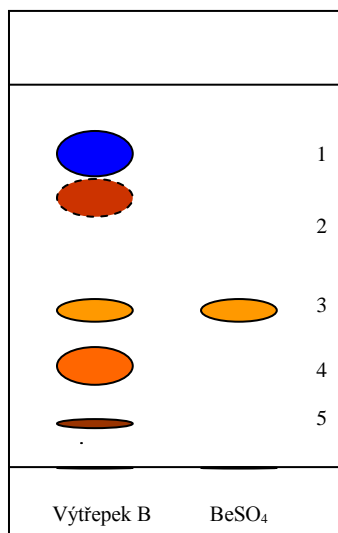
Vyvíjecí soustava: S 1

Komora nasycená, vyvíjení 2x

Detekce: D 1

Vzorky: Výtřepok B

Berberin síran (standard)



Obrázek 3: Kontrolní TLC výtřepku B

**Tabulka 4: Zóny kontrolní TLC**

Zóna	R <sub>f</sub>	Detekce	Zbarvení skvrny
1	0,82	UV 254, D 1	Modrá
2	0,68	UV 254, D 1	Hnědooranžová
3	0,41	UV 254, D 1	Světle oranžová
4	0,25	UV 254, D 1	Oranžová
5	0,1	UV 254, D 1	Hnědá

#### 4.6.2. Sloupcová chromatografie výtřepku B

**Tabulka 5: Chromatografie předčištěného výtřepku B na alkalickém oxidu hlinitém**

Navážka:	2,0 g suché směsi
Adsorbent:	Oxid hlinitý alkalický, (st. Aktivity ~III), 100-200 μm, 120 g
Vrstva s nanáškou frakce:	2,5 x 1,6 cm
Dělicí lože:	2,5 x 12 cm; sloupec byl nalit v soustavě CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> +benzín 1:1
Mrtvý objem:	60 ml
Frakce:	25 ml
Doba toku frakce:	~15 min.

**Tab. 6: Výsledky sloupcové chromatografie na alkalickém oxidu hlinitém**

Frakce	Eluční soustava	Popis	Hmotnost
1-10	Benzín+CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 50:50	Žlutohnědý, s vyloučeným práškem	0,045 g
11-26	Benzín+CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 25:75	Nahnědlý, práškovitý	0,218 g
27-46	Benzín+CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 0:100	Jasně žlutý, práškovitý	0,462 g
47-67	Benzín+CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 0:100	Jasně žlutý s vyloučeným práškem	0,518 g
68-85	Benzín+CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 0:100	Žlutohnědý s vyloučeným práškem	0,165 g

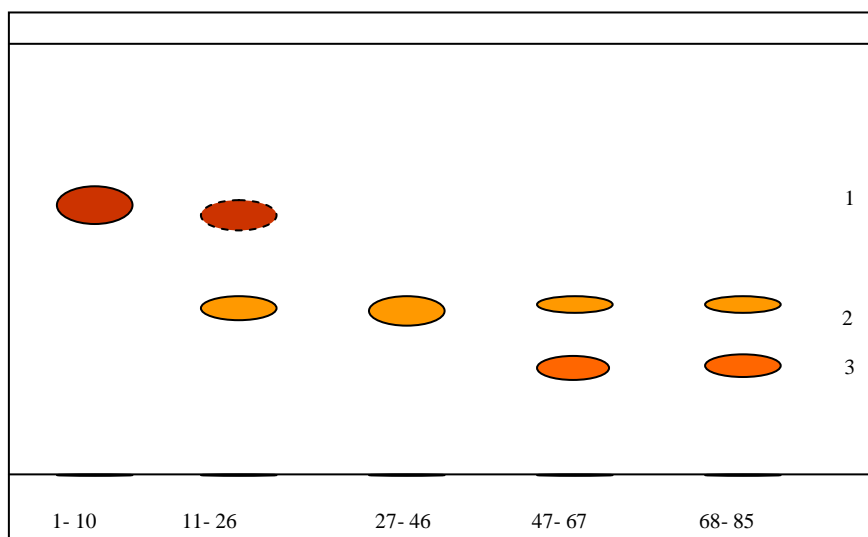
#### 4.6.3. Tenkovrstvá chromatografie jednotlivých frakcí výtřepku B:

Adsorbent: A 2 (o rozměrech 5,0 x 7,5 cm)

Vyvíjecí soustava: S 1

Komora nasycená, vyvíjení 2x

Detekce: UV 254, D 1



**Obrázek 4: Orientační TLC frakcí 1-85 při UV 254 nm**

**Tabulka 4: Zóny jednotlivých frakcí 1-85**

Zóna	R <sub>f</sub>	Detekce	Zbarvení skvrny
1	0,67	UV 254, D 1	Hnědooranžová
2	0,42	UV 254, D 1	Světle oranžová
3	0,27	UV 254, D 1	Oranžová

