

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

DIPLOMOVÁ PRÁCE

**BIOLOGICKÁ AKTIVITA OBSAHOVÝCH LÁTEK ROSTLIN IV.
VLIV ALKALOIDŮ Z *CHELIDONIUM MAJUS* L. NA
ACETYLCHOLINESTERÁZU**

**BIOLOGICAL ACTIVITY OF PLANT METABOLITES IV.
INFLUENCE OF ALKALOIDS FROM *CHELIDONIUM MAJUS* L. ON
ACETYLCHOLINESTERASE**

Školitel: doc. RNDr. Lubomír Opletal, CSc.

HRADEC KRÁLOVÉ, KVĚTEN 2006

JANA NAGYOVÁ

Děkuji panu doc. RNDr. Lubomíru Opletalovi, CSc. za vedení, odbornou literaturu, materiály, poskytnutí cenných rad, zkušeností a připomínek při vypracování mé diplomové práce a rovněž ostatním pracovníkům Katedry farmaceutické botaniky a ekologie. Dále děkuji Mgr. Danielu Junovi, PhD. a Ing. Kamilu Kučovi, PhD. (Univerzita obrany v Praze, fakulta vojenského zdravotnictví v Hradci Králové) za změření biologické aktivity izolované látky a propracování použité metody. A také děkuji svým rodičům a příteli Radkovi.

OBSAH

1. ÚVOD	5
2. CÍL PRÁCE	8
3. TEORETICKÁ ČÁST	10
3.1. ALZHEIMEROVA DEMENCE A JEJÍ TERAPIE	11
3.1.1. Alzheimerova demence	11
3.1.2. Terapie	13
3.1.2.1. Kognitivní farmakoterapie	13
3.1.2.2. Nekognitivní farmakoterapie	16
3.2. VLIV ACETYLCHOLINESTERÁZY A BUTYRYLCHOLINESTERÁZY	16
3.3. INHIBITORY ACETYLCHOLINESTERÁZY	16
3.4. CHELIDONIUM MAJUS	18
3.4.1. Systematika	19
3.4.2. Botanický popis	19
3.4.3. Obsahové látky	20
3.4.3.1. Alkaloidy	20
3.4.3.2. Nealkaloidní sekundární metabolity	25
3.4.4. Využití rostliny v praxi	25
3.4.4.1. Farmakologické účinky	26
3.4.4.1.1. Protinádorové a antivirové působení	26
3.4.4.1.2. Hepatotropní a spasmolytické účinky	27
3.4.4.2. Biologické účinky hlavních obsahových látek	28
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST A VÝSLEDKY	30
4.1. VŠEOBECNÉ POSTUPY	31
4.1.1. Destilace	31
4.1.2. Odpařování	31
4.1.3. Chromatografie	31
4.1.3.1. Kolonová (sloupcová) chromatografie	31
4.1.3.2. Tenkovrstvá chromatografie (TLC)	31
4.2. POTŘEBY	32
4.2.1. Rozpouštědla	32
4.2.2. Chemikálie	32
4.2.3. Detekční činidla	33

4.2.4. Vyvíjecí soustavy pro tenkovrstvou chromatografii	33
4.2.5. Chromatografické absorbenty	33
4.3. BIOCHEMICKÁ ČÁST	34
4.3.1. Stanovení inhibice aktivity acetylcholinesterázy	34
4.3.2. Biologický materiál	34
4.3.3. Přístroje	34
4.3.4. Příprava homogenátů	34
4.3.5. Inhibice cholinesteráz	35
4.3.6. Matematické zpracování experimentálních dat	35
4.4. IZOLACE	35
4.4.1. Materiál	35
4.4.2. Příprava extraktu a jeho čištění	36
4.4.2.1. Výtřepok A z primárního extraktu	37
4.4.2.2. Výtřepok B z primárního extraktu	37
4.4.2.3. Výtřepok J z primárního extraktu	37
4.4.2.4. Výtřepok E z primárního extraktu	37
4.4.2.5. Zbylý vodný extrakt	38
4.4.2.6. Chelidonium majus – dělení surového výtřepku A	38
4.4.3. Chromatografie výtřepku A (AC ₁ –alkaloidy z chloridů rozpustných)	41
4.4.4. Tenkovrstvá chromatografie	44
4.5. PŘEHLED IZOLOVANÝCH LÁTEK	46
4.5.1. Teplota tání	46
4.5.2. IČ spektrum	47
4.5.3. Výsledky testů vlivu látky CH-M/A-2 na aktivitu acetylcholinesterázy	48
5. DISKUSE	49
6. SOUHRN	54
7. LITERATURA	56

1. ÚVOD

Problémem dnešní doby jsou bezesporu civilizační choroby, zejména onemocnění srdce a cév, žaludku a žlučníku, poruchy imunity, nádory, ale i další nemoci jako jsou deprese a neurodegenerativní poruchy. Jedná se o skupinu onemocnění, kterou můžeme do určité míry sami ovlivnit. Nezdravý životní styl, nadměrná konzumace alkoholu, nedostatek přiměřeného pohybu, vyvážené stravy, duševní pohody a schopnosti relaxovat a odpočívat nám způsobuje značné zdravotní potíže. Je známo, že jednou z možných příčin civilizačních nemocí je zvýšená hladina homocysteinu způsobená nedostatkem kyseliny listové, pyridoxinu (vit. B₆), případně vit. B₂ a B₁₂. To může být dáno úbytkem zastoupení těchto látek v denní skladbě stravy nebo jejich sníženou resorpcí ze zažívacího ústrojí. Snížení je přímo úměrné množství spolupřítomného tuku. Dalším možným faktorem vzniku onemocnění jsou genetické dispozice. V neposlední řadě je to již zmíněný životní styl.

Velké komplikace způsobují rovněž neurodegenerativní poruchy jako Parkinsonova choroba či Alzheimerova demence.

V případě Parkinsonovy choroby se jedná o předčasné stárnutí určité skupiny buněk v mozku zvaných bazální ganglia. Tyto buňky jsou důležité, protože mají spojitost s řízením svalové aktivity a jejich předčasné odumírání způsobuje nevyhnutelné problémy. U pacientů s touto nemocí můžeme sledovat klidový třes rukou, při chůzi drobné krůčky, nebezpečné mohou být pády těchto pacientů, protože jsou ovlivněny také obranné pohyby rukou při pádu. Intelekt nebývá zpočátku narušen, ale po několikaletém trvání nemoci mohou mít problémy při řešení úloh vyžadujících složitější myšlení.

Alzheimerova demence je onemocnění, které se projevuje nejprve velmi nenápadně. Bývá často spojováno s normálním stárnutím. Pacienti mají problémy s krátkodobou pamětí, později i s dlouhodobou, bývají zmatení a dezorientováni, mají problémy s prostorovou orientací, nepoznávají prostředí, ve kterém jsou, ani své blízké. Je postižena i emoční stránka pacienta, přestávají o sebe dbát a dochází k degradaci osobnosti.

Příčiny vzniku Alzheimerovy demence nejsou zcela přesně známy. Podílí se na nich celá řada faktorů. Určitou roli hrají genetické dispozice, dále také vliv prostředí a životního stylu. Mezi některé rizikové faktory patří např. úrazy hlavy, kouření, nezdravý životní styl, hlavně nedostatek pohybu, stres, přejídání tučnými jídly,

nedostatečná konzumace ovoce a zeleniny, nadměrná konzumace alkoholu. Negativní dopad má také neúměrná spotřeba léků jako jsou hypnotika, sedativa, antidepressiva. Svou roli může hrát i intelekt a nízká duševní aktivita. To vše přispívá k rozvoji Alzheimerovy demence.

Při tomto onemocnění bývá nejvíce postižen acetylcholinergní systém, a proto se hledají léčivé látky působící právě v této oblasti. I na poli přírodních látek se provádí řada výzkumů zabývajících se touto problematikou. Jednou z rostlin, jejíž obsahové látky ovlivňují acetylcholinesterázu, je *Chelidonium majus* L. z čeledi Papaveraceae. Právě alkaloidy izolované z kořene nebo nati vlaštovičnicku většího by mohly být jednou z možností léčby této demence.

2. CÍL PRÁCE

Cílem diplomové práce bylo spolu s dalšími diplomantkami (Šárkou Brožovou, Evou Vítkovou a Dagmar Kubincovou):

1. provést extrakci 41,8 kg suché nati s kořeny z celé sušené rostliny *Chelidonium majus*, zhruba tento primární extrakt vyčistit (oddestilování rozpouštědla, filtrace) a připravit sekvenčním postupem výtřepky s jednotlivými typy alkaloidů: dva etherové výtřepky (po alkalizaci primárního extraktu uhličitanem sodným a hydroxidem sodným), chloroformem (po okyselení kyselinou chlorovodíkovou a přidání jodidu draselného) a směsí chloroform+ethanol 8,5:1,5 (po alkalizaci extraktu amoniakem),
2. zpracovat část etherového 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 acetylcholinesteráze (z homogenátu mozku) *in vitro*.

3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1. Alzheimerova demence a její terapie

Acetylcholinesteráza je enzym, který odbourává acetylcholin v CNS. Nedostatek acetylcholinu v CNS se podílí na rozvoji demence. Demencemi nazýváme choroby, které postihují zejména paměť, intelekt a jiné kognitivní funkce. Podle příčiny je lze rozdělit do tří skupin:

- a) atroficko-degenerativní demence (Alzheimerova nemoc, korová nemoc s Lewyho tělísky, demence při Parkinsonově chorobě aj.),
- b) ischemicko-vaskulární demence vznikající jako následek cévních postižení mozku,
- c) další symptomatické demence, které jsou způsobeny postižením mozkové funkce v následku jiných chorob, zranění mozku nebo intoxikacemi.¹

3.1.1. Alzheimerova demence

Alzheimerova nemoc (AD) tvoří 50 – 60 % všech demencí. Od běžných změn provázejících stárnutí se AD liší tím, že je to progresivní neurodegenerativní proces, který zahrnuje degeneraci a destrukci neuronů především v oblasti cholinergního systému. Klíčovým příznakem je porucha vyšších korových funkcí. Nemoc je spojena s progresivním úbytkem kognitivních schopností, postupnou ztrátou paměti, neschopností vykonávat každodenní aktivity.

AD můžeme rozdělit na tři stadia:

- 1) mírná forma – zhoršování paměti, přechodná časová dezorientace, neschopnost vybavit si, který je den, měsíc, rok, prostorová dezorientace, ztráta iniciativy, pokles zájmu o zaměstnání a koníčky, stále obtížnější rozhodování, obtížné hledání slov,
- 2) středně těžká forma – významné výpadky paměti, snížená schopnost postarat se sám o sebe, zhoršení řečových schopností, halucinace, bludy,
- 3) těžká forma – úplná závislost, obtíže při příjmu potravy, neschopnost rozpoznat přátele, členy vlastní rodiny, obtíže s chůzí, inkontinence moči a/nebo stolice.

Příčiny AD zůstávají dosud neobjasněny, předpokládá se vliv řady faktorů, které mohou onemocnění navodit nebo k němu přispívat ve vzájemné součinnosti: genetické faktory, zánětlivé faktory, porucha imunitního systému, neúplná nebo nekonvenční virová infekce, environmetnální faktory, např. neurotoxický vliv

některých chemických látek. Mezi rizikové faktory AD patří: věk, ženské pohlaví, možným rizikem je nízká úroveň vzdělání, deprese, úraz hlavy v anamnéze, hladovění, expozice toxických látek, genetická dědičnost.

V průběhu normálního stárnutí klesá hmotnost i objem mozku, pokles se projevuje zejména po 55. roce života. S věkem se rovněž snižuje tloušťka mozkové kůry a po 60. roce věku se rozšiřují mozkové komory. V průběhu AD probíhají podobně změny jako při normálním stárnutí. Numerická atrofie neuronů v průběhu AD převyšuje numerickou atrofii u normálního stárnutí o 40 – 80 %. Nejpostiženější je spánkový lalok.

