

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

## **DIPLOMOVÁ PRÁCE**

**Biologicky aktivní metabolity rostlin. 9.**

**Alkaloidy *Fumaria officinalis* L. a jejich biologická aktivita**

**Biologically active metabolites of plants. 9.**

**Alkaloids of *Fumaria officinalis* L. and their biological activity**

Vedoucí katedry: prof. RNDr. Luděk Jahodář, CSc.

Vedoucí diplomové práce: Ing. Lucie Cahlíková, Ph.D.

Hradec Králové, 2013

Dominika Kassemová

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

V Hradci Králové, 2013

.....

podpis

Za finanční podporu děkuji grantům SVV UK 265 002, FRVŠ 664/2011 a FRVŠ 190/2012.

Ráda bych poděkovala Ing. Lucii Cahlíkové, Ph.D. za odborné vedení, rady a pomoc při vypracování diplomové práce, dále PharmDr. Jakobovi Chlebkovi, Ph.D. za čas se mnou strávený v laboratoři, poskytnuté materiály, měření optické otáčivosti a trpělivost. Též děkuji ing. Kateřině Macákové, Ph.D. a prof. RNDr. Lubomíru Opletalovi, CSc za stanovení biologických aktivit izolovaných látek, doc. PharmDr. Jiřímu Kunešovi, Ph.D. za změření a interpretaci NMR spekter izolovaných látek. Nesmím opomenout poděkovat ostatním pracovníkům katedry farmaceutické botaniky a ekologie za vytvoření skvělých podmínek k vypracování této diplomové práce.

## OBSAH

PŘEHLED OBRÁZKŮ .....	7
PŘEHLED TABULEK .....	8
SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK .....	9
1 ÚVOD .....	10
2 CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE.....	11
3 TEORETICKÁ ČÁST .....	12
3.1 Alzheimerova choroba.....	12
3.1.1 Etiologie.....	12
3.1.1.1 $\beta$ -amyloid.....	12
3.1.1.2 Fosforylovaný $\tau$ -protein.....	13
3.1.1.3 Apolipoprotein E.....	13
3.1.1.4 Oxidační stres .....	14
3.1.1.5 Zánět .....	14
3.1.2 Klinický obraz.....	15
3.1.3 Rizikové faktory .....	15
3.1.4 Léčba AD.....	16
3.1.4.1 Funkce acetylcholinu v lidském organismu.....	16
3.1.4.1.1 Enzymy ovlivňující patogenezi AD.....	17
3.1.4.1.2 Inhibitory acetylcholinesteras .....	17
3.1.4.1.3 Inhibitory NMDA receptorů .....	19
3.1.4.1.4 Doplnková farmakoterapie .....	19
3.2 <i>Fumaria officinalis</i> L. (Fumariaceae).....	20
3.2.1 Taxonomické zařazení .....	20
3.2.2 Botanická charakteristika.....	20
3.2.3 Morfologický popis.....	21
3.2.4 Stanoviště a rozšíření .....	21
3.2.5 Lidové léčitelství.....	21
3.2.6 Fytoterapeutika .....	21
3.2.7 Obsahové látky .....	22
3.2.7.1 Isochinolinové alkaloidy.....	22
3.2.7.2 Fenolové sloučeniny .....	24
3.2.8 Biologická aktivita obsahových látek.....	24

3.2.8.1	Biologická aktivita extraktů z rostlin rodu <i>Fumaria</i> .....	24
3.2.8.2	Biologická aktivita fenolových kyselin .....	24
3.2.8.3	Biologická aktivita alkaloidů .....	25
3.2.8.4	Inhibitory cholinesteras izolované z rostlin patřících do řádu Papaverales .....	25
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	27
4.1	Materiál a vybavení .....	27
4.1.1	Rozpouštědla a chemikálie .....	27
4.1.2	Pomocné látky.....	27
4.1.3	Vyvíjecí soustavy pro tenkovrstvou chromatografii (TLC) .....	27
4.1.4	Chromatografické adsorbenty .....	27
4.1.5	Přístrojové vybavení .....	28
4.1.6	Rostlinný materiál.....	28
4.2	Obecné postupy.....	29
4.2.1	Příprava a čištění rozpouštědel .....	29
4.2.2	Odpařování extraktů a frakcí .....	29
4.2.3	Sušení a skladování frakcí a izolovaných čistých látek .....	29
4.2.4	Detekce alkaloidů .....	29
4.2.4.1	TLC detekce.....	29
4.2.5	Příprava sloupcové chromatografie .....	29
4.2.6	Příprava litých desek pro preparativní TLC .....	30
4.3	Strukturní analýza .....	31
4.3.1	GC-MS analýza.....	31
4.3.2	NMR analýza .....	31
4.3.3	Optická otáčivost .....	31
4.3.4	Teplota tání .....	31
4.4	Izolace alkaloidů .....	32
4.4.1	Příprava sumárního alkaloidního extraktu .....	32
4.4.2	Izolace isochinolinových alkaloidů pro biologické testy.....	33
4.4.2.1	Separace alkaloidního výtřepku na chromatografickém sloupci .....	33
4.4.2.2	Separace alkaloidů z frakce č. 88 – 93.....	34
4.4.2.2.1	Izolace alkaloidů z 1. zóny (0,66 g).....	35
4.4.2.2.2	Izolace alkaloidů z 2. zóny (0,52 g).....	36
4.4.2.2.3	Izolace alkaloidů z 3. zóny (0,68 g).....	36
4.4.2.3	Izolace alkaloidů z matečného louhu po krystalizaci frakce 88 – 93 (7,8 g).....	36
4.4.2.3.1	Frakce 12 – 21 (1,05 g).....	36