**4.6.4. Zpracování frakce 27- 46:**

Odparek 27- 46 byl vysušen ve vakuovém exsikátoru nad silikagelem po dobu 24 hodin. Část odparku (0,020 g) byla odložena pro barevné reakce, zbylá část (0,391 g) byla rozpuštěna ve 40 ml diethyletheru a smíchána s 10 ml diethyletherového roztoku bezvodé kyseliny sírové (v 10 ml tohoto roztoku bylo rozpuštěno 100 µl bezvodé kyseliny sírové). Vyloučil se žlutý prášek, který byl sedimentován, tekutina odsáta, sediment promyt diethyletherem, znova sedimentována, potom zfiltrována na fritě a promyt čistým diethyletherem.

Po vysušení bylo získáno 0,346 g žlutého prášku, dobře rozpustného ve vodě, označeného CH-M/B-1.

**4.7. CHARAKTERISTIKA ALKALOIDU CH-M/B-1****4.7.1. Reakce s detekčními činidly**

Látka CH-M/B-1 byla podrobena barveným reakcím na tenké vrstvě s detekčními činidly.

**Tabulka 5: Barevné reakce látky CH-M/B-1**

Látka	D 5	D 4	D 2	D 3	D 6	D 9	D 7
CH-M/B-1	Žlutá	Hnědočervená	Hnědá	Zelenohnědá	Hnědá, násl. červenohnědá	Nažloutlá	Olivově zelená
Berberin síran	Žlutá	Hnědočervená	Hnědá	Zelenohnědá	Hnědá, násl. červenohnědá	Nažloutlá	Olivově zelená

Dle výsledků barevných reakcí s danými činidly se jedná o berberin.

#### 4.7.2. Teplota tání

Měření teploty tání probíhalo následovně: malé množství etherového extraktu s tímto alkaloidem se odpařilo. Vyloučené velmi jemné krystalky se vysušily ve vakuovém exsikatoru a na Koflerově bodotávku se stanovila teplota tání.

Látka	t.t. tabelovaná [°C]	t.t. naměřená[°C]
Berberin base	145	142
Berberin síran	274	270-272

#### 4.8. VÝSLEDKY TESTU VLIVU LÁTKY CH-M/B-1NA AKTIVITU ACHE

Látka	IC <sub>50</sub> [μM]	IC <sub>50</sub> [mg/l]	95% konfidenční interval [μM]	95% konfidenční interval [mg/l]	Směrnice
CH-M/B-1	0,221	0,182	0,177 – 0,277	0,146 – 0,228	0,916

Hodnoty se udávají např.: 0,221 (0,177 – 0,277), čísla v závorce znamenají rozpětí hodnoty IC<sub>50</sub> které je tím větší, čím byla měření zatížena větší chybou. Hodnota směrnice znázorňuje „strmost“ lineární části průběhu křivky IC<sub>50</sub> a poskytuje tak podrobnější informaci o průběhu inhibice; tato hodnota nahrazuje hodnoty IC<sub>25</sub> a IC<sub>75</sub> (popř. jiné), které bývají pro tento účel obvykle používány.

Protože už je známa molekulová hmotnost látky CH-M/B-1, lze určit IC<sub>50</sub> v μM. Z naměřených hodnot je patrné, že látka vykazuje vysokou inhibiční aktivitu vůči AChE. Bude použita pozitivní kontrola galanthaminem a neostigminem, což v současné době zatím provedeno nebylo, vzhledem k tomu, že metoda je ještě rozpracována a je nutné některé její kroky upravit.

## **5. DISKUSE**



Léčba Alzheimerovy choroby je záležitost velmi svízelná a problematická; tato choroba je totiž komplexem řady patofyziologických procesů, z nichž některé na sebe navazují, některé působí zcela separátně. V současné době je hlavním terapeutickým zásahem zásah do aktivity mozkové acetylcholinesterasy. Řada sloučenin má cholinomimetické účinky velmi příznivé, prakticky jsou však bohužel nepoužitelné. Tyto účinky jsou nejen centrální, ale i periferní. Z přírodních látek přichází v úvahu pouze několik málo sloučenin; v současné době začíná být využíván jen galanthamin (Reminyl®). Velmi intenzivně se pracuje na různých galanthaminových derivátech.<sup>58</sup> Fysostigmin, který je významným cholinomimetikem, je těžko použitelný kvůli svým nežádoucím účinkům. Další velmi perspektivní přírodní látkou je alkaloid izolovaný z některých zástupců čeledi Lycopodiaceae- huperzin A. Podává se v podstatně nižších dávkách než galanthamin; jeho dosažitelnost je však současné době poněkud obtížnější, než u jiných přírodních látek. Nicméně rozsáhlé syntetické studie dokazují, že tato látka je přístupná totální syntézou.<sup>59</sup> Tato látka je velkou nadějí, protože syntetické látky v současnosti používané (dopenezil, takrin) nenaplnují terapeutické potřeby podle našich představ; takrin je v této době prakticky už léčivem „mrtvým“.