Charakteristickým, patologickým nálezem v mozkové tkáni pacientů s AD jsou extracelulární senilní plaky a intracelulární depozita neuronálních klubek.²

Důležitou roli při AD hraje extracelulární ukládání degenerativního proteinu β - amyloidu. Tento protein vzniká z bílkoviny tělu vlastní (z amyloidového prekursorového proteinu APP, který je obsažen v neuronech). Za normálních podmínek je APP štěpen na krátké rozpustné částice α - a β - sekretázou. Za patologických podmínek se uplatňuje χ - sekretáza, štěpící delší fragmenty, které mají tendenci ke koagulaci a tak dochází k tvorbě β - amyloidu. Shluky β - amyloidu tvoří základ senilních tzv. Alzheimerových plaků. V placích dochází okolo drúz amyloidu k odumírání neuronů. Jsou aktivovány gliové buňky, které začnou produkovat cytokiny, reaktivní formy kyslíku a další látky akutní zánětlivé fáze. Dochází k aktivaci enzymu cyklooxygenázy II a tím ke zvýšené tvorbě prostaglandinů. Uvolněné zánětlivé reaktanty vedou k dalšímu poškození neuronů. Reaktivní formy kyslíku způsobují peroxidaci lipidů neuronální membrány a rovněž poškozují neurony.

Neuronální klubka (tangles) jsou synonymem pojmu Alzheimerovy změny neurofibril. V mikroskopu se jeví jako párová spirální vlákna a jejich podstatnou součástí je τ - protein. Tento protein, spjatý s neuronálními mikrotubuly, degeneruje odštěpením krajních aminokyselin, látka pak vytváří filamenta, která jsou základem neuronálních klubek.

V patogenezi AD se může uplatňovat oxidační stres a reaktivní formy kyslíku. To jsou atomy nebo molekuly, které jsou vedlejším produktem oxidačních a redukčních reakcí a jsou nositeli nepárového elektronu. Některé volné radikály jsou vysoce reaktivní a mohou poškodit DNA, buněčné proteiny, lipidy membrán. Volné kyslíkové

radikály jsou součástí patogenetického řetězu, ale není zcela jasné, zda jsou jeho příčinou či následkem.²

Apolipoprotein E (ApoE) je protein, který se podílí na redistribuci lipidů mezi buňkami jednotlivých orgánů i mezi buňkami téhož orgánu. Gen pro ApoE se vyskytuje ve třech podobách, které kódují vznik tří různých izoform ApoE 2, ApoE 3, ApoE 4. Nosičství alely ApoE 4 je význačným rizikovým faktorem vzniku AD.

Z neurotransmitterových systémů je nejvíce postižen systém acetylcholinergní. Typicky je postižena presynaptická oblast, je snížena aktivita enzymu syntetizujícího acetylcholin (cholinacetyltransferáza), je snížen vstup prekurzorů (cholin, acetylkoenzym A), zpětné vychytávání acetylcholinu i jeho uvolnění z presynaptického zakončení. Z dalších systémů je postižen systém serotoninergní, je snížena hladina somatostatinu. S věkem klesá i syntéza dopaminu a stoupá jeho inaktivace monoaminoxidázami (MAO). Zvláště stoupá aktivita MAO typu B, jak s věkem, tak výrazněji u AD.²

3.1.2. Terapie

Terapie AD je komplexní, zahrnuje farmakoterapii, psychoterapii a socioterapii, léčbu interkurrentních onemocnění, rehabilitaci a spolupráci s rodinou a pečovateli nemocného. Farmakoterapii lze zhruba (ale ne zcela přesně) rozdělit do dvou základních skupin:

- a) farmakoterapie kognitivních funkcí (intelekt, paměť, motivace),
- b) farmakoterapie nekognitivních funkcí (ovlivnění ostatních, druhotně postižených psychických funkcí, jako např. emotivity, spánku, delírií).

3.1.2.1. Kognitivní farmakoterapie

I. Substituce nedostatkovými neurotransmitery nebo neuromodulátory

- Podávání prekurzorů

Substituce samotným acetylcholinem není možná pro jeho příliš krátký poločas, cholin se nepoužívá, protože může působit depresogenně. Používají se proto různé typy lecitinu. Z lecitinu se postupně uvolňuje cholin pro syntézu acetylcholinu.

- Podávání inhibitorů acetylcholinesterázy

Acetylcholinesteráza je enzym, který odbourává acetylcholin, jejím zablokováním se zvýší množství acetylcholinu schopného vazby na receptory. Důležité je, aby tyto látky specificky blokovaly mozkovou acetylcholinesterázu bez ovlivnění její periferní formy² (na periférii převládá butyrylcholinesteráza).³ To by totiž mohlo vést k řadě nežádoucích účinků, jako např. svalové křeče, průjemy, pocení, tachyarytmie.

V současnosti se používají preparáty z několika chemických skupin:

- a) karbamáty - fysostigmin se dnes používá pouze experimentálně, dále např. rivastigmin, eptastigmin;
- b) piperidinové deriváty - donepezil;
- c) akridinové deriváty - takrin (byla zjištěna určitá hepatotoxicita, která je však malá), 7-metoxytakrin byl vyvinut u nás, nebyl však dokončen klinický výzkum;
- d) alkaloidy - galanthamin (udává se duální mechanismus účinku, jednak je selektivním inhibitorem mozkové acetylcholinesterázy a dále zesiluje vlastní účinek acetylcholinu na nikotinové receptory), dále např. perspektivní huperzin A.

- Podávání stimulatorů muskarinových a nikotinových receptorů

Bylo zjištěno, že příznivý efekt mají agonisté muskarinových M1 a M3 receptorů. Látky působící na M2 receptorech kognitivní funkce poškozují. Např. xanomelin, milamelin.

- Ovlivnění acetylcholinergního systému prostřednictvím jiných neurotransmitterových systémů.
- Další látky ovlivňující acetylcholinergní systém

Indeloxazin stimuluje uvolnění acetylcholinu z presynaptického zakončení. Acetyl-L-karnitin zlepšuje příjem prekurzorů pro syntézu acetylcholinu do neuronů.²

II. Ovlivnění neuronálního metabolismu

U pacientů s AD bývá popisován snížený neuronální metabolismus, zejména oxidativní metabolismus glukózy a buněčná proteosyntéza. V terapii se používají např. piracetam, pyritinol, nicergolin, Extraktum ginkgo bilobae.²

III. Scavengery (zametači) reaktivních forem kyslíku

V patogenezi AD hraje roli působení volných kyslíkových radikálů, což jsou velmi reaktivní formy molekul různých látek; mezi nejreaktivnější patří singletový kyslík, hydroxylový ion, superoxid, oxid dusnatý. Odstraňovány jsou pomocí enzymů

superoxiddismutázy, katalázy a glutathionperoxidázy. Za patologických podmínek vzniká více volných kyslíkových radikálů než jsou schopny příslušné enzymy zpracovat a radikály poškozují řadu jiných enzymů, způsobují peroxidaci lipidů neuronální membrány a pravděpodobně se podílejí na spuštění aterosklerogeneze.²

Mezi zametače reaktivních forem kyslíku patří vitamin E, kyselina askorbová, retinol, melatonin, tzv. lazaroidy, látky odvozené od steroidních hormonů.³

IV. Ovlivnění excitotoxicity

Nadměrné působení excitačních aminokyselin (aspartát, glutamát) na NMDA-receptory (N-metyl-D-aspartátový receptor) vede ke zvýšenému vstupu kalcia do neuronů, které vede k destabilizaci vnitřního prostředí a následné smrti neuronu. Hledají se proto látky, které blokují NMDA-receptory. Takto působí některé látky obsažené v extraktu z *Ginkgo biloba*, selegilin, memantin, cykloserin.²

V. Nervové růstové faktory

Nervové růstové faktory jsou produkovány nervovým systémem, jsou důležité pro plasticitu neuronů, stimulují jejich růst (u plodu).

Cerebrolysin – podporuje funkci nervových buněk, ovlivňuje neuronální plasticitu, zvyšuje penetraci glukózy do mozkové tkáně, ovlivňuje porušený oxidativní metabolismus v mozku.²

VI. Protizánětlivé látky, estrogeny a statiny

U AD dochází k projevům zánětlivé reakce, která přispívá k zániku neuronů. Podávání protizánětlivých látek, které procházejí hematoencefalickou bariérou, pravděpodobně působí jako protektivní faktor.

Řada údajů dokládá důležitou úlohu estrogenů v procesu stárnutí, estrogeny byly považovány za protektivní faktor ke snížení rizika AD u žen, ale pozdější studie tuto protektivní roli neprokázaly.

Statiny snižují krevní hladinu cholesterolu a jiných lipidů. Poslední studie prokázaly příznivý vliv u všech forem demence.²

3.1.2.2. Nekognitivní farmakoterapie

Tento typ farmakoterapie se používá k léčbě přidružených, nekognitivních symptomů AD. Mezi takovéto příznaky náleží např. paranoidně-halucinatorní syndromy, stavy neklidu, poruchy spánku, depresivní nebo úzkostné stavy.³

3.2. Vliv acetylcholinesterázy a butyrylcholinesterázy

Acetylcholinesteráza a butyrylcholinesteráza

Savčí mozek obsahuje dvě hlavní formy cholinesteráz: acetylcholinesterázu (AChE) a butyrylcholinesterázu (BuChE). Obě formy jsou rozlišeny geneticky, strukturně a také reakční kinetikou. Butyrylcholin není fyziologickým substrátem v savčím mozku a role BuChE je dosud obtížně interpretovatelná. V lidském mozku se BuChE nachází v neuronech, gliových buňkách, stejně tak jako v neuritovém plaku a tangles u pacientů s Alzheimerovou chorobou (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.⁴ BuChE se ukázala skutečně novým cílem v terapii AD.⁵ AChE je predominantní ve zdravém mozku, BuChE hraje patrně určitou minoritní roli v regulaci hladiny mozkového acetylcholinu. V případě mozku s AD se aktivita BuChE progresivně zvyšuje, zatímco aktivita AChE zůstává nezměněna, resp. se snižuje.⁵

3.3. Inhibitory acetylcholinesterázy (AChEI)

Inhibitory acetylcholinesterázy různé struktury jsou významnými látkami pro ovlivňování demence Alzheimerova typu. Nové inhibitory AChE mohou přinést poznání ke struktuře těchto léčiv nového typu a usnadnit tak poznání interakce mezi inhibitory a enzymem. V současnosti je spektrum klinicky použitelných látek relativně úzké.^{6,7} Např. donepezil a ikopezil jsou selektivní vůči AChE, zatímco takrin a heptylfysostigmin mají vysokou aktivitu k BuChE; všechny čtyři sloučeniny zvyšují hladinu acetylcholinu v myším mozku. Donepezil a ikopezil mají však výhodnější

terapeutický index než neselektivní inhibitory takrin a heptylfysostigmin (z hlediska posouzení centrálních a periferních účinků).⁸ Atraktivní skupinou látek se zdají léčiva s duálním účinkem: inhibitory AChE a serotoninové transportery.^{9,10}

Velmi významnou roli hraje studium přírodních látek, protože 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 Oil¹¹, steroidních alkaloidů ze *Sarcococca saligna*¹², α -onocerinu z *Lycopodium clavatum*.¹³ Velmi významné je však studium (resp. použití) alkaloidů především isochinolinového typu, vyskytujících se v různých zdrojích: zástupcích čeledi Amaryllidaceae: galanthaminu a jeho současných derivátů^{14,15,16,17} a chinolinové baze z čeledi Lycopodiaceae, jako je huperzin A a jeho deriváty.^{18,19,20,21} U některých přírodních látek byla pozorována spřažená aktivita: inhibují jak AChE tak butyrylcholinesterázu (BuChE).^{12,22} Při syntéze nových léčiv tohoto typu je velmi zásadní stereochemie: terapeuticky významně aktivní jsou pouze některé stereoizomery²³ (a tento stav se uplatňuje i z hlediska ovlivnění AChE a BuChE, jak je to vidět např. u stereoizomerů huperzinu A²²). Tento faktor musí být významně zohledněn, protože jinak dochází v řadě případů k výraznému vzestupu nežádoucích účinků.