4.4.2.3.2	Frakce 22 – 29 (1,53 g) a 30 – 59 (1,91 g) .....	36
4.4.2.3.3	Frakce 60 – 66 (0,42 g) a 67 – 74 (0,79 g) .....	37
4.5	Stanovení inhibiční aktivity alkaloidů a alkaloidních extraktů vůči erytrocytární AChE a sérové BuChE.....	38
4.5.1	Chemikálie a materiál .....	38
4.5.2	Přístroj použitý pro stanovení cholinesterasové inhibiční aktivity .....	38
4.5.3	Podmínky měření .....	38
4.5.4	Příprava erytrocytárních pouzder.....	39
4.5.5	Stanovení cholinesterasové inhibiční aktivity (hodnoty IC50).....	39
4.5.6	Cholinesterasová aktivita sumárního alkaloidního extraktu .....	39
5	VÝSLEDKY .....	41
5.1	Strukturní analýza .....	41
5.1.1	Protopin (DK-1) a kryptopin (DK-2).....	41
5.1.1.1	NMR analýza .....	41
5.1.1.2	MS analýza .....	44
5.1.1.3	Teplota tání .....	45
5.1.1.4	Optická otáčivost .....	45
5.1.2	(-)-Fumaricin (DK-3) .....	46
5.1.2.1	NMR analýza .....	46
5.1.2.2	MS analýza .....	47
5.1.2.3	Teplota tání .....	47
5.1.2.4	Optická otáčivost .....	48
5.1.3	(+)-Bikukulin (DK-4) .....	49
5.1.3.1	NMR analýza .....	49
5.1.3.2	MS analýza .....	50
5.1.3.3	Teplota tání .....	50
5.1.3.4	Optická otáčivost .....	50
5.2	Biologická aktivita izolovaných alkaloidů.....	51
6	DISKUZE .....	52
7	LITERATURA .....	54
	ABSTRAKT	
	ABSTRACT	

## PŘEHLED OBRÁZKŮ

Obr. 1	<i>Fumaria officinalis</i> L. ....	20
Obr. 2	Strukturní typy ischinolinových alkaloidů rodu <i>Fumaria</i> .....	23
Obr. 3	Sumární alkaloidní diethyletherový výtřepek <i>Fumaria officinalis</i> L. ....	32
Obr. 4	Souhrnná deska frakcí A1 – A11 .....	34
Obr. 5	Chromatogram frakce 88 – 93 .....	34
Obr. 6	Chromatogram frakce 88 – 93 GC-MS .....	35
Obr. 7	Souhrnné TLC alkaloidů frakce 60 – 74.....	37
Obr. 8	Struktura protopinu (DK-1) a kryptopinu (DK-2) .....	41
Obr. 9	<sup>1</sup> H NMR spektrum protopinu.....	42
Obr. 10	<sup>1</sup> H NMR spektrum kryptopinu.....	42
Obr. 11	<sup>13</sup> C NMR spektrum protopinu.....	43
Obr. 12	<sup>13</sup> C NMR spektrum kryptopinu.....	44
Obr. 13	EI-MS spektrum protopinu .....	44
Obr. 14	EI-MS spektrum kryptopinu .....	45
Obr. 15	(–)-fumaricin.....	46
Obr. 16	<sup>1</sup> H NMR spektrum (–)-fumaricinu.....	46
Obr. 17	<sup>13</sup> C NMR spektrum (–)-fumaricinu.....	47
Obr. 18	EI-MS spektrum (–)-fumaricinu .....	47
Obr. 19	(+)-bikukulin.....	49
Obr. 20	<sup>1</sup> H NMR spektrum (+)-bikukulinu.....	49
Obr. 21	<sup>13</sup> C NMR spektrum (+)-bikukulinu.....	50
Obr. 22	EI-MS spektrum (+)-bikukulinu .....	50

## PŘEHLED TABULEK

Tab. 1	Výskyt jednotlivých strukturních typů alkaloidů v druzích rodu <i>Fumaria</i> .....	22
Tab. 2	Isochinolinové alkaloidy <i>Fumaria officinalis</i> L. ....	24
Tab. 3	Inhibitory cholinesteras izolované z rostlin řádu Papaverales.....	26
Tab. 4	Spojené sumární alkaloidní frakce.....	33
Tab. 5	Alkaloidy 1. zóny.....	35
Tab. 6	Přehled spojených frakcí získaných z matečného louhu.....	36
Tab. 7	Separace frakce 60 – 74.....	37
Tab. 8	Inhibiční aktivita alkaloidního extraktu <i>Fumaria officinalis</i> L. vůči AChE a BuChE.....	40
Tab. 9	<sup>1</sup> H NMR posuny a multiplicita signálů v CDCl <sub>3</sub> (25 °C) při 500 MHz protopinu a kryptopinu .....	41
Tab. 10	<sup>13</sup> C NMR posuny a multiplicita signálů v CDCl <sub>3</sub> (25 °C) při 125 MHz protopinu a kryptopinu.....	42
Tab. 11	Inhibiční aktivita alkaloidů izolovaných z <i>Fumaria officinalis</i> L. vůči AChE a BuChe .....	51



## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

A $\beta$	$\beta$ -amyloid
ACh	acetylcholin
AChE	acetylcholinesterasa
AD	alzheimerova choroba
ApoE	apolipoprotein E
APP	amyloidní prekurzorový protein
ATP	adenosintrifosfát
BuChE	butyrylcholinesterasa
CNS	centrální nervová soustava
FDA	Food and Drug Administration
GAL	galanthamin
GC	plynová chromatografie
Hup A	huperzin A
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie
IC	inhibiční koncentrace
ICHS	ischemická choroba srdeční
Mr	molekulární hmotnost
MS	hmotnostní spektrometrie
NMR	nukleární magnetická rezonance
NÚ	nežádoucí účinek
Rf	retenční faktor
TLC	tenkovrstvá kapalinová chromatografie
UV	ultrafialová oblast

# 1 ÚVOD

Populace se dožívá stále vyššího věku, spolu s tím se zvyšuje počet pacientů trpících Alzheimerovou chorobou (AD), která patří mezi nejčastější demence vůbec. Dříve se lidé dožívali mnohem nižšího věku, choroba se u většiny často nestačila ani projevit. Jedná se o nevyléčitelné onemocnění neznámé příčiny postihující osoby především staršího věku. Během AD dochází ke snížení hladin acetylcholinu (ACh), který je rozkládán enzymy acetylcholinesterásou (AChE) a butyrylcholinesterásou (BuChE). Inhibicí těchto dvou enzymů docílíme zvýšení hladin ACh a tím zlepšení cholinergního přenosu na nervových synapsích v centrální nervové soustavě (CNS).<sup>1</sup>

Současná farmakoterapie nám umožňuje pouze zpomalit nástup pozdějších stádií a prodloužit nemocnému období soběstačnosti, nikoli plné uzdravení. Inhibitory cholinesterás patří mezi současné trendy terapie. V současnosti se v terapii AD stále používá galanthamin jako selektivní inhibitor AChE. Jedná se o přírodní léčivo rostlinného původu, a proto je tu stále naděje, že se najdou další látky, které budou sloužit jako předlohy nebo nová potenciální léčiva. V pozdějších stádiích AD dochází ke zvyšování hladin butyrylcholinesterázy (BuChE), která je tvořena gliovými buňkami, a proto je vhodné zaměřit se na hledání inhibitorů obou enzymů současně.

Během screeningu inhibitorů AChE přírodního původu vykazoval alkaloidní extrakt rostliny *Fumaria officinalis* L. slibnou inhibiční aktivitu vůči AChE.<sup>2</sup> Obecně je čeleď Fumariaceae bohatá na isochinolinové alkaloidy různých strukturních typů. Jedná se o látky sekundárního metabolismu rostlin, které ve své molekule obsahují jeden či více atomů dusíku. Rostlina na jejich syntézu vynakládá veliké množství energie a musí vlastnit vysoce specializované enzymy. Obecně se jedná o látky lipofilního charakteru, které jsou ve vodě málo rozpustné. Díky své struktuře dobře pronikají přes hematoencefalickou bariéru, což jim umožňuje ve větší míře inhibovat mozkové cholinesterasy.

## 2 CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE

Cíle diplomové práce:

1. příprava sumárního alkaloidního extraktu z natí *Fumaria officinalis* L.,
2. sloupcová chromatografie diethyletherového výtřepku získaného ze sumárního extraktu *Fumaria officinalis* L. a izolace alespoň dvou alkaloidů v čisté formě z vybrané frakce,
3. stanovení fyzikálně-chemických vlastností izolovaných alkaloidů (optická otáčivost, teplota tání) a struktury MS a NMR analýzou,
4. stanovení biologické aktivity čistých izolovaných látek vůči lidské erytrocytární acetylcholinesterase a sérové butyrylcholinesterase.

## 3 TEORETICKÁ ČÁST

### 3.1 Alzheimerova choroba

Alzheimerova choroba (AD) je primární neurodegenerativní onemocnění neznámé etiologie a zároveň je nejčastějším typem demence. Diagnostikujeme ji u 50-60 % všech demencí. V seniliu (po 70. roku věku) se vyskytuje dvakrát častěji u žen než u mužů.<sup>1</sup>

#### 3.1.1 Etiologie

Příčiny onemocnění nejsou stále objasněny, ale i tak existují hypotézy, které se snaží objasnit, jaké patologické procesy tuto nemoc provázejí.