Z těchto důvodů probíhá intenzivní výzkum jak syntetických, tak přírodních látek, s ohledem na jejich schopnost reverzibilně inhibovat mozkovou AChE. Jako velmi nadějně se kromě různých syntetických látek ukazují i některé další látky; kromě již zmíněného huperzinu Cerebra® (*Huperzia errata*, Lycopodiaceae) je to např. saligenamid C (*Sarcococca saligna*, Buxaceae). Vysoký inhibiční efekt vůči AChE má také ursolová kyselina (*Majorana hortensis*, *Rosmarinus officinalis*, *Salvia officinalis*, Lamiaceae), dále látky typu Arisugacinu- Arisuguacin A (*Penicillium* sp.,  $IC_{50} = 1 \times 10^{-6}$  M), cyklofostin (*Penicillium* WK- 4164 e FO- 4259),  $\alpha$ -viniferin (*Caragana chamlague*, Fabaceae,  $IC_{50} = 2 \times 10^{-6}$  M). Významné jsou obzvláště látky typu alkaloidů- galanthamin (*Galanthus woronovii*, Amaryllidaceae), fysostigmin. Z hlediska preparativního jsou také alkaloidy atraktivní tím, že se s nimi pracuje podstatně lépe, než s neutrálními sloučeninami- lze je rychleji a méně nákladně čistit.

Jednou z rostlin, u které se vyskytly alkaloidy biologicky aktivní vůči AChE je vlašovičník větší (*Chelidonium majus* L.). V této rostlině byly objeveny alkaloidy 4 typů<sup>37</sup>:

- a) Beznofenanthridinové ( $\alpha$ -naftofenanthridinové) alkaloidy jsou charakteristické svým tetracyklickým isochinolonovým kruhovým systémem. Tato skupina se dá rozdělit na 2 podskupiny: 1. alkaloidy obsahující ve své molekule **terciární** dusík (např.

- chelidonin, homochelidonin), 2. alkaloidy s **kvarténním** dusíkem a dvěma centrálními aromatickými prstenci (sanguinarin, chelerythrin).
- b) Protoberberinové alkaloidy jsou zde zastoupeny: 1. tetrahydroprotoberberiny- jsou to **terciární** alkaloidy (např. stylopin) 2. protoberberiny- **kvarterní** alkaloidy (např. berberin, koptisin).
  - c) K protopinovým alkaloidům náleží protopin (typický pro čeleď Papaveraceae) a allokryptopin).
  - d) Kvarténní aporfiny, deriváty benzylochinolinu zde zastupuje magnoflorin a spatrein.

Výzkum vlašovičnicku se v poslední době poměrně rozšiřuje, patrně z důvodu studia antineoplastického účinku alkaloidní látky **Ukrain** (alkaloidy *Chelidonium majus* L. konjugované s kyselinou thiofosforečnou<sup>38</sup>). V souvislosti s tímto studiem je však sledována řada alkaloidů i na jiné účinky. Např. efekt benzofenanthridinových alkaloidů na lidské keratinocyty<sup>60</sup>, inhibice 5- a 12- LOX neredoxním mechanismem<sup>61</sup>, ad. V poslední době je věnována také pozornost vlivu vlašovičnickových alkaloidů na hydrolýzu acetylthiocholinu a acetylcholinestrasu (také podobných alkaloidů izolovaných z *Bocconia cordata*, Papaveraceae), zejména chelidoninu, sanguinarinu, chelerythrinu a také Ukrainu. Ukázalo se, že benzo[c]fenanthridinové alkaloidy (sanguinarin a chelerythrin) jsou poměrně účinné ( $IC_{50} = 0,2-0,3$  mM). Zajímavý účinek však vykazuje též chelidonin a Ukrain ( $IC_{50} = 2-2,5$  mM).<sup>62</sup>