Mezi další perspektivní inhibitory acetylcholinesterázy patří např.:

Lipokrin – kombinace aminoakridinového derivátu s α -lipoovou kyselinou, inhibuje katalytickou aktivitu AChE a BuChE, inhibuje také agregaci β -amyloidu indukovanou AChE, chrání proti účinkům reaktivního kyslíku.

Ganstigmin – patří mezi pseudoirreverzibilní inhibitory, je strukturálně podobný alkaloidu genserinu, inhibuje více AChE než BuChE, zvyšuje také hladinu serotoninu a mohl by příznivě ovlivňovat deprese, které se u pacientů s AD často vyskytují, nachází se v II. fázi klinického hodnocení.

Ladostigil – kombinace rivastigminu (AChEI) a rasagilinu (MAO-B-I), zesiluje cholinergní i aminergní transmissi v CNS, má neuroprotektivní a anti-apoptotické účinky, aktivuje α -sekretázu, měl by být vhodný pro léčbu demenčních pacientů trpících zároveň depresí.²⁴

Přírodní látky působící na AChE najdeme v celé řadě rostlin různých čeledí: Salignenamid C (*Sarcococca saligna*, Buxaceae), výraznější zásah do BuChE.

Zeatin (*Fiatoua villosa*, Orchidaceae, *Zea mays*, Poaceae), inhibice tvorby β - amyloidu, přírodní cytokinin, široce rozšířen.

Dekursinol (*Angelica gigas*, Apiaceae), vysoká inhibiční aktivita vůči AChE *in vitro*.

Ursolová kyselina (*Majorana hortensis*, *Rosmarinus officinalis*, *Salvia officinalis*, Lamiaceae, Ericaceae), vysoký inhibiční efekt vůči AChE.

Dehydroevodiamin (*Evodia rutaecarpa*, Rutaceae).

Homomoenjodaramin, moenjodaramin (*Buxus hyrcana*, Buxaceae).

Cykloprotobuxin C, Cyklovirobuxein A, Cyklomikrofilin A (*Buxus papillosa*, Buxaceae).

α -Viniferin (*Caragana chamlague*, Fabaceae).

Cynatrosidy A, B, C (*Cynanchum atratum*, Ranunculaceae), signifikantní inhibice.²⁵

3.4. Vlaštovičnick větší - *Chelidonium majus* L.

Obr.1: *Chelidonium majus* L.



3.4.1. Systematika

Vlaštovičník větší (*Chelidonium majus* L.) je rostlinný druh z čeledi makovitých (Papaveraceae).

V rodu *Chelidonium majus* L. existují různé morfologické variety:

var: *crenatum*, *fumariifolium*, *majus*, *tenuifolium*.

Existují různé karyotypy: $2n = 12$, jedná se o rostliny mnoha stanovišť v Evropě a Asii; $2n = 10$, rostou v Japonsku a východní Evropě; $2n = 20$, rostoucí v Japonsku; v Polsku existuje tetraploidní vyšlechtěná odrůda $2n = 24$. Je zde pěstována a označována jako *Chelidonium majus* "Cynober".²⁶

3.4.2. Botanický popis

Vlaštovičník větší (*Chelidonium majus* L.) je hojně rozšířený v celé Evropě, ve Středomoří a v mírných až subarktických oblastech Asie. Byl zavlečen i do Severní Ameriky.²⁷

30 – 50 (70) cm vysoká rostlina, roztroušeně chlupatá, s tlustou a krátkou kořenovou hlavou s četnými kořeny. V celé rostlině jsou článkované mléčnice s oranžovou šťávou. Lodyha je přímá, oblá, dutá a rozvětvená. Listy jsou střídavé, bez palistů, dolní řapíkaté a horní přisedlé, s chobotnatě peřenodílnou až lichozpeřenou, svrchně temně, vespod sivozelenou čepelí, s křídlatým větvením. Úkrojky (lístky) jsou nesouměrné, chobotnatě vroubkované až zastříhávané. Květenstvím je chudokvětý okolík. Květy jsou obojaké, dvoučetné, dlouze stopkaté, s volnými obaly. Kališní lístky jsou 2, světle žluté, záhy opadavé a korunní 2+2, široce vejčité, vzadu dříváté, sytě žluté. Tyčinky jsou četné a žluté. Semeník je svrchní, ze 2 plodolistů, jednopouzdrý, čárkovitý a se 2 nástěnnými semeníky. Plodem je lysá, šešuli podobná tobolka pukající od stopky dvěma chlopněmi. Semena jsou vejcovitá, černá, se sítnatě dolíčkátým osemením a bílým masitým výrůstkem.²⁸ Kvete v květnu až září.²⁷

3.4.3. Obsahové látky

3.4.3.1. Alkaloidy

Hlavními obsahovými látkami vlašovičníku většího jsou alkaloidy. V rostlině jich bylo popsáno již více než třicet. Za zmínku stojí, že z tohoto počtu jich 15 poprvé izoloval a převážně určil profesor Slavík. S výjimkou sparteinu patří popsané alkaloidy k derivátům izochinolinu. Jejich přehled uvádí tabulka 1.²⁷

Tab.1 Alkaloidy izolované z *Chelidonium majus* L.

Alkaloid		Kořen	Nadzemní část
Kvartérní benzo[c]fenanthridiny	Sanguinarin	+++	+++
	Chelerythrin	+++	+++
	Chelirubin	+	+
	Chelilutin	+	+
	Makarpin	+	+
Terciární benzo[c]fenanthrididiny	Chelidonin	+++	+++
	Homochelidonin	++	+
	Chelamin	+	-
	Chelamidin	+	-
	Dihydrosanguinarin	+	+
	Dihydrochelerythrin	+	+
	Dihydrochelirubin	+	-
	Dihydrochelilutin	+	-
	N-Demetyl-9,10-dihydrooxysanguinarin	+	-
	Chelidimerin	?	?
	Norchelidonin	+	+
	Izochelidonin	-	+
	Oxysanguinarin	+	-
	„Methoxychelidonin“*	-	-
Terciární protoberberiny	Stylopin	++	++ až +++
Kvartérní protoberberiny	Methylstylopinium	+	+
	Berberin	++	+++
	Koptisin	+++	+++
	Korysamin	+	+
Protopiny	Protopin	++	+
	Allokryptopin	++	+
Kvartérní aporfiny	Magnoflorin	+++	-
	Turkiyenin	+	+
	Sparteín	?	?

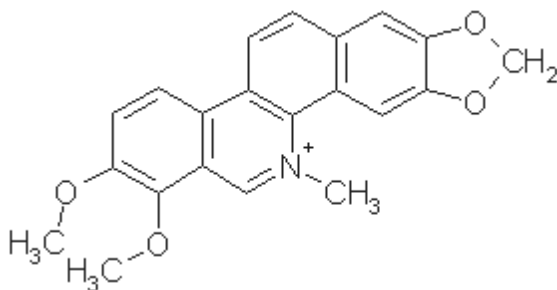
Pozn:* Methoxychelidonin není individuální alkaloid, ale směs homochelidoninu, chelaminu a chelamidinu.

Je známo, že distribuce alkaloidů v rostlině je nerovnoměrná, mění se v průběhu vegetace, v závislosti na klimatických podmínkách a stáří rostliny. Nejbohatším orgánem je kořen, obsah alkaloidů v něm často dosahuje až 2 - 3 %, kulminuje na konci vegetačního období, zatímco při kvetení rostliny klesá. U víceletých rostlin je obsah alkaloidů v kořeni výrazně vyšší než v prvním roce vegetace.

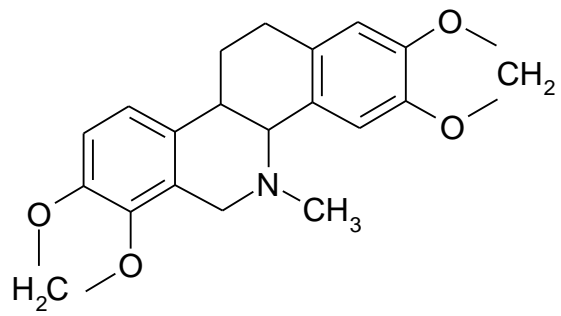
Hlavními alkaloidy kořene jsou koptisin a chelidonin, významný je i obsah sanguinarinu, chelerythrinu, berberinu a kvartérního aporfinového alkaloidu magnoflorinu. V nadzemních částech rostliny je zastoupení alkaloidů nižší (0,5 - 1,5 %) a podléhá v průběhu vegetace významným kvalitativním změnám. Jako hlavní alkaloidy jsou uváděny chelidonin, koptisin, stylopin, sanguinarin a chelerythrin. Hlavním alkaloidem je po celé vegetační období koptisin. Jeho obsah v nadzemních částech činil 0,4 - 0,8 %. Na počátku vegetačního období byl jako druhý hlavní alkaloid nadzemní části stanoven stylopin, přičemž obsah chelidoninu, sanguinarinu a chelerythrinu byl v této době relativně nízký. Po odkvětu rostliny však obsah tří posledně jmenovaných alkaloidů narůstal a ke konci vegetace již patřily k hlavním, zatímco obsah stylopinu výrazně poklesl.²⁷

Chemická struktura vybraných alkaloidů

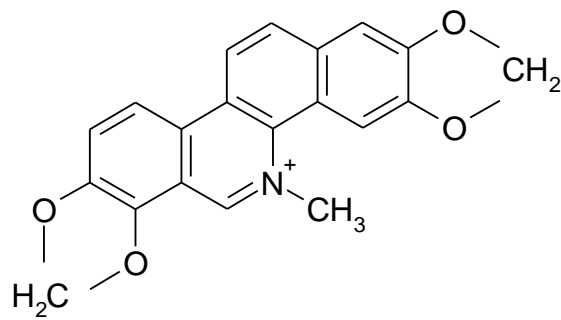
- Chelerythrin



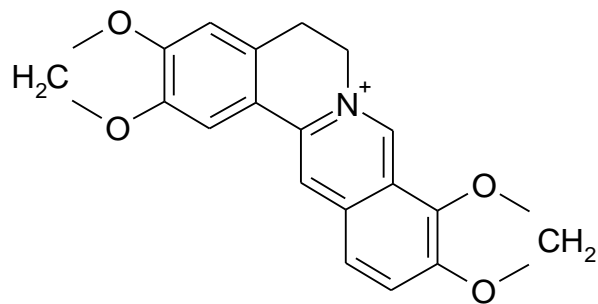
- Chelidonium



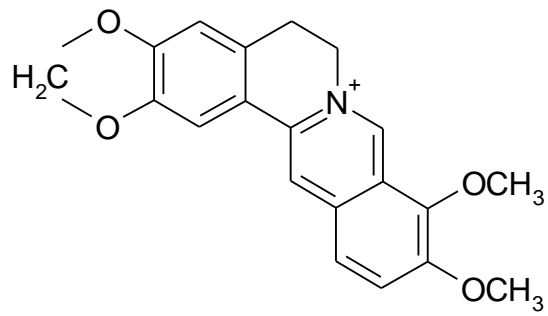
- Sanguinarin



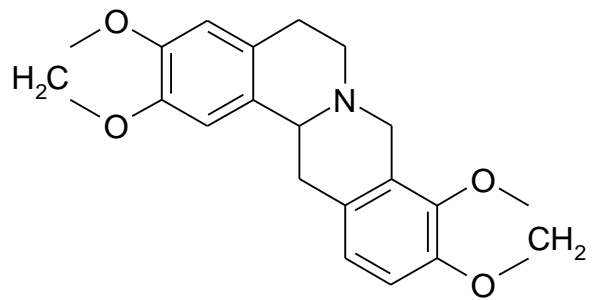
- Berberin



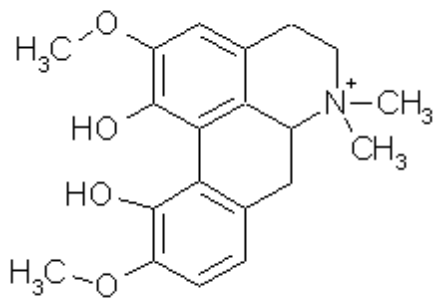
- Koptisin



- Stylopin



- Magnoflorin



3.4.3.2. Nealkaloidní sekundární metabolity

Nealkaloidním sekundárním metabolitům byla dosud ve srovnání s alkaloidy věnována menší pozornost. Dřívější práce uvádějí přítomnost alkoholu chelidonolu, kyselin chelidonové, kávové, ferulové a kumarové, dale vysoký obsah karotenů a kyseliny askorbové, flavonoidů rutinu a kvercetin. Z minoritních složek byly prokázány blíže nespecifikované triterpenoidy, silice a saponiny, kyselina nikotinová, cholin, methylamin, histamin, tyramin. Z nadzemních částí rostlin byly izolovány estery kyseliny kávové: 2-kaffeoylglycerová, 2-kaffeoylthreonová, 2-kaffeoyljablečná a ester kávové kyseliny s 1,4-laktonem kyseliny threonové.²⁷ Dále byla v rostlině prokázána proteáza, peroxidáza, glukóza a fruktóza, třísloviny, kaučuk. V celé rostlině je obsaženo hojně pryskyřičnatých látek, z nichž jedna (žlutě zbarvená) se uvádí v souvislosti s toxicitou čerstvé rostliny.²⁹