##### 3.1.1.1 $\beta$ -amyloid

$\beta$ -amyloid ( $A\beta$ ) byl prvně identifikován při čištění strukturálních patologických jader amyloidních plaků a cév účastnících se mozkové amyloidní angiopatie.<sup>3,4</sup>  $A\beta$  je přirozeným produktem metabolismu, který je tvořen 36-43 aminokyselinami.  $A\beta$  vzniká proteolýzou amyloidního prekursorového proteinu (APP).<sup>5</sup> Normální fyziologická funkce APP je zatím nejasná. Předpokládá se, že by se v mozku mohl podílet na růstu neuritů.<sup>1</sup>

Nerovnováha mezi produkcí, odstraňováním a agregací peptidu způsobuje akumulaci  $A\beta$  a tento nadbytek může být zahajovacím faktorem AD. Mluvíme o tzv. „amyloidní hypotéze“, která je založena na studiích genetických forem AD. Dokazuje, že  $A\beta_{42}$  je pro buňky toxický.  $A\beta_{42}$  je oproti  $A\beta_{40}$  méně běžný a je náchylnější k agregaci. Jedná se o proteinový fragment, který se shlukuje a v mozku vytváří plaky, které jsou charakteristickým diagnostickým znakem AD.<sup>6,7,8</sup>

$A\beta$  se spontánně shlukuje do koexistujících fyzických forem. Jedna forma je složena z 2-6 peptidů, které se spojují do přechodných aglomerátů.<sup>9,10</sup> Nejvíce neurotoxické formy  $A\beta$  jsou přechodné amyloidy a rozpustné oligomery.<sup>11</sup>

Fyziologická hladina synaptických  $A\beta$  tlumí vzrušivý přenos a brání neuronální hyperaktivitě.<sup>12</sup> Proteinasa neprilysin a insulin-degradující enzym regulují ustálenou hladinu  $A\beta$ . Neprilysin a membránová endopeptidasa odbourávají  $A\beta$  monomery a oligomery.<sup>13</sup> Snížení neprilysinu způsobuje nahromadění mozkových  $A\beta$ .<sup>14</sup> Insulin-rozkládající enzym a thiol metaloendopeptidasa rozkládají malé peptidy jako jsou insulin a monomerní  $A\beta$ .<sup>15</sup> Nadměrná exprese neprilysinu nebo insulin-rozkládajícího enzymu

zabraňuje tvorbě plaků.<sup>16</sup> Redukcí neprilysinu nebo insulin-rozkládajícího enzymu se sníží rozklad A $\beta$  o více než 50 %.<sup>17</sup>

### **3.1.1.2 Fosforylovaný $\tau$ -protein**

Neurofibrilární pleteně u AD nazýváme tautopatie. Jedná se o vláknité inkluze v pyramidových nervových buňkách.<sup>18</sup> Jejich počet je patologickým ukazatelem vážnosti AD. Základní komponentou pletení je neobvykle fosforylovaná a agregovaná forma  $\tau$ -proteinu.<sup>19</sup>  $\tau$ -protein je v mozku široce rozšířený a jeho primární funkcí je udržování mikrotubulární stability.<sup>20</sup> Jedná se o obvykle dobře rozpustný protein. Hyperfosforylovaný  $\tau$ -protein je naproti tomu nerozpustný, postrádá afinitu k mikrotubulům a sám se spojuje do párových helixů. Rozsah fosforylace je regulován enzymy, které dodávají a odstraňují fosfátové zbytky.<sup>19</sup> Stejně jako oligomery A $\beta$  jsou agregované molekuly  $\tau$ -proteinu cytotoxické a poškozují kognitivní funkce.<sup>21,22</sup>

### **3.1.1.3 Apolipoprotein E**

Apolipoprotein E (ApoE) je transportní protein kódovaný čtyřmi geny, které jsou umístěné na dlouhém raménku chromosomu 19. Tento protein je často spojován s patogenezi AD.<sup>23,24</sup> Poprvé byl identifikován a intenzivněji prostudován v kontextu s aterosklerózou a ICHS.<sup>25</sup> ApoE je hlavním transportérem cholesterolu. Zvýšené riziko ischemické choroby srdeční (ICHS) mají pacienti, kteří jsou nositeli alely E<sub>4</sub>. ApoE<sub>4</sub> je nejméně účinná isoforma, co se týče vychytávání lipoproteinových částic, čímž dochází ke zvýšení sérové hladiny cholesterolu a s tím i rizika ICHS.<sup>26</sup>

ApoE existuje ve třech alelových variantách označených E<sub>2</sub>, E<sub>3</sub> a E<sub>4</sub> s frekvencí výskytu 8%, 77% a 15%. Biochemické testy potvrdily přímou interakci ApoE s A $\beta$  a APP. Komplexní formace zahrnuje terminální karboxylovou doménu, která je specifická pro jednotlivé isoformy ApoE.<sup>27</sup>

ApoE funguje jako proteinový nosič lipidů (fosfolipidů, cholesterolu). V mozku se podílí na opravě nervových buněk jako odpověď na jejich poškození. Nedostatek ApoE byl prokázán jako negativní výsledek po přechodné mozkové ischemii a traumatu mozku. Studie *in vitro* prokázaly, že ApoE chrání smíšené kultury neuronálních a gliových buněk proti ireverzibilnímu oxidačnímu poškození H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> snížením glutamátové excitotoxicity.<sup>25</sup> Kromě své funkce v integritě lipidů a synaptické plasticitě by ApoE mohl přímo či nepřímo zasahovat do stavu některých antioxidantů v mozku.<sup>28</sup>