V souvislosti se screeningem alkaloidních látek charakteristických pro čeledi Papaveraceae a Fumariaceae, který je prováděn na katedře farmaceutické botaniky a ekologie, byl proveden pokus o izolaci alkaloidů s cílem podrobit tyto látky testování vlivu na mozkovou AChE a v pozdější době na prolylendopeptidasu. K této izolaci bylo použito 41,8 kg celé sušené rostliny (nať a kořeny). Izolační postup byl použit jak je uvedeno v literatuře profesorem Slavíkem<sup>42,45</sup>, jehož pracovní skupina se alkaloidy z čeledi Papaveraceae (pouze z preparativního hlediska) zabývala v 50.-70.tých letech 20. století. Pro tyto izolace používala pracovní skupina sofistikovanou a velice logickou metodu: rostlinná část byla extrahována methanolem nebo ethanolem, po odstranění rozpouštědla byl odparek roztřepán se slabým roztokem kyseliny sírové a zfiltrován. Prakticky neutrální alkaloidy a neutrální znečištění byly odstraněny vytřepáním tohoto kyselého roztoku etherem, vodná vrstva byla zalkalizována uhličitánem sodným na pH cca 9-10, vyloučené alkaloidy vytřepány diethyletherem, zbylá vodná vrstva zalkalizována hydroxidem sodným na pH cca 12-12,5 a silné base vytřepány opět do etheru. Po okyselení vodného extraktu kyselinou

chlorovodíkovou a přidavku jodidu draselného byly vytvořené jodidy kvartérních basí vytřepány chloroformem („jodidy kyselé“) a kyselý vodný roztok byl opět zalkalizován amoniakem a vytřepán chloroformem, do něhož přešly „jodidy bazické“.

Z vodné vrstvy zalkalizované hydroxidem draselným přešly do etheru silně bazické látky- výtřepok B, který jsem dále zpracovávala. Obsahoval především protoberberinové alkaloidy (**berberin, koptisin**)<sup>37,38</sup>. Slavíkovo skupina postupovala při dělení následovně: k odparku přidala malé množství vody, kyseliny citrónové, za tepla odparek rozpustila a ponechala krystalizovat. Vyloučil se v převážné míře berberin, který byl odsát. V matečném louhu zůstal koptisin se zbytky berberinu. Frakční krystalizací byl získán koptisin v relativně čistém stavu. Tento postup se v mém případě ukázal jako zcela neefektivní. Výtřepok B byl temně hnědé barvy a jeho zpracování jsem provedla následovně:

10,06 g tmavě hnědého výtřepku s náznakem vyloučených krystalů jsem rozpustila v kyselině sírové, roztok jsem zfiltrovala přes polyamidový filtr, zalkalizovala hydroxidem sodným na pH ~12-12,5 a vytřepala 5x 250 ml diethyletheru. Etherový roztok jsem promyla 2 x 30 ml chladné vody, po ostrém oddělení vody vysušila bezvodým síranem sodným, rozpouštědlo oddestilovala. Vzniklo 7,21 g žlutohnědého odparku s náznakem vyloučených krystalů (v práškové formě). 2 g této směsi jsem podrobila sloupcové chromatografii na bazickém oxidu hlinitém (eluční soustava benzín+ dichlormethan). Získala jsem 5 frakcí (1-10, 11-26, 27-46, 47-67, 68-85), z nichž se po provedení tenkovstvé chromatografiejevila z hlediska obsahu alkaloidů nejbohatší frakce 27-46. Tu jsem dále zpracovávala, a to následovně: odparek frakce 27- 46 jsem vysušila ve vakuovém exsikátoru nad silikagelem po dobu 24 hodin. Část odparku část (0,391 g) jsem rozpuštěla ve 40 ml diethyletheru a smíchala s 10 ml diethyletherového roztoku bezvodé kyseliny sírové. Vyloučil se žlutý prášek, který byl sedimentován, tekutinu jsem odsála, sedimentu promyla diethyletherem, znova nechala sedimentovat. Vše jsem potom zfiltrovala na fritě a promyla čistým diethyletherem. Po vysušení jsem získala 0,346 g žlutého prášku, dobře rozpustného ve vodě, označeného CH-M/B-1.

Předpokládala jsem, na základě údajů z literatury, že vyloučený alkaloid bude **berberin**. Proto jsem provedla tenkovstvou chromatografii (adsorbent Kieselgel UV 254, vyvíjecí soustava n-PrOH+ HCOOH+ voda 90:10:9, komora nasycená, detekce Dragendorff podle Muniera) za použití standardu berberin-síranu. Ukázalo se, že můj předpoklad byl správný. Látka je berberin, jak prokázaly nakonec i barevné reakce s činidly: Erdmannovo činidlo (hnědá), Fröhdeho činidlo (zelenohnědá), kyselina dusičná koncentrovaná

(hnědočervená), kyselina sírová koncentrovaná, Mandelinovo činidlo (hnědá, následně červenohnědá), Marquisovo činidlo (olivově zelená), Wasickyho činidlo (nažloutlá). Dále jsem na Koflerově bodotávku změřila teplotu tání mnou izolovaného berberinu a berberin síranu. V porovnání s literaturou jsou naměřené hodnoty o 2-3 °C nižší, což může být způsobeno přítomností nečistot, či malého množství další látky. Na základě reakcí a teploty tání se tedy jedná o berberin, ale vyčkám na konečné potvrzení struktury spektrální analýzou. Minimálně jeden další protoberberinový alkaloid zůstává v matečném louhu nezpracován a bude zpracováván později.