3.4.4. Využití rostliny v praxi

Využití rostliny má bohatou historii v lidovém léčitelství. Není téměř choroby, proti které vlaštovičnick v průběhu staletí nebyl použit. Léčivá moc jí byla přisuzována již za starověku a od té doby byla v léčitelství hojně používána. Byla doporučována proti chorobám jater, zimnici a vodnatelnosti, na zlepšení zraku, k odstraňování bradavic i k léčbě tumorů.²⁷ V lidové medicíně se traduje použití při kožních potížích jako jsou puchýřkaté vyrážky, svrab a bradavice. Také se doporučuje při zánětech žlučového měchýře, žlučových kamencích, zánětu zažívacího traktu a řadě dalších často velmi závažných onemocnění, nicméně tato doporučení nejsou dosud doložena odbornými studii.³⁰

V novější době je vlaštovičnick užíván ve fytoterapii jako droga s účinkem spasmolytickým, analgetickým, cholagogním, popř. jako dermatologikum, antihistaminikum a antiseptikum. Herba chelidonii i Radix chelidonii jsou popsány v řadě lékopisů např. DAB 10 (Deutsches Arzneibuch).

Extrakty z vlaštovičnicku jsou součástí řady galenik, produkovaných zejména v západní Evropě. Jsou indikovány při hepatopatiích, poruchách funkce žlučníku a po jeho operacích. V Číně se extrakty z *Chelidonium majus* užívají při léčbě chronické

bronchitidy, dávivého kašle a jako analgetikum. Vlaštovičník je též součástí řady homeopatik.

Uvádí se, že čerstvá rostlina je jedovatá, na kůži a sliznicích vyvolává záněty, otoky až puchýře, vnitřně zvracení, krvavé průjmy a hematurii. Na toxicitě čerstvé šťávy se dle některých údajů podílí blíže nespecifikovaná pryskyřičnatá látka, která se sušením rozkládá a ztrácí účinnost. Toxicita sušené drogy je podstatně nižší, dle některých údajů je již netoxická. V praxi jsou otravy touto rostlinou řídké pro její nepříjemnou chuť a vůni.²⁷

3.4.4.1. Farmakologické účinky

3.4.4.1.1. Protinádorové a antivirové působení

Klinické použití vlaštovičníku při léčbě nádorů se datuje již od minulého století. Botkin popsal dva případy karcinomu, léčené extrakty z vlaštovičníku. Další klinické údaje z tohoto období popisují užití chelidoninsulfátu při rakovině žaludku, extraktu z vlaštovičníku 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 vlaštovičníku na sarkom 180 a Ehrlichův myší karcinom. Při intenzivním výzkumu antitumorové aktivity v šedesátých letech byly popsány inhibiční účinky extraktů z vlaštovičníku 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 nebyla definována.²⁷

V nedávné době opět vzrostl zájem o využití vlaštovičníku při terapii karcinomů, a to v souvislosti s přípravkem Ukrain, vyvinutým a patentovaným rakouskými autory. Tento preparát obsahuje extrakt alkaloidů z *Chelidonium majus* konjugovaných s kyselinou thiofosforečnou a vyznačuje se imunomodulační aktivitou. Působí zvýšení počtu T-lymfocytů a normalizaci poměru Th/Ts buněk, bez ovlivnění hladiny

imunoglobulinů. Přípravek byl aplikován pacientům s různými typy karcinomů. Byl pacienty dobře snášen, navodil obnovení buněčné imunity, provázené objektivním zlepšením stavu pacientů a v několika případech i regresi tumorů. V *in vivo* studiích na myších tumorech bylo prokázáno, že intravenózní podání Ukrainu snižuje rychlost růstu tumoru. V pokusech *in vivo* bylo doloženo, že preparát obnovuje porušenou schopnost makrofágů lyticky štěpit tumorové buňky prostřednictvím stimulace LPS (lipopolysacharid, endotoxin). Obnovená cytolytická aktivita je nezávislá na TNF - α (tumor necrosis factor), což naznačuje, že Ukrain aktivuje alternativní cytolytický mechanismus u makrofágů. Studiu dalších vlastností uvedeného přípravku je nadále věnována značná pozornost.²⁷

3.4.4.1.2. Hepatotropní a spasmolytické účinky

Droga je stále v současných přehledech fytoterapie doporučována jako spazmolytikum, choleretikum a cholagogum, názory na její účinnost však nejsou jednoznačné. Údaje o pozitivních účincích drogy na sekreci žluče, aktivitu α - amylázy i spazmy hladké svaloviny pochází vesměs ze starších prací. Významné je zvýšení sekrece bilirubinu, cholesterolu a zvýšení aktivity pankreatických enzymů lipázy a α - amylázy po aplikaci 100 mg suchého extraktu z vlaštovičníku. Příznivé účinky preparátu Panchelidon obsahujícího extrakt z čerstvých rostlin s obsahem 20 % alkaloidů při léčbě chronické cholangitidy, cholelithiázy a diskinezi popsal v roce 1977 Neumann-Mangoldt.²⁷ Preparát vykazoval spasmolytický a středně analgetický účinek, výrazně omezoval diarrhoeu, vyvolanou léčbou antibiotiky. Weiss hodnotí účinky vlaštovičníku jako nekonstantní. S odvoláním na vlastní zkušenosti uvádí, že účinnost drogy klesá delším uchováváním a je tedy nutné užívat extrakty vždy z čerstvé drogy. I při podávání čerstvé šťávy z vlaštovičníku 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 zcela vymizel. Je pravděpodobné, že uvedené poznatky souvisí s nestandardním složením drogy.²⁷

Větší uplatnění mezi galeniky používanými v současnosti v západoevropských zemích nacházejí směsné extrakty, obsahující vedle vlaštovičníku výtažky dalších drog. Např. preparát Chelidonium-Strath (Strath-Labor) obsahuje směs extraktů z Herba chelidonii, Herba agrimoniae, Folium salviae a Herba hyperici, přípravek

Hepatofalk Planta (Falk) je směs extraktů ze *Silybum marianum*, *Chelidonium majus* a *Curcuma xanthorrhiza*. Preparát obdobného složení Aristochol (Steiner and Co.) byl hodnocen Baumanem, který uvádí, že přípravek zvyšuje cholerezi, sekreci lipázy a amylázy. Pozitivní účinky preparátu Hepaticum-Medice (Medice) na metabolismus žlučových kyselin popsal Matzekis.²⁷

3.4.4.2. Biologické účinky hlavních obsahových látek

Hlavní alkaloidy rostliny jsou koptisin a chelidonin. Přestože koptisin se strukturně jen málo liší od berberinu, jehož biologické účinky byly předmětem řady studií, o účincích samotného koptisinu je známo jen velmi málo. Ze starších prací pochází údaje o jeho cytotoxickém působení. Jsou popsány jeho antimikrobiální a protizánětlivé účinky. Podobně jako berberin inhiboval v dávkách 195 mg/kg/den srážení trombocytů u krys. Má též spasmolytickou a uterotonickou aktivitu. Lze očekávat, že koptisin vykazuje i řadu dalších efektů analogických berberinu.²⁷

Druhý hlavní alkaloid chelidonin má významné spasmolytické účinky. Působí na spazmy gastrointestinálního traktu a bronchů, snižuje tonus hladkého svalstva dělohy, uretry a cév. Jeho spasmolytický účinek je poloviční ve srovnání s papaverinem. Chelidonin též snižuje krevní tlak a zpomaluje srdeční aktivitu působením přes nervus vagus. Polští autoři uvádí, že chelidonin vykazuje inhibiční účinek na dopaminergní struktury u krys v dávkách 50 - 200 mg/kg. Snižuje spontánní motorickou aktivitu a tělesnou teplotu. Potencuje akci hypnotik, zvyšuje tlumivý účinek reserpinu. Má cholagogní a choleretický účinek a ve žlučových cestách působí antisepticky. Má také antimitotické účinky.²⁷

Značná pozornost byla věnována biologickým účinkům benzofenanthridinových alkaloidů sanguinarinu a chelerythrinu, které byly izolovány i z jiných rostlinných druhů, přičemž kořen vlašovičnicku patří k jejich nejvýznamnějším zdrojům. Již dlouhou dobu jsou známy a v praxi využívány protizánětlivé a antimikrobiální účinky těchto alkaloidů. V zemích bývalého Sovětského svazu je vyráběn preparát Sangvirin, obsahující směs sanguinarinu a chelerythrinu. Užívá se jako zevní antimikrobiální přípravek. V Severní Americe jsou benzofenanthridinové alkaloidy součástí některých přípravků užívaných v ústní hygieně. Byly popsány inhibiční účinky sanguinarinu a chelerythrinu na celou řadu enzymů např. na cholinesterázy,

alaninaminotransferázu, Na / K – ATPázu, Ca – ATPázu. Oba alkaloidy působí též jako rozpojovače respirace a oxidační fosforylace. S nativní dvouspirálou DNA vytváří komplexy typu interkalace, inhibují syntézu RNA na DNA matrici a enzymovou hydrolyzu DNA. Nedávno byla popsána inhibice proteinkinázy 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 kvarterního kationtu, nebo terciární báze. Sanguinarin rovněž zvyšuje vodivost lipidové dvojvrstvy membrán. Chelerythrin, sanguinarin a chelidonin mají též prokazatelné antimitotické účinky. Zdá se, že mechanismus jejich působení naznačuje nedávné zjištění, že uvedené tři alkaloidy inhibují polymeraci tubulinu. Lze předpokládat, že antimikrobiální i cytostatická aktivita těchto alkaloidů je podmíněna výše uvedenými účinky na řadu klíčových enzymů buněčného metabolismu.

Řada významných fyziologických účinků byla popsána u kvarterního alkaloidu berberinu, jehož zastoupení v kořeni je srovnatelné se sanguinarinem. Tento alkaloid, jehož hlavním zdrojem jsou druhy rodu *Berberis* sp., má některé účinky podobné chelidoninu. V Evropě a na Dálném východě je po mnoho staletí užíván jako prostředek proti průjmům, žloutence a chronické dysenterii. Stimuluje sekreci žluče a má rovněž hypotenzivní, vasodilatační a sedativní účinky. V *in vitro* pokusech bylo popsáno, že působí jako agonista α - 2 adrenoreceptorů lidských krevních destiček. Působí inhibičně na některé enzymy a má antibakteriální účinky. Řada prací se zabývá účinkem berberinu na srdeční aktivitu. V pokusech na zvířatech byly prokázány jeho pozitivní inotropní a dromotropní a negativní chronotropní efekty.²⁷

Rovněž některé z nealkaloidních látek prokazaných v *Chelidonium majus* 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 vlaštovičníku mohou podílet tyto látky.²⁷

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST A VÝSLEDKY

4.1. Všeobecné postupy

4.1.1. Destilace

Rozpouštědla byla před použitím destilována; nejprve byl zachycen předek (většinou s vodným azeotropem), poté bylo vydestilováno zbylých cca 90 % objemu rozpouštědla. Rozpouštědla byla uchovávána v hnědých nádobách.³¹

4.1.2. Odpařování

Odpařování chromatografických frakcí bylo prováděno na vakuové odparce při 40°C za sníženého tlaku. Odpařování malých množství bylo prováděno proudem dusíku na vodní lázni za normálního tlaku.³¹

4.1.3. Chromatografie

4.1.3.1. Kolonová (sloupcová) chromatografie

Sloupcová chromatografie byla prováděna systémem stupňovité eluce na neutrálním oxidu hlinitém. Sloupec byl plněn obvyklým způsobem: nalitím suspenze adsorbentu do rozpouštědla. Vzorek byl nanesen na roztěru s malým množstvím oxidu hlinitého po vysušení v exsikátoru.³¹

4.1.3.2. Tenkovrstvá chromatografie (Thin-Layer Chromatography, TLC)

TLC byla použita v systému N–komor (N = normální). Komory byly použity nasycené mobilní fází; v případě použití malých (válcových) komor probíhalo sycení cca 30 min, u klasických komor cca 1 hod. Chromatografie byla prováděna vzestupně.³¹

4.2. Potřeby

4.2.1. Rozpouštědla

Benzín, ČsL 4

Cyklohexan, č.