ApoE<sub>3</sub> je zodpovědný za ochranu nervových buněk proti toxicitě indukované Aβ prostřednictvím Aβ-komplexů a internalizaci přes receptory ApoE.<sup>29</sup>

Přítomnost genu ApoE<sub>4</sub> zvyšuje prevalenci aterosklerózy, koronárních arteriálních onemocnění a cerebrovaskulární ischemie.<sup>30</sup> Tyto okolnosti jsou významným rizikovým faktorem pro rozvoj AD.<sup>31</sup> ApoE<sub>4</sub> může urychlovat procesy vedoucí k amyloidní angiopatii v mozku u AD a stavy vedoucí ke kraniálnímu krvácení.<sup>32</sup> To vše je spojeno s hypoperfúzí mozku v temporo-parietálních krajinách u pacientů s AD.<sup>33</sup>

Podědění genu ApoE<sub>4</sub> zvyšuje riziko vzniku AD až čtyřnásobně. Riziko se dále zvyšuje, pokud jedinec podědil gen od obou rodičů. ApoE<sub>4</sub> váže Aβ rychleji, což nejspíš vede ke zvýšení amyloidních deposit. Komplex Aβ-ApoE<sub>4</sub> synergicky zvyšuje vazokonstrikce v mozku.<sup>34</sup>

#### **3.1.1.4 Oxidační stres**

Oxidační poškození a citlivost k oxidačnímu stresu se zvyšuje s věkem. Oxidační stres je všeobecný termín, který se užívá pro popis oxidačního poškození v buňce, tkáni nebo orgánu způsobeného reaktivními sloučeninami kyslíku a nerovnováhou mezi oxidačními a antioxidačními pochody.<sup>35,36,37</sup>

Aktivovaná mikroglia a astrocyty uvolňují volné radikály a faktory zánětu AD, čímž přispívají do patogeneze oxidačního stresu.<sup>35,36,37</sup>

Mechanismus působení oxidačního poškození zahrnuje peroxidaci lipidů, oxidaci proteinů a DNA.

#### **3.1.1.5 Záněť**

Počet reaktivních astrocytů je u AD zvýšen, s čímž souvisí i zvýšená exprese fosfolipasy A<sub>2</sub>, která podléhá nadměrné regulaci. Celý tento proces vede ke zvýšení tvorby a účasti kyseliny arachidonové/prostaglandinů v zánětlivých procesech.

Zvýšen je rovněž výskyt aktivovaných mikrobiálních buněk a produkce nejrůznějších potenciálně neurotoxických sloučenin, včetně superoxidu, glutamátu a NO.<sup>38,39</sup>

Nepřímo zodpovědný za neurotoxicitu aktivací mikroglíí a produkci reaktivních forem kyslíku je Aβ. Současná účast interferonu γ, známého jako aktivátoru mikroglíí, a Aβ má za následek neuronální poškození a degeneraci zprostředkovanou endogenní produkcí TNF-α mikroglíemi.<sup>40</sup> Důkazy poukazují na výskyt IL-1 v mikroglíích rozptýlených kolem amyloidních plaků.<sup>41</sup> IL-1 vyvolávají zvýšení translace m-RNA kódující β APP a její nadměrná exprese může vést k brzkému nástupu AD.<sup>42,43</sup>

### 3.1.2 Klinický obraz

Příznaky choroby se vyvíjejí pomalu a postupně. Rozlišit příznaky nemoci od příznaků doprovázejících stáří nemusí být zpočátku jednoduché. Stále není jasné, jak dlouho trvá preklinické stádium nemoci, tzn. vývoj choroby od prvních klinických příznaků. Toto stádium může trvat i několik let.<sup>1</sup>

Mezi první příznaky patří porucha krátkodobé paměti s charakteristickým zapomínáním každodenních událostí. Následuje změna chování, osobnosti a prohlubuje se ztráta jazykových funkcí. Nemocní často hledají slova, dochází k poruše konfrontačního pojmenování a vybavování čerstvě uložených paměťových dat. V pozdějších stádiích začínají bloudit, zapomínají, kudy se jde na místa, která navštěvovali desítky let. Dochází k poruše nekognitivních funkcí – deprese, halucinace, paranoidní bludy, agresivita.<sup>1</sup>

Někteří mohou trpět poruchami spánku. V závěrečných stádiích se objevuje porucha chůze, časté jsou epileptické záchvaty a myoklonus.<sup>1</sup>

Nemoc komplikující je přítomnost anozognozie, kdy jsou nemocní přesvědčení o tom, že jim nic není, a tudíž odmítají léčbu. Nemocní si myslí, že ji nepotřebují.<sup>1</sup>

### 3.1.3 Rizikové faktory

Z epidemiologických studií plynou rizikové vlivy, které se mohou podílet na rozvoji AD. Incidence i prevalence nemoci roste s věkem. Ve vysokém věku jsou ženy ohroženější než muži.<sup>1</sup>