Dále byl proveden test vlivu alkaloidu CH-M/B-1 na aktivitu mozkové acetylcholinesterasy. Cholinesterasy jsou kompetitivně inhibovány kvartérními látkami. Pokles aktivity je úměrný použité koncentraci inhibitoru. Stanovení aktivity enzymu je založeno na jeho reakci s nativním substrátem, kdy je tento štěpen na alkohol cholin a kyselinu octovou. Tato je při použití pH-statové instrumentace neutralizována kontinuálními přídávky roztoku hydroxidu sodného, tak aby bylo udrženo statované pH 8. Koncentrace testované látky byly zvoleny tak, aby oblast aktivit enzymu byla rovnoměrně pokryta měřicími body od stoprocentní po nulovou aktivitu. Měření byla opakována pro každou koncentraci testované látky nejméně třikrát.

U látky CH-M/B-1 byly naměřeny tyto hodnoty:  $IC_{50} = 0,221 \times 10^{-3}$  mM,  $IC_{50} = 0,182$  mg/l, 95% konfidenční interval = 0,146-0,228. Z těchto hodnot lze usoudit, že testovaná látka vykazuje vysokou inhibiční aktivitu vůči AChE. Z literatury je známé, že berberin má velký vliv na biologickou aktivitu lidské mozkové AChE.<sup>62,63</sup> Mnou naměřené hodnoty tedy tuto skutečnost potvrzují.

## **6. SOUHRN**

Spolu s ostatními diplomantkami (Šárkou Brožovou, Janou Nagyovou a Evou Vítkovou) jsem provedla extrakci 41,8 kg suché nati s kořeny. Primární extrakt jsme vyčistily filtrací a následným oddestilováním rozpouštědla na vakuové odparce. Dále jsme připravily sekvenčním postupem výtřepky s jednotlivými typy alkaloidů: šlo o dva diethyletherové výtřepky (získané po předchozí alkalizaci primárního extraktu uhličitanem sodným a hydroxidem draselným), které byly následně okyseleny kyselinou chlorovodíkovou, vzniklé kvartérní jodidy po přidání jodidu draselného vytřepány chloroformem a po následné alkalizaci extraktu amoniakem získány další kvartérní jodidy vytřepáním do směsi chloroform + ethanol 8,5:1,5.

Já jsem se zabývala výtřepkem B, který obsahoval silně basické alkaloidy. Provedla jsem separaci výtřepku B pomocí sloupcové chromatografie. Zpracovávala jsem frakci 27- 46, jejíž odparek jsem po vysušení rozdělila na dvě části. První část (0,02 g) byla podrobena barevným reakcím s činidly, které prokázaly, že izolovaný alkaloid CH-M/B-1 je berberin. Dále jsem změřila teplotu tání Z druhé části odparku jsem získala 0,346 g žlutého prášku, který byl v závěru práce podroben testu vlivu látky na aktivitu AChE. Z naměřené hodnoty  $IC_{50} = 0,221$  (0,146- 0,228)  $\mu\text{M}$  je patrné, že látka CH-M/B-1 je vysoce aktivní v inhibici AChE.