Diethylamin, č.

Ethanol 95%, denaturovaný 5 % methanolu

Ether, č.

Chloroform, č.

Kyselina octová bezvodá, č.

4.2.2. Chemikálie

Acetylcholin jodid, p.a.

Amoniak 25%, č.

Dusík 5.0

Hydroxid sodný, č.

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: Dragendorffovo činidlo modifikované podle Muniera³²

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

Roztok B: 16 g jodidu draselného se rozpustí ve 40 ml vody.

Zásobní roztok: připraví se smísením roztoků A a B v poměru 1:1; může být uložen několik měsíců v lednici.

Činidlo pro analýzu: připraví se tak, že se k roztoku 5 ml kyseliny vinné rozpuštěné v 50 ml vody přidá 5 ml zásobního roztoku.

Pozn.: Vlastní zásobní roztok se používá pro detekci vit. B₁.

D 2: Mayerovo činidlo³³

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

D 3: UV $\lambda = 254$ nm

Chromatogram jsem prohlížela pod UV lampou při vlnové délce 254 nm.

4.2.4. Vyvíjecí soustavy pro tenkovrstvou chromatografii

S1: Cyklohexan+diethylamin 9+1

4.2.5. Chromatografické adsorbenty

Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck)

TLC hliníková folie, Silikagel 60 F254, tloušťka vrstvy 0,2 mm.

Oxid hlinitý neutrální

Stupeň aktivity ~3 (Brockmann-Schodder). Komerční neutrální oxid hlinitý (Reanal, Hungary) 60 - 200 μm byl přesítován přes síto 200 μm a poté vysušen v sušárně ve vrstvě ne vyšší než 2 cm při teplotě 230 °C po dobu 3 hodin. Po zchlazení

(v exsikátoru) byl deaktivován přidavkem 6 % vody (ekvilibrace za protřepávání po dobu 30 minut).

Silufol[®] UV 254 (Kavalier, Votice)

Hotové desky pro chromatografii na tenké vrstvě; podložka: hliníková folie; sorbent: Silpearl – širokoporézní silikagel podle Pitry s luminiscenčním indikátorem pro UV 254.

4.3. Biochemická část

4.3.1. Stanovení inhibice aktivity acetylcholinesterázy

Kvartérní inhibitory cholinesteráz izolovány v této práci ze sušené rostliny *Chelidonium majus* L. byly testovány pro jejich inhibiční schopnost standardním *in vitro* inhibiční testem.³⁴

4.3.2. Biologický materiál

Homogenát mozku

4.3.3. Přístroje

Automatický titrátor RTS 822, Radiometer, Dánsko.

Homogenizátor Ultra-Turrax , Janke–Kunkel, Německo.

Ultratermostat typ U3, VEB Prufgerate-werk Mendingen, Německo.

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

4.3.4. Příprava homogenátu

Z mozku byl odpreparován nucleus caudatus. Preparát byl opláchnut fyziologickým roztokem a poté homogenizován přístrojem Ultra – Turrax jednu minutu při dvaceti tisíci otáčkách za minutu v poměru 1 : 10 s destilovanou vodou. Poté byl homogenát rozplněn do zkumavek po dvou mililitrech a zmrazen na – 35 °C.

4.3.5. Inhibice cholinesteráz

Cholinesterázy 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 enzym štěpen na alkohol cholin a kyselinu octovou. Tato reakce je neutralizována kontinuálními přidávkami roztoku hydroxidu sodného, tak aby bylo udrženo konstantní pH 8.

0,5 ml homogenátu bylo smíšeno s 2,5 ml 3 M roztoku chloridu sodného, 0,2 ml roztoku testované látky a objem doplněn destilovanou vodou 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. Poté bylo k reakční směsi přidáno 2 ml 0,01 M roztoku substrátu – acetylcholin jodidu. Plotterem titrátoru byla následně zaznamenávána spotřeba 0,01 M roztoku hydroxidu sodného nutná k udržení konstantního pH reakční směsi. 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.

4.3.6. 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. Materiál

Droga (sušená nať s kořeny) byla získána sběrem firmy 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 %

4.4.2. 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 l vody. Vznikl temně hnědý, dehtovitý, sirupovitý odparek. Při oddestilování lihu ze zahuštěného koncentrátu těkala nějaká látka do vakuové odparky ve formě nahnědlého náletu, nebyla však analyzována.

Tento extrakt byl rotací rozehrát na vodní lázni asi na 40 °C, bylo přidáno 8 l 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, umístěn do velké kádinky, bylo 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; vzniklý kalný oranžový roztok byl slit, černý pryskyřičnatý podíl rozpuštěn znova ve 200 ml octové kyseliny, zase rozehrát a srážen 4 l 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), filtr promyt vodou. Filtr 1 a filtr 2 byly roztrženy a suspendovány v 1,5 l 1,5% kyselině sírové, suspenze byla zfiltrována; oranžový filtrát byl přidán ke kyselému roztoku extraktu (celkem 37 l filtrátu).³¹

4.4.2.1. Výtřeppek A z primárního extraktu

Kyselý roztok síranů (37 l) byl neutralizován nejprve pevným práškovým bezvodým uhličitanem sodným na pH cca 9; tekutina se výrazně zakalila a nabyla vzhledu světlého kakaa. Tento roztok byl vytřepán 5 x 15 l 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 2 x 400 ml etheru. Ether byl přidán k etherovým výtřepkům.³¹

4.4.2.2. Výtřeppek B z primárního extraktu

Sodový extrakt byl zalkalizován 50% hydroxidem sodným na pH 12,0 - 12,5 a tento roztok vytřepán 5 x 15 l etheru, etherové vrstvy byly spojeny, ostře odděleny od zbytku vodné fáze a rozpouštědlo oddestilováno.³¹

4.4.2.3. Vytřeppek 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 l tohoto roztoku byl přidán roztok 320 g jodidu draselného ve 480 ml vody, promíchalo se to a za občasných třepání ponechalo 3 hodiny v klidu. Potom byl extrakt vytřepán 5 x 8,4 l chloroformu.³¹

4.4.2.4. Výtřeppek E z primárního extraktu

Okyselená vodná fáze poskytovala ještě pozitivní reakci na Mayerovo činidlo, byla proto zalkalizována 25% amoniakem na pH 10 (na 1 l cca 80 ml 25% amoniaku) a vytřepána 5 x 8,4 l směsi chloroform+ethanol 8,5:1,5 nasycené vodou. Organická vrstva byla po ostrém oddělení zahuštěna k suchu.³¹

4.4.2.5. Zbylý vodný extrakt

Tento vodný extrakt obsahoval už jen stopy alkaloidů (srážecí Mayerova reakce), nebyl dále použit.³¹

Tab. 2 Jednotlivé typy výtřepku

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

4.4.2.6. *Chelidonium majus* - dělení surového výtřepku A

31 g hnědého viskózního odparku bylo rozpuštěno v kádince za stálého míchání tyčinkou v 840 ml 0,3 M kyseliny sírové (komerční 3 M kyselina sírová byla zředěna v poměru 1 ml kyseliny sírové + 9 ml vody); rozpouštění bylo prováděno po částech, šlo snadno, vznikl intenzívně oranžový roztok, na stěnách kádinky zůstaly nerozpuštěné hnědočervené drobký a na povrchu kapaliny zůstala jakási olejová šmouha. Tento kyselý roztok byl zfiltrován skládaným papírovým filtrem, baňka byla vymyta 20 ml 0,3 M kyseliny sírové a kyselý roztok byl vytřepán 5 x 220 ml etheru. Spojené etherové výtřepky byly promyty 1 x 20 ml 0,15 M kyseliny sírové, potom 1 x 25 ml 4% uhličitanu sodného (oba vytřepávací roztoky byly použity ochlazené na cca 10 °C), etherová vrstva byla oddělena a oddestilována (**výtřeppek L**).

Kyselý oranžový roztok byl zneutralizován 10% uhličitanem sodným za vzniku 1,4 l suspenze s šedými vyloučenými alkaloidy (amorfní fáze); tato suspenze byla

vytřepána celkem 4 x 750 ml etheru, etherová vrstva oddělena a rozpouštědlo oddestilováno. Vyloučené alkaloidy se prakticky všechny rozpustily v první dávce etheru i s nečistotami (**výtřepek A**).

Medový krystalizující odparek s alkaloidy byl znovu rozpuštěn ve 300 ml 0,3 M kyseliny sírové, zbylá baňka byla vymyta postupně 200 ml vody (v baňce zbyl oranžový prášek, který se nerozpustil v kyselině sírové, ale pouze ve vodě) a k tomuto roztoku bylo přidáno 25 g kyanidu draselného (do alkalické reakce); přitom se vyloučily prakticky všechny alkaloidy; vyloučená pevná fáze byla velmi hutná, roztok zšedl a nabyl velmi vysoké viskozity. Tato suspenze byla okyselena 1 M kyselinou sírovou na pH cca 4 (báze se rozpustily, nerozpuštěné zůstaly pouze ps-kyanidy, suspenze opět zřídla), ps-kyanidy byly ponechány klesnout ke dnu, tekutina nad sedimentem byla opatrně odlita, zfiltrována přes Büchnerovu nálevku přes papírový filtr, posléze byla nalita na filtr hutná suspenze pseudokyanidů, promyta vodou a vysušena ve vakuu. Po vysušení byly ps-kyanidy rozetřeny (**ps-kyanidy**).

1,46 g vzniklých suchých rozetřených ps-kyanidů bylo ve varné baňce přelito 36 ml směsí chloroform+ethanol (objemový poměr 1:2) a směs byla suspendována až k rozpuštění, resp. ke stálému jemnému zákalu. Potom bylo přidáno 12 ml 36% kyseliny chlorovodíkové a směs byla vařena na vodní lázni 1 hodinu. Po této době byla zneutralizována 10% uhličitanem sodným na pH cca 7, odpařen chloroform, ethanol a část vody, bylo přidáno 250 ml vody, provedena alkalizace 10% uhličitanem sodným na pH ~9 (vyloučila se sraženina) a nafialovělá suspenze byla vytřepána 4 x 150 ml etheru. Organické fáze byly spojeny, ostře oddělena voda, fáze byly vysušeny síranem sodným a rozpouštědlo bylo oddestilováno (**kvartérní báze z ps-kyanidů**).

1 l slabě kyselého filtrátu po oddělení ps-kyanidů byl zalkalizován 10% uhličitanem sodným na pH ~9 a vytřepán 5 x 250 ml etheru. Odparek alkaloidů žlutavý, hrubě krystalický, byl rozpuštěn v 550 ml chloroformu, chloroformový roztok byl vytřepán 3 x 75 ml 5% hydroxidu sodného a 1 x 75 ml vody o teplotě ~10 °C. V chloroformu zůstaly báze nefenolické, do vodné fáze přešly báze fenolické. Chloroformová fáze byla ostře oddělena od vody, vysušena síranem sodným a rozpouštědlo oddestilováno (**AC**).