Raná i pozdní forma AD se s vyšší četností vyskytuje v některých rodinách. Obě tyto formy vykazují tzv. familiární agregaci. Familiární agregace nemusí být sama o sobě důkazem genetické povahy onemocnění. Zvýšený výskyt může být podmíněn společně sdílenými vlivy prostředí. Předpokládá se, že jde o kombinaci genetických vlivů s vlivy zevního prostředí.<sup>1</sup>

Rizikem pro rané formy AD jsou genové mutace na chromozomech 21, 14 a 1. Neovlivnitelným faktorem pro pozdní formu AD je nosičství alely  $\epsilon$ -4 genu pro apolipoprotein E, locus na 12. chromozomu.<sup>1</sup>

Mezi další možné rizikové faktory lze zařadit poranění hlavy, nadužívání alkoholu, kouření, nižší úroveň vzdělání. Demence se u lidí s nízkou úrovní vzdělání může při stejné zátěži projevit dříve než u lidí s vysokou úrovní vzdělání.<sup>1</sup>

### 3.1.4 Léčba AD

Přesná etiologie onemocnění není stále objasněna. Základem léčby je farmakoterapie zahrnující inhibitory cholinesteras (kognitiva) a inhibitory NMDA receptorů. Samozřejmě existuje i další farmakoterapie k ovlivnění vlastních neurodegenerativních procesů na různých úrovních. Její použití však není jednoznačně založeno na důkazech, považujeme ji tedy za doplňkovou léčbu.

#### 3.1.4.1 *Funkce acetylcholinu v lidském organismu*

Acetylcholin je významným neurotransmiterem v procesech spojených s motorikou, učením a pamětí. Je syntetizován z cholinu acetylací acetylkoenzymem A acetylcholintransferasou, která je v centrální nervové soustavě (CNS) přítomna jen v cholinergních nervových buňkách. Je skladován ve vezikulách a po uvolnění je velmi rychle odbouráván acetylcholinesterasou, které jej štěpí na cholin a kyselinu octovou. V tělesných tekutinách včetně krve je štěpen butyrylcholinesterasou. Nedochází k jeho zpětnému vychytávání. Do nervové buňky je vychytáván cholin.<sup>44</sup>

Volný acetylcholin působí v mozku na všech úrovních stimulačně: na muskarinových ( $M_1$ - $M_5$ ) metabotropních receptorech a nikotinových (N) ionotropních receptorech. M-receptory jsou spřažené s G-proteinem a jejich odpověď na stimulaci je proto relativně pomalá. N-receptory jsou součástí receptorem řízených chloridových kanálů a na stimulaci odpovídají mnohem rychleji. Hojně se vyskytují ve funkci heteroreceptorů na glutamátergních, serotoninergních, GABAergních nebo dopaminergních neuronech, kde jejich stimulace vede k zvýšenému uvolňování příslušného neurotransmiteru.<sup>44</sup>

$M_1$ -receptory (neuronální) se nacházejí hlavně v CNS, periferních neuronech a parietálních buňkách v žaludku. Zprostředkovávají především excitační účinky acetylcholinu např. zvýšení sekrece kyseliny chlorovodíkové v žaludku, pomalou stimulaci v CNS.<sup>44</sup>

$M_2$ -receptory (kardiální) nalezneme v srdci a neuronálních tkáních. Zprostředkovávají převážně inhibiční reakce např. vagová inhibice srdeční frekvence, nesynaptická inhibice v centrálním i periferním nervovém systému.<sup>44</sup>

$M_3$ -receptory nalezneme ve žlázách a hladkých svalech. Jsou zodpovědné za excitační účinky acelycholinu a cholinergní stimulace jako je zvýšení sekrece slinných žláz, kontrakce hladkých svalů vnitřních orgánů, v hladkých svalech naopak způsobují relaxaci. Funkční význam  $M_3$  a  $M_4$  receptorů nebyl zatím přesně definován.<sup>44</sup>



#### 3.1.4.1.1 Enzymy ovlivňující patogenezi AD

Acetylcholinesterasa (AChE) a butyrylcholinesterasa (BuChE) jsou enzymy, které ukončují účinek acetylcholinu jeho rychlým rozkladem na cholin a kyselinu octovou.<sup>44</sup> Nacházejí se v cholinergních i non-cholinergních tkáních, plazmě i tělních tekutinách.<sup>45,46</sup>

AChE rychle hydrolyzuje acetylcholin (ACh) na cholinergních synapsích.<sup>47</sup> Hydrolyzou esterové vazby v molekule dochází ke ztrátě stimulační aktivity. Inhibicí AChE se prodlouží aktivita a existence ACh. Inhibicí tedy docílíme zvýšení hladin ACh, čehož se v medicíně využívá v terapii nemocí se sníženou hladinou ACh. Bylo zjištěno, že AChE má mimo neurotransmise i další funkce. AChE má roli adhezivního proteinu, v osteoblastech zprostředkovává interakce mezi buňkou a jejím matrix, účastní se růstu neuritů a produkce amyloidních fibril, které jsou typické pro mozkové buňky u pacientů s AD.<sup>48</sup>