## **7. LITERATURA**

- 
- <sup>1</sup> <http://www1.f1.cuni.cz/~zfishar/bp/8.2.htm>
- <sup>2</sup> <http://www.causa-subita.cz/clanek.php?akce=view&clanekid=255&r=6&c=2>
- <sup>3</sup> [http://66.249.93.104/search?q=cache:65ne-j0Y75sJ:www.zdravcentra.cz/cps/rde/xbcr/zc/2005\\_6\\_FTP\\_03.pdf+du%C3%A1ln%C3%AD+inhibitor&hl=cs&ct=clnk&cd=2](http://66.249.93.104/search?q=cache:65ne-j0Y75sJ:www.zdravcentra.cz/cps/rde/xbcr/zc/2005_6_FTP_03.pdf+du%C3%A1ln%C3%AD+inhibitor&hl=cs&ct=clnk&cd=2)
- <sup>4</sup> <http://www.stopstigmapsychiatrie.cz/alzheimer/index.html>
- <sup>5</sup> Opletalová, V., Opletal, L., Kuča, K., Jun, D.: Sborník Abstraktů z 34. konference Syntézy a Analýzy léčiv: Pokroky ve vývoji cholinergik pro léčbu Alzheimerovy choroby, Brno, 12.- 14. 9. 2005, s. 27.
- <sup>6</sup> Silbernagl, S., Lang, F.: Atlas patofyziologie člověka, Grada Publishing, spol. s.r.o., Praha 2001, s. 348-349.
- <sup>7</sup> Patočka, J.: Memantin a jeho terapeutický potenciál u degenerativních poruch CNS. *Psychiatrie*, 6 (1), 35–40 (2002).
- <sup>8</sup> Lincová, D., Farghali, H. et al.: Základní a aplikovaná farmakologie, kap. 7, Látky ovlivňující centrální nervový systém, vydání 1., Galén, 2002.
- <sup>9</sup> Jiráček, R.: Současné trendy v biologické terapii Alzheimerovy choroby. *Psychiatrie pro praxi*, 2006, s. 8-11
- <sup>10</sup> Grieg, N. H., Lahiri, D. K., Sambamurti, K.: Butyrylcholinesterase: an important new target in Alzheimer's disease therapy. *Int Psychogeriatr.*, 14 (suppl 1), 77-91 (2002).
- <sup>11</sup> Giacobini, E.: Cholinesterases: new roles in brain function and in Alzheimer's disease, *Neurochem. Res.* 28(3-4), 515-22 (2003).
- <sup>12</sup> Ivách, B., Haen, E.: Acetylcholinesterase inhibition in Alzheimer's disease. *Curr. Pharm. Des.*, 10 (3), 231-251 (2004).
- <sup>13</sup> Gauthier, S., Emíre, M., Farlow, M. R., Bullock, R., Grossberg, G. T., Potkin, S. G.: Strategie for continued successful treatment of Alzheimer's disease: switching cholinesterase inhibitors. *Curr Med Res Opin.*, 19 (8), 707-14 (2003).
- <sup>14</sup> Liston, D. R., Nielsen, J. A., Villalobos, A., Chapin, D., Jones, S. B., Hubbard, S. T., Shalaby, I. A., Ramirez, A., Nason, D., White, W. F.: Pharmacology of selective acetylcholinesterase inhibitors: implications for use in Alzheimer's disease. *Eur J Pharmacol.*, 486 (1), 9-17 (2004).
- <sup>15</sup> Abe, Y., Aoyagi, A., Hara, T., Abe, K., Zamazali, R., Kumage, Y., Naruto, S., Koyama, K., Marumoto, S., Tago, K., Toda, N., Takami, K., Yamada, N., Ori, M., Kogen, H., Kaneko, T.: Pharmacological characterization of RS-1259 an orally active dual inhibitor of acetylcholinesterase and serotonin transporter, in rodents: possible treatment of Alzheimer's disease. *J Pharmacol Sci.*, 93 (1), 95-105 (2003).
- <sup>16</sup> Toda, N., Tago, K., Marumoto, S., Takami, K., Ori, M., Yamada, N., Koyama, K., Naruto, S., Abe, K., Zamazali, R., Hara, T., Aoyagi, A., Abe, Y., Kaneko, T., Kogen, H.: A conformational restriction approach to the development of dual inhibitor of acetylcholinesterase and serotonin transporter as potential agents for Alzheimer's disease. *Bioorg Med Chem.*, 11 (20), 4389-415 (2003).
- <sup>17</sup> <http://www.tigis.cz/PSYCHIAT/SUPL0102/04.htm>
- <sup>18</sup> Maelicke, A.: Allosteric modulation of nicotinic receptors as a treatment strategy for Alzheimer's disease. *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders*, 11 (Suppl. 1), 11-18 (2000).
- <sup>19</sup> Opletal, L., Opletalová, V., Jun, D., Kuča, K.: Sborník abstraktů z 34. konference Syntézy a analýzy léčiv: Současné uplatnění některých přírodních látek v terapii demencí Alzheimerova typu, Brno, 12.- 14. září, 2005, s. 26.