Tento odparek AC byl za mírného zahřátí rozpuštěn ve 130 ml 0,3 M kyseliny sírové a po zchlazení bylo přidáno 130 ml 36% kyseliny chlorovodíkové; asi do 3 minut se vyloučila sraženina nerozpustných chloridů. Po 1,5denním stání v lednici

byly chloridy odsáty na fritě, promyty vodou, vysušeny nejprve na vzduchu a potom ve vakuovém exsikátoru. 10,67 g suchých, světle okrových chloridů nerozpustných ve vodě bylo za tepla (60 - 70 °C) rozpuštěno v 1,1 l 0,3 M kyselině sírové, roztok byl ochlazen a nejprve zneutralizován opatrně pevným práškovým uhličitanem sodným do pH cca 7, potom 10% roztokem uhličitanu sodného do pH 9; po zchladnutí pod tekoucí vodou byl vytřepán 4 x 350 ml etheru, etherové vrstvy odpařeny a odparek vysušen (**AC₁ z chloridů nR v kyselině chlorovodíkové**).

1 l filtrátu po oddělení nerozpustných chloridů alkaloidů byl nejprve zfiltrován přes vrstvu křemeliny (1 cm) pro odstranění zákalu nR chloridů, zalkalizován 10% uhličitanem sodným na pH cca 9 (vyloučila se šedavá vločkovitá sraženina), vytřepán 4 x 250 ml etheru a rozpouštědlo bylo odpařeno (**AC₁ z chloridů rozpustných v kyselině chlorovodíkové**).

Louhový roztok a promývací voda s fenoláty alkaloidů byly spojeny, okyseleny 1 M kyselinou sírovou na pH cca 5, roztok byl zalkalizován 10% uhličitanem sodným na pH ~9; šedavá suspenze (cca 500 ml) byla vytřepána 4 x 150 ml etheru. Etherové vrstvy byly spojeny, ostře odděleny od vody a po vysušení síranem sodným odpařeny (**AC₂**).³¹

Tab. 3 Výsledky separace surového výtřepku A (31 g)

Označení výtřepku	Hmotnost (g)	Popis
L	0,1561	Tmavě hnědý, olejovitý, s práškovitým výpadkem
ps-kyanidy	1,46	Světle okrové, nepáchnoucí
kvar.t.b. z ps-CN	0,8587	Hnědý, nekystalický
AC	Nevážen	Světle hnědý, medovitý
AC ₁ z chloridů nR	9,4562	Světle okrový, krystalický
AC ₁ z chloridů R	5,0737	Světle nažloutlý, hrubě krystalický
AC ₂	0,1411	Tmavě hnědý, velmi viskózní

Pozn.: nR = nerozpustný, R = rozpustný

4.4.3. Chromatografie výtřepku A (AC₁ – alkaloidy z chloridů rozpustných)

Tento odparek obsahoval alkaloidy, jejichž chloridy byly ve vodě (v roztoku kyseliny chlorovodíkové) rozpustné.

Tab. 4 Sloupcová chromatografie

Navážka:	5,07 g suché směsi (3 látky)
Adsorbent:	Oxid hlinitý neutrální, stupeň aktivity III, 60 - 200 μm, 200 g
Vrstva s nanáškou fr.:	2,5 x 5 cm
Dělicí lože:	2,5 x 54 cm; sloupec byl nalit v soustavě benzín+chloroform 9:1
Mrtvý objem:	200 ml
Frakce:	100 ml
Doba toku frakce:	15 - 20 min.

Tab. 5 Výsledek primární chromatografie alkaloidních bazí AC₁ na oxidu hlinitém

Frakce	Spojené fr.	Eluční systém	Popis
0		Benzín+ chloroform 9+1	0
1-8	1-10	Benzín+chloroform 8,5+1,5	0
9-10		Benzín+chloroform 8+2	
11	11	Benzín+chloroform 8+2	Žlutý s krystalky
12	12	Benzín+chloroform 8+2	Žlutý s krystalky
13	13-14	Benzín+chloroform 8+2	Téměř bílý, krystal.
14		Benzín+chloroform 8+2	
15	15-17	Benzín+chloroform 8+2	Téměř bílý, krystal.
16		Benzín+chloroform 8+2	
17		Benzín+chloroform 8+2	
18	18	Benzín+chloroform 8+2	Bílý, krystalický
19	19-26	Benzín+chloroform 8+2	Bílý, krystalický
20		Benzín+chloroform 8+2	
21		Benzín+chloroform 8+2	
22		Benzín+chloroform 7+3	
23		Benzín+chloroform 7+3	
24		Benzín+chloroform 7+3	
25		Benzín+chloroform 7+3	
26		Benzín+chloroform 7+3	
27	27	Benzín+chloroform 7+3	Nahnědlý, olejovitý

V dalším postupu jsem zpracovávala frakce 13+14, 15-17, 18 a 19-26. Tato látka byla označena jako CH-M/A-2.

Čištění frakcí 13+14, 15-17, 19-26

Hrubě krystalické frakce byly rozředěny malým množstvím směsi chloroform+ethanol 1:1, krystaly mírně rozdrčeny (ne však na prášek), zfiltrvány na fritě, mírně udusány a promyty 2x uvedenou směsí. Výsledky ukazuje tabulka 6.

Tab. 6 Celkové výsledky sloupcové chromatografie na oxidu hlinitém

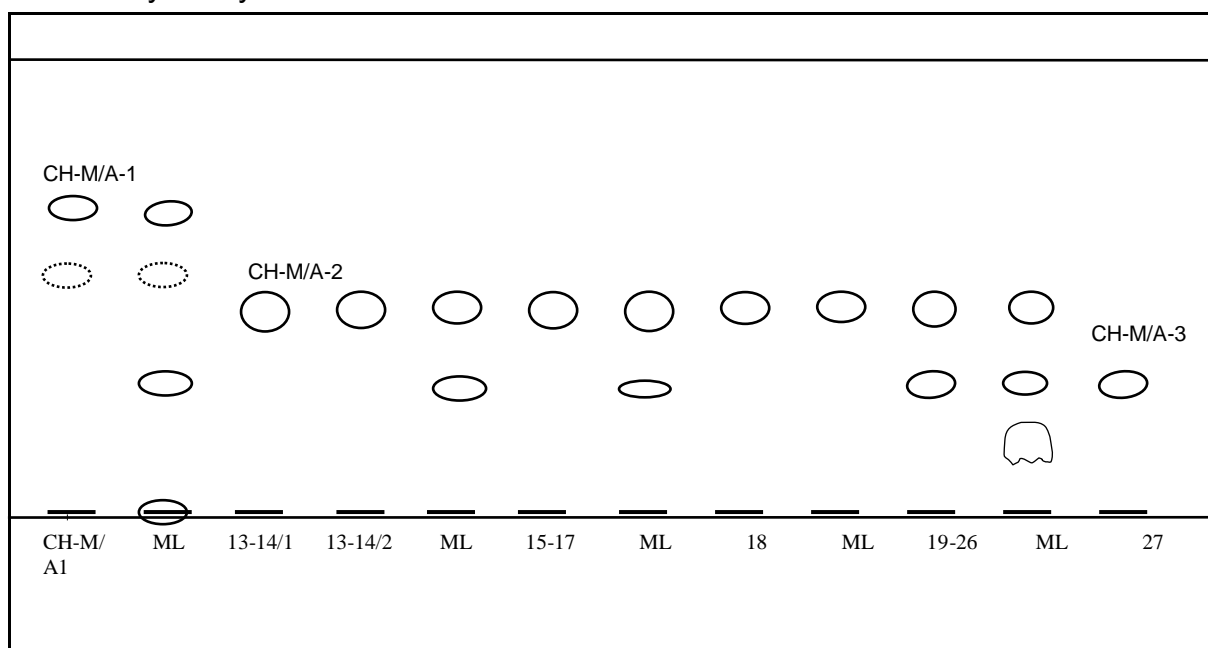
Frakce	Hmotnost	Popis
Fr.13+14: CH-M/A-2	Kr.: 108 mg ML: 0,4176 g	Bělavý, práškovitý Nažloutlý, práškovitý
Fr.15-17: CH-M/A-2	Kr.: 700 mg ML: 0,2225 g	Čistě bílý Nahnědlý, drobně krystalický
Fr.18: CH-M/A-2	Kr.: 164 mg ML: 0,0293 g	Slabě nažloutlé práškovité kr. Nažloutlý olejovitý
Fr.19-26: CH-M/A-2	Kr.: 504 mg ML: 1,3775 g	Čistě bílé, práškovité kr. Hrubě krystalický, nahnědlý

Jak je patrné z výsledků tenkovrstvé chromatografie jednotlivé frakce látky CH-M/A-2 jsou identické.

Může se stát, že alkaloidy přechází do jednotlivých frakcí. Také látka pod označením CH-M/A-3, kterou zpracovávala jiná diplomantka, se objevila na TLC chromatogramu v některých frakcích látky CH-M/A-2.

4.4.4. Tenkovrstvá chromatografie

Obr. 3 Výsledky TLC všech frakcí.



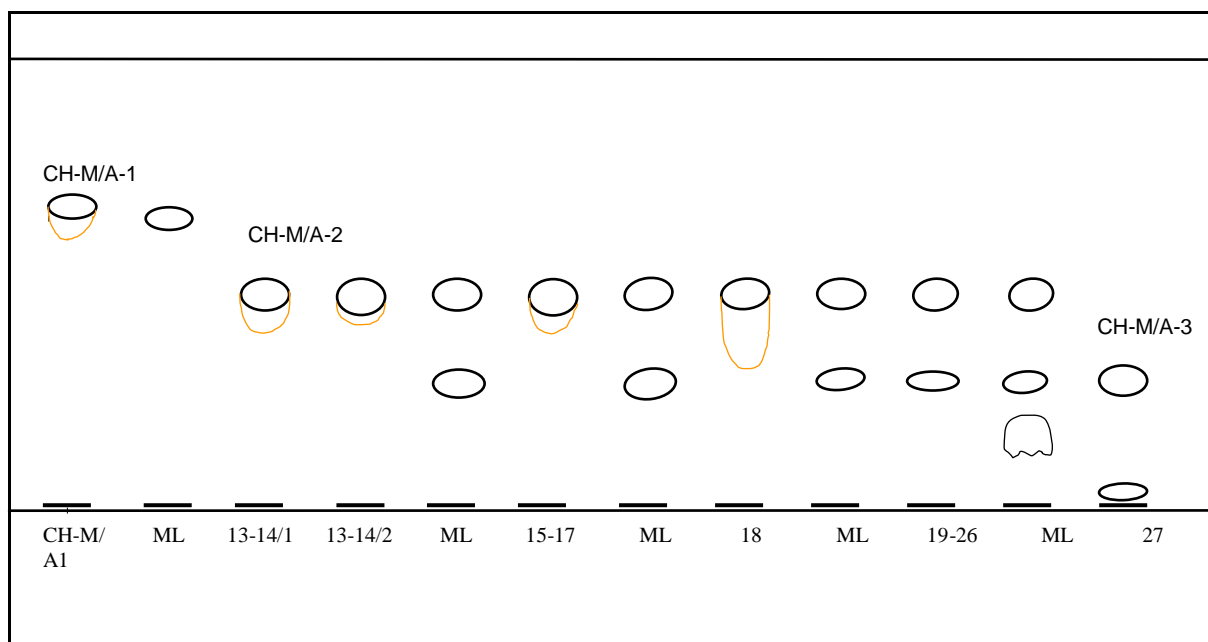
Tenkovrstvá chromatografie spojených frakcí

S 1, komora nasycená, vyvíjení 2 x, D 3

Tab. 7 Hodnoty R_F

Frakce	R_F
Fr.: 13-14/1	0,43
Fr.: 13-14/2	0,42
ML CH-M/A-2	0,42
ML CH-M/A-3	0,28
Fr.: 15-17	0,41
ML CH-M/A-2	0,40
ML CH-M/A-3	0,29
Fr.: 18	0,41
ML	0,41
Fr.: 19-26 CH-M/A-2	0,40
Fr.: 19-26 CH-M/A-3	0,28
ML CH-M/A-2	0,40
ML CH-M/A-3	0,29

Obr. 4 Výsledky TLC všech frakcí



U čistých látek 13-14/1, 19-26 vzniká skvrna po nástřiku Dragendorffova činidla až po chvíli, ne na začátku, pod UV není vůbec patrná.