BuChE je substrátově méně specifická.<sup>49</sup> Skutečná fyziologická funkce BuChE je stále neznámá.<sup>48</sup> Nachází se v játrech, plazmě a mozku (neuronech a gliových buňkách). Její aktivita v mozku se zvyšuje s věkem. U pacientů s AD je její aktivita zvýšená, zatímco aktivita AChE se snižuje. Pravděpodobně má roli v regulaci ACh v mozku.<sup>49</sup> BuChE bývá spojována s detoxikační funkcí v organismu. Hydrolyzuje nejen butyrylcholin, ale i toxické látky s esterovou vazbou jako je kokain.<sup>50</sup>

#### 3.1.4.1.2 Inhibitory acetylcholinesteras

Kognitiva zlepšují pozornost a paměťové schopnosti svými cholinomimetickými účinky. Mechanismus účinku je založen na inhibici acetylcholinesterasy, tedy enzymu, který je zodpovědný za biodegradaci acetylcholinu. Inhibicí docílíme zvýšení hladin acetylcholinu. Mezi nejdříve používané látky se řadí physostigmin, od kterého se díky jeho nežádoucím účinkům postupně odstoupilo. V dnešní době se používá donepezil, rivastigmin a galanthamin.<sup>44</sup>

**Donepezil** je piperidinová báze, reverzibilně a s vysokou selektivitou inhibuje acetylcholinesterasu. Mnohem menší afinitu vykazuje vůči butyrylcholinesterase. V dávce 5-10 mg/den zlepšuje ve srovnání s placebem kognitivní funkce.<sup>51</sup> Léčivo je obvykle dobře snášeno až na typické cholinergní vedlejší účinky, jako jsou: nauzea, zvracení, průjem, zácpa, bolest hlavy, závrať a poruchy spánku.

**Rivastigmin** je pseudo-ireverzibilní acetylcholinesterasový inhibitor. Preklinické studie ukázaly zlepšení kognitivních funkcí.<sup>52</sup> Z léčby profitují především pacienti s mírnou až

střední formou Alzheimerovy choroby.<sup>53</sup> Vedlejší účinky postihují především gastrointestinální trakt.

**Galanthamin** (GAL) je posledním léčivem, které schválila Food and Drug Administration (FDA) pro léčbu AD. V terapii se používá od 80. let 20. století. Strukturně se jedná o terciální alkaloid, který byl izolován z cibulí sněženky *Galanthus woronowii* Losinsk. s duálním mechanismem účinku. V největším množství byl detekován v rostlinách čeledi Amarillidaceae. Působí jako reverzibilní kompetitivní inhibitor AChE a zároveň představuje allosterický modulátor nikotinových receptorů, čímž na nich potencuje účinnost ACh. V dávkování 16-24 mg/den došlo ke zlepšení kognitivních a nekognitivních symptomů AD. Studie prokázaly, že vyšší dávky nezlepšují kognitivní funkce pacientů. Ve srovnání s placebem se zlepšily globální funkce, schopnosti vykonávat běžné denní činnosti a paměť.<sup>54</sup>

GAL se po p. o. podání snadno absorbuje prakticky nezávisle na lékové formě. Jídlo neovlivňuje celkovou dostupnost GAL, ale zpomaluje absorpci. Distribuce GAL z centrálního kompartmentu do tkání a orgánů probíhá neiontovou pasivní difúzí.<sup>54</sup>

Hlavní nežádoucí účinky (NÚ) souvisí s jeho cholinergními vlastnostmi. Mezi nejčastější patří: nevolnost, zvracení, závrať, bolest břicha, průjem, neklid, porucha spánku a lehká bolest hlavy. Významným NÚ je ztráta hmotnosti a chuti k jídlu. NÚ mohou být tlumeny podáním periferního antidota *N*-methylskopolamin hydrobromidu.<sup>54</sup>

Obměnou methoxyskupiny a terciární aminoskupiny byly připraveny deriváty GAL, které byly polárnější než původní molekula a vykazovaly větší inhibici AChE. Jejich polarita zabraňuje pronikání do CNS a to limituje jejich použití v praxi. Jako nadějný derivát GAL se jeví jeho ester *N*-butylkarbamát galanthaminu, který je méně toxický a díky menší polaritě má lepší průnik do CNS. Z hlediska vazby na AChE jsou *N*-substituované deriváty účinnější než *O*-substituované deriváty, což je způsobeno odlišným způsobem vazby na AChE.<sup>54</sup>

**Huperzin A** (Hup A) je alkaloid chinolizidinového typu, který je reverzibilním inhibitorem AChE. Prvně byl izolován z rostliny *Huperzia serrata* Thunb. Ex Murray. AChE inhibuje mnohem silněji než BuChE. Jedná se o opticky aktivní látku, která se stala předlohou strukturou pro syntézu nových látek, které budou potenciálně využitelné v terapii AD.<sup>55</sup> Hup A vykazuje oproti komerčně dostupnému takrinu vyšší biologickou dostupnost a lepší průchodnost přes hematoencefalickou bariéru.<sup>56</sup>