- 
- <sup>20</sup> <http://www.aislp.cz>
- <sup>21</sup> <http://www.tigis.cz/PSYCHIAT/PSYCH299/10svestk.htm>
- <sup>22</sup> Mills, C., Clary, B. L., Gilmer, J. F., Walsh, J. J.: Inhibition of acetylcholinesterase by Tea Tree Oil. *J Pharm Pharmacol.*, 56 (3), 375-9 (2004).
- <sup>23</sup> Zaheer-Ul-Haq, Z. U., Wellenzon, B., Riedl, K. R., Rode, B. M.: Molecular docking studies of natural cholinesterase-inhibiting steroidal alkaloids from *Sarcococca saligna*. *J Med Chem.*, 46 (28), 5087-90 (2003).
- <sup>24</sup> Orhan, I., Terzioglu, S., Sener, B.: Sloha-onoceri: an acetylcholinesterase inhibitor from *Lycopodium clavatum*. *Planta Med.*, 69 (3), 265-7 (2003).
- <sup>25</sup> Lamirault, L., Guillou, C., Thal, C., Simon, H.: (-)-9-dehydrogalanthaminium bromide, a new cholinesterase inhibitor, enhances place and object recognition memory in young and old rats. *Neurobiol Lezen Mem.*, 80 (2), 113-22 (2003).
- <sup>26</sup> Piotrovsky, V., Van Peer, A., Van Osselaer, N., Armstrong, M., Aereens, J.: Galanthamine population pharmacokinetics in patients with Alzheimer's disease: modeling and simulations. *J Clin Pharmacol.*, 43 (5), 514-23 (2003).
- <sup>27</sup> Corey-Bloom, J.: Galanthamine: a review of its use in Alzheimer's disease and vascular dementia. *Int J Clin Pract.*, 57 (3), 219-23 (2003).
- <sup>28</sup> Simon, B. B., Knuckley, B., Powell, D. A.: Galantamine facilitates acquisition of a trace-conditioned eyeblink response in healthy, young rabbits. *Lezen Mem.*, 11 (1), 116-22 (2004).
- <sup>29</sup> Wang, L. S., Zhou, J., Shao, X. M., Tang, X. C.: Huperzine A attenuates cognitive deficits and brain injury after hypoxia-ischemic brain damage in neonatal rats. *Zhonghua Er Ke Za Zhi.*, 41 (1), 42-5 (2003).
- <sup>30</sup> Zangara, A.: The psychopharmacology of huperzine A: an alkaloid with cognitive enhancing and neuroprotective properties of interest in the treatment of Alzheimer's disease. *Pharmacol Biochem Nebav.*, 75 (3), 675-86 (2003).
- <sup>31</sup> Kelly, S. A., Foricher, Y., Mann, J., Bentley, J. M.: A convergent approach to huperzine A and analogues. *Org biomol Chem.*, 1 (16), 2865-76 (2003).
- <sup>32</sup> Jin, G., Luo, X., He, X., Jian, H., Zhang, H., Bai, D.: Synthesis and docking studies of alkylene-linked dimers of (-)-huperzine A. *Arzneimittelforschung.*, 53 (11), 753-7 (2003).
- <sup>33</sup> Darvesh, S., Walsh, R., Martin, E.: Enantiomer effects of huperzine A on the aryl acylamidase activity of human cholinesterases. *Cell Mol Neurobiol.*, 23 (1), 93-100 (2003).
- <sup>34</sup> Cordato, D. J., Mather, L. E., Herkes, G. K.: Stereochemistry in clinical medicine: a neurological perspective. *J Clin Neurosci.*, 10 (6), 649-54 (2003).
- <sup>35</sup> <http://www.pace.cz/source.php?id=15&page=1>
- <sup>36</sup> <http://www.kvetenacr.cz/detail.asp?IDdetail=158>
- <sup>37</sup> Blaschek, W., Ebel, S., Hackenthal, E., Holtzgrabe, U., Kellner, K., Reichling, J., Schnetz, V. et al.: Hager ROM 2004: Hager's Handbuch der Drogen und Arzneistoffe, Springer & Info II Uni. Würzburg, Würzburg, 2005.
- <sup>38</sup> Táborská, E., Bochořáková, H., Dostál, J., Paulová, H.: Vlastovičník větší (*Chelidonium majus* L.) - přehled současného stavu poznatků. *Čes. a Slov. Farm.*, 44 (2), 71-75 (1995).