S 1, komora nasycená, vyvíjení 2 x, D 1, D 3

Tab. 8 Hodnoty R_F

Frakce	R_F
Fr.: 13-14/1	0,44
Fr.: 13-14/2	0,43
ML CH-M/A-2	0,42
ML CH-M/A-3	0,29
Fr.: 15-17	0,42
ML CH-M/A-2	0,41
ML CH-M/A-3	0,29
Fr.: 18	0,42
ML CH-M/A-2	0,42
ML CH-M/A-3	0,30
Fr.: 19-26 CH-M/A-2	0,42
Fr.: 19-26 CH-M/A-3	0,30
ML CH-M/A-2	0,41
ML CH-M/A-3	0,30

4.5. Přehled izolovaných látek

Čistě bílé až slabě nažloutlé práškovité krystaly látky CH-M/A-2.

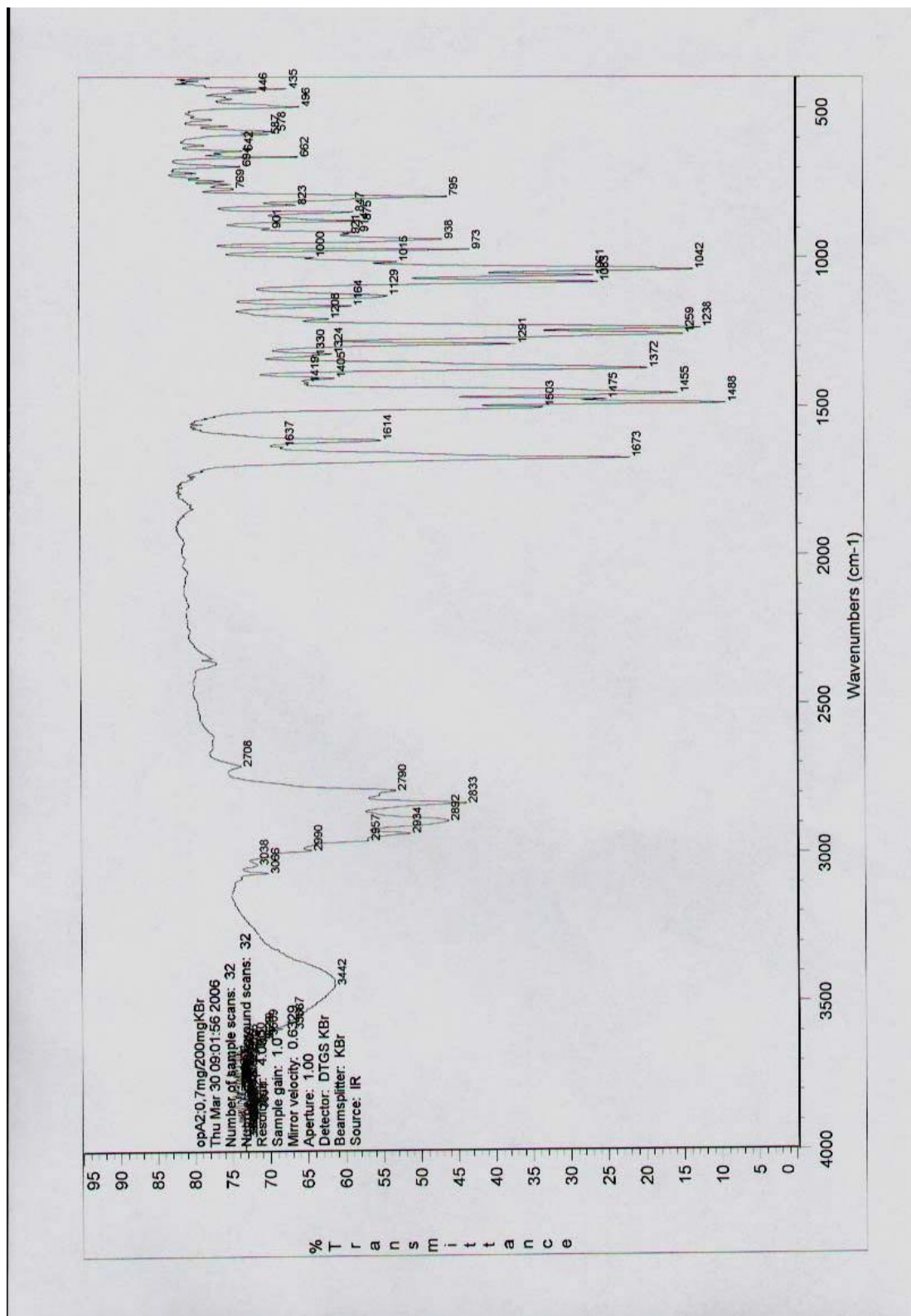
4.5.1. Teplota tání

Teplota tání: 198 – 203°C

Této hodnotě teploty tání může odpovídat (-)-stylopin (t. t. 201 - 202°C), chelamin (t. t. 203-204°C), tetrahydrokorysamin (t. t. 201-202°C).

4.5.2. IČ spektrum

Obr. 6 IČ spektrum látky CH-M/A-2



4.5.3. Výsledky testů vlivu látky CH-M/A-2 na aktivitu acetylcholinesterázy

Látka	IC ₅₀ [mg/l]	95% konfidenční interval [mg/l]	směrnice
CH-M/A-2	35	31,1 – 39,3	1,48

Tento výsledek získaný změřením vlivu látky CH-M/A-2 na aktivitu acetylcholinesterázy je pouze předběžný. Vzhledem k tomu, že neznáme přesnou strukturu látky CH-M/A-2, nebylo možné přesně stanovit hodnotu IC₅₀.

5. DISKUSE

Alzheimerova demence patří k onemocnění, jehož léčba je komplikovaná a problematická. Přesná příčina vzniku Alzheimerovy choroby není dosud zcela známa a podílí se na ni několik faktorů. Tato choroba je totiž komplexem řady patofyziologických procesů, z nichž některé na sebe navazují a některé působí naprosto samostatně.

V současné době je hlavním léčebným postupem zásah do aktivity mozkové acetylcholinesterázy. Právě acetylcholinergní systém je totiž u Alzheimerovy nemoci nejvíce postižen a nedostatek acetylcholinu v CNS se podílí na rozvoji demence. Řada sloučenin má cholinomimetické účinky velmi příznivé, bohužel však prakticky nevyužitelné; tyto účinky jsou nejen centrální, ale i periferní. Právě výrazné periferní účinky těchto látek znemožňují jejich použití, protože by mohly vést k řadě nežádoucích účinků jako např. křeče, pocity slabosti, průjmy, pocení, tachyarytmie. Významným cholinomimetikem je např. fysostigmin, ale vzhledem k jeho závažným vedlejším účinkům je těžko použitelný. Proto přichází v úvahu jen málo sloučenin z přírodních látek. V současné době se začíná prakticky využívat galanthamin, velmi intenzivně se pracuje na různých galanthaminových derivátech.³⁵ Velmi perspektivní přírodní látka je alkaloid izolovaný z některých zástupců čeledi Lycopodiaceae – huperzin A. Tento alkaloid stačí podávat v podstatně nižších dávkách než galanthamin. Poněkud obtížnější je v současnosti jeho získávání než u ostatních přírodních látek, nicméně rozsáhlé syntetické studie dokazují, že se tato látka bude připravovat zcela synteticky.³⁶ Syntetické látky používané v současnosti (dopenezil, takrin) neposkytují takové terapeutické potřeby, jaké se od nich očekávají, a proto je huperezin A nadějným léčivem. V podstatě je dnes takrin již léčivem mrtvým.

Probíhající intenzivní výzkum v této oblasti je zaměřen nejen na látky syntetické, ale také na látky přírodní s ohledem na jejich schopnost reverzibilně blokovat rozklad mozkové acetylcholinesterázy. Kromě různých syntetických látek se jako velmi perspektivní ukazují i některé další látky (např. lipokrin, ganstigmin, ladostigmin, dekursinol, α - onocerin, zeatin).^{24,25} Alkaloidy jsou rovněž atraktivní z preparativního hlediska, protože se s nimi snadněji pracuje než s neutrálními sloučeninami (lze je rychleji a méně nákladně čistit).

Jednou z rostlin, která obsahuje alkaloidy biologicky aktivní vůči acetylcholinesteráze je vlašovičník větší (*Chelidonium majus*). Týká se to jak alkaloidů obsažených v nati, tak i alkaloidů obsažených v kořeni (jde především o benzylochinolinové deriváty benzofenanthridinového, protoberberinového,

protopinového typu a kvarterní aporfiny). Jeho výzkum se v poslední době poměrně rozšiřuje, patrně z důvodů studia antineoplastického účinku alkaloidního přípravku látky nazvaného Ukrain (tento preparát obsahuje extrakt alkaloidů z *Chelidonium majus* konjugovaných s kyselinou thiofosforečnou). V souvislosti s tímto studiem se sleduje vliv a účinek alkaloidů i na jiné struktury, např. efekt benzofenanthridinových alkaloidů na lidské keratinocyty³⁷, inhibiční vliv na 5- a 12-lipoxygenázu neredoxním mechanismem.³⁸ Pozornost je rovněž věnována vlivu alkaloidů z vlaštovičníku většího a podobných alkaloidů izolovaných z rostliny *Bocconia (Macleaya) cordata* na hydrolyzu acetylthiocholinu a acetylcholinesterázu.³⁹ Jedná se zejména o chelidonin, sanguinarin, chelerythrin a také Ukrain. Zjistilo se totiž, že benzo[c]fenanthridinové alkaloidy (sanguinarin, chelerythrin) jsou poměrně účinné (IC₅₀ je 0,2 – 0,3 mM). Rovněž chelidonin a Ukrain vykazují zajímavý účinek (IC₅₀ je 2 – 2,5 mM).

Také na katedře farmaceutické botaniky a ekologie probíhá screening přírodních látek typu alkaloidů z čeledí Papaveraceae a Fumariaceae. Z tohoto důvodu byl proveden pokus o izolaci alkaloidů s cílem podrobit tyto látky testování vlivu na acetylcholinesterázu a v pozdější době na prolylendopeptidázu. K této izolaci bylo použito 41,8 kg celé sušené rostliny (tzn. nať a kořen). Postupovalo se podle poznatků profesora Slavíka^{29,40}, jehož pracovní skupina se alkaloidy z čeledi Papaveraceae (ovšem pouze z preparativního hlediska) zabývala od 50. do 70. let minulého století. Pro tyto izolace pracovní skupina používala 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 znečištěniny byly odstraněny vytřepáním tohoto roztoku etherem, vodná vrstva byla zalkalizována uhličitanem sodným na pH 9 – 10, vyloučené alkaloidy vytřepány etherem, zbylá vodná vrstva byla zalkalizována na pH 12 – 12,5 a silné baze vytřepány opět do etheru. Po okyselení vodného extraktu kyselinou chlorovodíkovou a přidavku jodidu draselného byly vytvořené jodidy kvarterních bazí vytřepány chloroformem („jodidy kyselé“) a kyselý vodný roztok byl opět zalkalizován amoniakem a vytřepán chloroformem do něhož přešly „jodidy bazické“. Etherový výtřeppek, který byl získán alkalizací uhličitanem sodným, obsahoval středně bazické alkaloidy a byl dále separován přípravou pseudokyanidů (sanguinarinová base vytvářející nerozpustné pseudokyanidy). Zbylý roztok po pseudokyanidech byl zpracován s koncentrovanou

kyselinou chlorovodíkovou na chloridy rozpustné a nerozpustné ve vodě. Nakonec byly z těchto frakcí odděleny alkaliody fenolické od nefenolických.