- 
- <sup>39</sup> Hejný, S., Slavík, B.: Květena České republiky 1, 2.vydání, Academica, Praha 1997.
- <sup>40</sup> Dostal, J., Slavík, J.: Some aspects of the chemistry of quaternary benzo[c]phenanthridine alkaloids. *Studies in Natural Products Chemistry*, 27 (Bioactive Natural Products, Part H) 2002, s. 155-184.
- <sup>41</sup> Then, M., Szentmihályi, K., Sarkozi, A., Illes, V., Forgacs, E.: Effect of sample handling on alkaloid and mineral content of aqueous extracts of greater celandine (*Chelidonium majus* L.). *J. Chromatogr.*, 889 (1+2), 69-74 (2000).
- <sup>42</sup> Slavík, J., Slavíková, L.: Minor alkaloids from *Chelidonium majus* L. *Collection Czechoslov. Chem. Commun.*, 42, 2686 – 93 (1977).
- <sup>43</sup> Shafiee, A., Jafarabadi, A. H.: Corydine and norcorydine from the roots of *Chelidonium majus*. *Planta Med.*, 64 (5), 489 (1998).
- <sup>44</sup> Kim, M. S., Hwang, B. Y., Choe, S. G., Lee, M. K., Ro, J. S., Lee, K. S.: Alkaloidal components of *Chelidonium fructus*. *Saengyak Hakhoechi*, 31 (4), 390-393 (2000).
- <sup>45</sup> Slavík, J.: Alkaloidy rostlin makovitých (Papaveraceae) I.- Látky z vlaštovičníku (*Chelidonium majus* L.) *Českosl. Farm.*, 1, 15-17 (1954).
- <sup>46</sup> Sarkozi, A., Then, M., Szentmihályi, K.: Mineral element content of greater celandine (*Chelidonium majus* L.). *Acta Alimentaria*, 34 (2), 113-120 (2005).
- <sup>47</sup> Szentmihályi, K., Sarkozi, A., Then, M.: Variations in macro- and microelements content as well as in alkaloids in *Chelidonium majus* L. plant and its extract. *Olaj, Szappan, Kosmetika*, 51 (1), 33-37 (2002).
- <sup>48</sup> Buzyk, G. N., Lovkova, M. Y., Sokolova, S. M., Tyutekin, Y. V.: Determination of correlations between the content of alkaloids and the content of mineral and trace elements with the help of mathematical modeling. *Doklady Akademii Nauk.*, 376 (5), 690-93 (2001).
- <sup>49</sup> Ulrichová, J., Walterová, D., Preninger, V., Šimánek, V.: Inhibition of butyrylcholinesterase activity by some isochinoline alkaloids. *Planta Med.*, 48, 174-77 (1983).
- <sup>50</sup> Doc. Opletal, dosud nepublikováno
- <sup>51</sup> Zahriychuk, O.: Austria-Ukraine, a thiophosphoric acid derivative of alkaloids of *Chelidonium majus* L., is effective in the treatment of recurrent bronchopulmonary pathology in children from areas contaminated after the Chernobyl accident. *International Journal of Immunotherapy*, 19 (2-4), 47-53 (2003).
- <sup>52</sup> Jang, S. I., Kim, B. H., Lee, W. Y., An, S. J., Choi, H. G., Jeon, B. H., Chung, H. T., Rho, J. R., Kim, Y. J., Chai, K. Y.: Stylopine from *Chelidonium majus* inhibits LPS-induced inflammatory mediators in RAW 264.7 cells. *Archives of Pharmacal Research*, 27 (9), 923-29 (2004).
- <sup>53</sup> Stahl, E.: *Thin-layer Chromatography, A Laboratory Handbook*. Springer – Verlag Berlin, Heidelberg, New York 1999, s. 873.
- <sup>54</sup> Wichtl, M.: *Die Pharmakologisch-chemische Analyse (Methoden der Analyse in der Chemie, Band 12)*, Akademische Verlagsgesellschaft, Frankfurt am Main 1971, s. 105.
- <sup>55</sup> Český lékopis 2002 (ČL 2002), vydání 1., Grada 2002.
- <sup>56</sup> Československý lékopis 4 (ČSL 4), vydání čtvrté, díl 1., Avicenum – Zdravotnické nakladatelství, n.p., Praha 1987, s. 361.
- <sup>57</sup> Kuča, K., Cabal, J., Patočka, J., Dohnal, V.: Quaternary heteroarenium salts as the competitive inhibitors of the brain acetylcholinesterase. *Letters in Drug Design and Discovery*, 1, 97-100 (2004).

- 
- <sup>58</sup> Bores, G. M., Kosley, R. W., Jr.: Galanthamine derivatives for the treatment of Alzheimer's disease. *Drugs Fut.*, 21 (6), 621-35 (1996).
- <sup>59</sup> Tang, X. C., He, X. C., Bai, D. L.: Huperzin A: a novel acetylcholinesterase inhibitor. *Drugs Fut.*, 24 (6), 647-63 (1999).
- <sup>60</sup> Vavřečková, C., Gawlik, I., Mueller, K.: Benzophenanthridine alkaloids of *Chelidonium majus*, Part 2. Potent inhibitory action against the growth of human keratinocytes. *Planta Med.*, 62 (6), 491-94 (1996).
- <sup>61</sup> Vavřečková, C., Gawlik, I., Mueller, K.: Benzophenanthridine alkaloids of *Chelidonium majus*, Part 1, Inhibition of 5- and 12-lipoxygenase by a non-redox mechanism. *Planta Med.*, 62 (5), 397-401 (1996).
- <sup>62</sup> Kuznetsova, L. P., Nikolskaya, E. B., Sochilina, E. E., Faddeeva, M. D.: Inhibition of enzymatic hydrolysis of acetylcholine with acetylcholinesterase by principal alkaloids isolated from *Chelidonium majus* and *Macleaya* and by derivative drugs. *Tsitologia*, 43 (11), 1046-50 (2001).
- <sup>63</sup> Kuznetsova, L. P., Sochilina, E. E., Faddejeva, M. D., Yagodina, O. V. (Russia): Influence of some isoquinoline alkaloids on enzymatic activities of acetylcholinesterase and monoamine oxidase. *Ukrains'kii Biokhimichnyi Zhurnal*, 77(2), 147-153 (2005).