Tento postup používaný Slavíkem a jeho skupinou je velmi logický a historicky patrně osvědčený. V našich pracovních podmínkách se však vůbec neosvědčil. Ukázalo se, že nepřináší tak snadné výsledky jak to popisuje Slavíkova skupina (jednoduchým vytřepáváním a frakční krystalizací tato skupina rozdělila látky až do čistého stavu). Při opakování tohoto postupu s naší drogou jsme zjistili, že očekávaný výsledek je nereálný. Po odstranění málo bazických alkaloidů a ostatních znečištěnin z kyselého roztoku alkaloidů (31 g odparku A) byly připraveny pseudokyanidy (1,46 g) a separovány chloridy alkaloidů ve vodě rozpustné (5,0737 g) a ve vodě nerozpustné (9,4562 g). Věnovala jsem se dělení alkaloidů jejichž chloridy byly ve vodě rozpustné. Zjistila jsem, že postup popisovaný Slavíkem nepřinesl tak výborné výsledky.²⁹ Autor krystalizoval baze různým způsobem z chloroform-methanolu, přičemž získal racemát stylopinu (t. t. 221 - 222°C), (-)stylopin (t. t. 201 - 202°C), chelidonin (t. t. 135 - 136°C), protopin (t. t. 203 - 204°C) z nati; stejným postupem získal řadu dalších alkaloidů odlišné struktury z kořene. V naší práci jsme použili celou rostlinu, protože nám byla nabídnuta zahraniční firmou, a tím se nám situace zkomplikovala. Předpoklad, že se spektrum alkaloidů podaří rozdělit Slavíkovým postupem, se ukázal jako mylný. Z tohoto důvodu musíme čekat na výsledky spektrální analýzy, které potvrdí strukturu izolované látky CH-M/A-2 (t.t. 198 - 203°C podle Koflera). Tenkovrstvá chromatografie ukázala, že alkaloid připravený naším postupem (sloupcová chromatografie na oxidu hlinitém z frakcí 13+14, 15-17, 18, 19-26) je čistý, ale pro konečné ověření struktury musíme počkat na výsledky spektrálních analýz.

U izolované látky CH-M/A-2 byla změřena její biologická aktivita (schopnost inhibovat acetylcholinesterázu) na homogenátu mozku. Z mozku byl odpreparován nucleus caudatus. Preparát byl opláchnut fyziologickým roztokem a homogenizován jednu minutu při dvaceti tisíci otáčkách za minutu v poměru 1 : 10 s destilovanou vodou. Poté byl homogenát rozplněn do zkumavek po dvou mililitrech a zmrazen na - 35 °C.

0,5 ml homogenátu bylo smíšeno s 2,5 ml 3 M roztoku chloridu sodného, 0,2 ml roztoku testované látky a objem doplněn destilovanou vodou 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. Plotterem titrátoru byla následně zaznamenávána spotřeba 0,01 M roztoku hydroxidu sodného nutná k udržení konstantního pH reakční směsi. Koncentrace testované látky byly zvoleny tak, aby oblast aktivit enzymu byla rovnoměrně pokryta měřicími body od stoprocentní po nulovou aktivitu.

Cholinesterázy 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 enzym štěpen na alkohol cholin a kyselinu octovou. Tato reakce je neutralizována kontinuálními přídávky roztoku hydroxidu sodného, tak aby bylo udrženo konstantní pH 8.

U látky CH-M/A-2 byla naměřena hodnota $IC_{50} = 35$ (mg/l). Jedná se pouze o výsledek předběžný, protože hodnotu IC_{50} nebylo možné přesně stanovit vzhledem k tomu, že neznáme přesnou strukturu látky. Ke stanovení aktivity bude také použita pozitivní kontrola galanthaminem a neostigminem, což v současnosti nebylo provedeno, protože metoda je propracovávána a je nutné ji upravit. Z tohoto údaje lze ovšem odvodit účinnost této látky, která je však nízká.

6. SOUHRN

K izolaci alkaloidů z *Chelidonium majus* bylo použito 41,8 kg celé sušené rostliny (nať a kořen). Na extrakci drogy jsem se podílela spolu s dalšími diplomantkami Šárkou Brožovou, Evou Vítkovou a Dagmar Kubincovou. Přípravou extraktu a jeho čištěním jsme získaly pseudokyanidy, kvarterní baze z pseudokyanidů, chloridy ve vodě rozpustné a chloridy ve vodě nerozpustné. Zabývala jsem se dělením alkaloidů jejichž chloridy byly ve vodě rozpustné a izolovala jsem látku CH-M/A-2. Tenkovrstvá chromatografie ukázala, že alkaloid připravený naším postupem (sloupcová chromatografie na oxidu hlinitém z frakcí 13+14, 15-17, 18, 19-26) je čistý. Neznám ale jeho přesnou strukturu a musím počkat na výsledky spektrálních analýz. U této látky byla změřena její biologická aktivita (schopnost inhibovat acetylcholinesterázu). Naměřená hodnota, $IC_{50} = 35 \text{ mg/l}$, ukazuje, že účinnost látky CH-M/A-2 je nízká. Jedná se však pouze o výsledek předběžný, protože hodnotu IC_{50} nebylo možné přesně stanovit vzhledem k tomu, že není známa přesná struktura látky.

7. LITERATURA

¹ www.pharmanews.cz/2005_05/alzheimer.htm

² Pydychová, E.: Alzheimerova nemoc. *Solutio* 2002/2003, 21-28 (2002).

³ Koukolík, F., Jiráček, R.: Alzheimerova nemoc a další demence. Grada Publishing, Praha 1998, s. 214-219.

⁴ Giacobini, E.: Cholinesterases: new roles in brain function and in Alzheimer's disease. *Neurochem Res.* 28(3-4), 515-22 (2003).

⁵ Greig, N. H., Lahiri, D. K., Sambamurti, K.: Butyrylcholinesterase: an important new target in Alzheimer's disease therapy. *Int Psychogeriatr.* 14(1), 77-91 (2002).

⁶ Ibach, B., Haen, E.: Acetylcholinesterase inhibition in Alzheimer's Disease. *Curr Pharm Des.* 10(3), 231-51 (2004).

⁷ Gauthier, S., Emre, M., Farlow, M. R., Bullock, R., Grossberg, G. T., Potkin, S. G.: Strategies for continued successful treatment of Alzheimer's disease: switching cholinesterase inhibitors. *Curr Med Res Opin.* 19(8), 707-14 (2003).

⁸ 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).

⁹ Abe, Y., Aoyagi, A., Hara, T., Abe, K., Yamazaki, R., Kumagae, 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).

- ¹⁰ Toda, N., Tago, K., Marumoto, S., Takami, K., Ori, M., Yamada, N., Koyama, K., Naruto, S., Abe, K., Yamazaki, R., Hara, T., Aoyagi, A., Abe, Y., Kaneko, T., Kogen, H.: A conformational restriction approach to the development of dual inhibitors of acetylcholinesterase and serotonin transporter as potential agents for Alzheimer's disease. *Bioorg Med Chem.* 11(20), 4389-415 (2003).
- ¹¹ Mills, C., Cleary, B. J., Gilmer, J. F., Walsh, J. J.: Inhibition of acetylcholinesterase by Tea Tree oil. *J Pharm Pharmacol.* 56(3), 375-9 (2004).
- ¹² Zaheer-UI-Haq, Z. U., Wellenzohn, B., Liedl, K. R., Rode, B. M.: Molecular docking studies of natural cholinesterase-inhibiting steroidal alkaloids from *Sarcococca saligna*. *J Med Chem.* 46(23), 5087-90 (2003).
- ¹³ Orhan, I., Terzioglu, S., Sener, B.: Alpha-onocerin: an acetylcholinesterase inhibitor from *Lycopodium clavatum*. *Planta Med.* 69(3), 265-7 (2003).
- ¹⁴ 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 Learn Mem.* 80(2), 113-22 (2003).
- ¹⁵ Piotrovsky, V., Van Peer, A., Van Osselaer, N., Armstrong, M., Aerssens, J.: Galantamine population pharmacokinetics in patients with Alzheimer's disease: modeling and simulations. *J Clin Pharmacol.* 43(5), 514-23 (2003).
- ¹⁶ Corey-Bloom, J.: Galantamine: a review of its use in Alzheimer's disease and vascular dementia. *Int J Clin Pract.* 57(3), 219-23 (2003).
- ¹⁷ Simon, B. B., Knuckley, B., Powell, D. A.: Galantamine facilitates acquisition of a trace-conditioned eyeblink response in healthy, young rabbits. *Learn Mem.* 11(1), 116-22 (2004).

- ¹⁸ 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).
- ¹⁹ 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 Behav*. 75(3), 675-86 (2003).
- ²⁰ 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).
- ²¹ Jin, G., Luo X., He, X., Jiang, H., Zhang, H., Bai, D.: Synthesis and docking studies of alkylene-linked dimers of (-)-huperzine A. *Arzneimittelforschung*. 53(11), 753-7 (2003).
- ²² 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).
- ²³ Cordato, D. J., Mather, L. E., Herkes, G. K.: Stereochemistry in clinical medicine: a neurological perspective. *J Clin Neurosci*. 10(6), 649-54 (2003).
- ²⁴ Opletalová, V., Opletal, L., Jun, D.: Pokroky ve vývoji cholinergik pro léčbu Alzheimerovy choroby. Sborník abstraktů z 34. konference: Syntéza a analýza léčiv. Brno 12.-14.9.2005, s. 27.
- ²⁵ Opletal, L., Opletalová, V.: Současné uplatnění některých přírodních látek v terapii demencí Alzheimerova typu. Sborník abstraktů z 34. konference: Syntéza a analýza léčiv. Brno 12.-14.9.2005, s. 26.
- ²⁶ 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. Wurzburg, Wurzburg 2005.

- ²⁷ Táborská, E., Bochořáková, H., Dostál, J., Paulová, H.: Vlaštovičník větší (*Chelidonium majus*) – přehled současného stavu poznatků. Čes. a Slov. Farm. 44(2), 71-75 (1995).
- ²⁸ Jirásek, V., Starý, F.: Atlas léčivých rostlin. SPN, Praha 1986, s.108.
- ²⁹ Slavík, J.: Alkaloidy rostlin makovitých (Papaveraceae) I. Látky z vlaštovičníku (*Chelidonium majus* L.). Českosl. Farm. 1, 15-17, (1954).
- ³⁰ www.avicenna.cz/item/chelidonium-majus-vlastovicnik-vetsi
- ³¹ Opletal, L.: osobní sdělení
- ³² Stahl, E.: Thin-Layer Chromatography. A laboratory book. Springer – Verlag Berlin, Heidelberg, New York 1969, s. 873.
- ³³ Československý lékopis. Vyd. 4. Svazek I. Avicenum, Praha 1987, s. 361.
- ³⁴ 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).
- ³⁵ Bores, G. M., Kosley, R. W. Jr.: Galanthamine derivatives for treatment of Alzheimer's diseases. Drugs Fut. 21 (6), 621-635 (1996).
- ³⁶ Tang, X. C., He X. C., Bai, D. L.: Huperzin A: a novel acetylcholinesterase inhibitor. Drugs fut., 24 (6), 647-663 (1999).
- ³⁷ 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), 491-494 (1996).

³⁸ 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).

³⁹ Kuznetsová, L. P., Nikol'skaya, E. B., Sochilina, E. E., Faddeeva, M. D.: Inhibition of enzymatic hydrolysis of acetylthiocholine with acetylcholinesterase by principal alkaloids isolated from *Chelidonium majus* and *Macleya* and by derivate drugs. *Tsitologiya.* 43 (11), 1046-1050 (2001).

⁴⁰ Slavík, J., Slavíková, L.: Minor alkaloids from *Chelidonium majus* L. *Collection Czechoslov. Chem. Commun.* 42, 2686 – 2693 (1977)

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma „BIOLOGICKÁ AKTIVITA OBSAHOVÝCH LÁTEK ROSTLIN IV. VLIV ALKALOIDŮ Z CHELIDONIUM MAJUS L. NA ACETYLCHOLINESTERÁZU“ vypracovala samostatně s konzultací mého školitele. Použité prameny jsou uvedeny v literárních odkazech.

V Hradci Králové
9. května 2006

.....
podpis