### 3.1.4.1.3 Inhibitory NMDA receptorů

V průběhu AD dochází k nadměrné excitaci NMDA receptorů nadměrným uvolněním excitačních aminokyselin (aspartát, glutamát). Glutamát je hlavním excitačním neurotransmiterem v mozku. Za normálních podmínek hraje důležitou roli v procesech učení a paměti. V průběhu AD dochází ke zvýšení koncentrace glutamátu, což vede k nadměrné stimulaci NMDA receptorů.<sup>57,58</sup> Tím je nepříznivě ovlivněna paměť a další poznávací funkce. Zvýšená vazba excitačních aminokyselin na NMDA receptory otevírá kalciové kanály a vede k nadměrnému influxu kalciových iontů do neuronů. Dochází k aktivaci řady enzymů a v konečném důsledku dochází ke zvýšení exprese genů pro buněčnou apoptózu, která vede k zániku neuronů. Jediným dnes užívaným inhibitorem NMDA receptorů je v ČR memantin.<sup>59</sup>

**Memantin** je nekompetitivní antagonist NMDA receptorů a zároveň zabraňuje nadměrnému influxu vápenatých iontů, který je způsoben nadměrnou stimulací NMDA receptorů.<sup>58,60</sup> U pacientů se střední až těžkou formou AD se ukázalo při dávkování 20mg/den zlepšení kognitivních funkcí, behaviorálních symptomů a každodenních činností.<sup>61</sup>

### 3.1.4.1.4 Doplnková farmakoterapie

Doplnková farmakoterapie spočívá v ovlivnění vlastních neurodegenerativních procesů na různých úrovních.<sup>44</sup>

Nesteroidní antiflogistika, která zabraňují tvorbě prostaglandinů, zpomalují zhoršování kognitivních funkcí u pacientů v pokročilém stádiu AD. Někteří zástupci potravních doplňků mohou mít více účinků např. protizánětlivé, antioxidantní nebo mohou zlepšovat energetický metabolismus mitochondrií.<sup>62,63</sup> Koenzym Q10, L-karnitin a kreatin příznivě ovlivňují energetický metabolismus mozku a produkci ATP. Potenciálně využitelným v terapii se jeví neurotrofní růstový faktor, který stimuluje růst neuronů v CNS. Dodání neurotrofního růstového faktoru u starých zvířat způsobilo zlepšení cholinergní aktivity, stejně tak paměti, učení a motorických výkonů.<sup>64</sup>

Dále můžeme farmakologicky inhibovat tvorbu a ukládání A $\beta$  a  $\tau$ -proteinu nesteroidními antiflogistiky nebo statiny. Excitotoxicitu lze potlačit např. inhibitory vápníkových kanálů nebo antioxidanty (vit. C a E,  $\beta$ -karotenoid).<sup>44</sup>

### 3.2 *Fumaria officinalis* L. (Fumariaceae)

Synonymum: *Fumaria sturmii* Opiz<sup>65</sup>

#### 3.2.1 Taxonomické zařazení

Oddělení: Magnoliophyta

Třída: Magnoliopsida

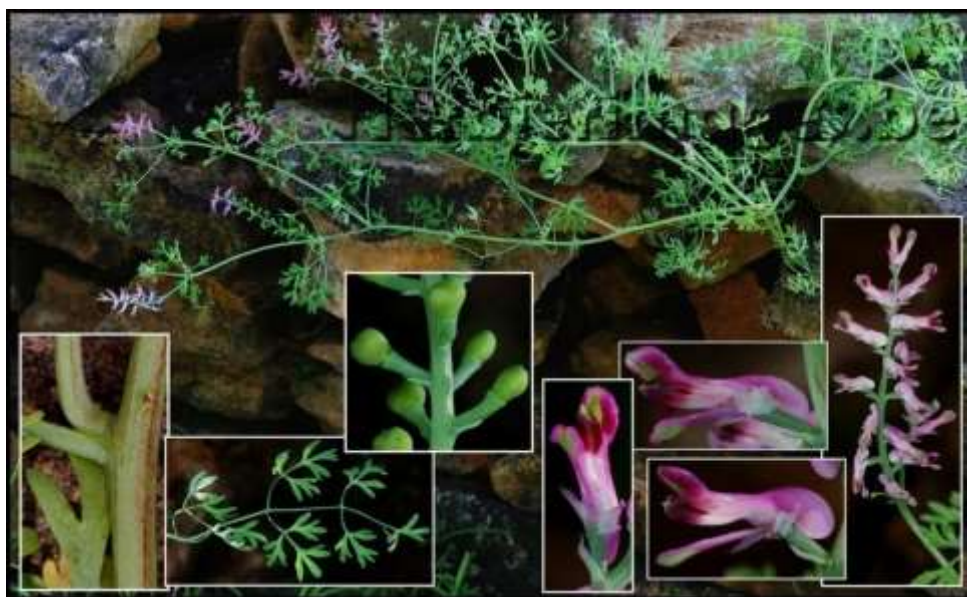
Podtřída: *Ranunculidae*

Řád: Papaverales

Čeleď: Fumariaceae

Rod: *Fumaria*

Druh: *Fumaria officinalis* L. – zemědělný lékařský<sup>65</sup>



Obr. 1 *Fumaria officinalis* L.

#### 3.2.2 Botanická charakteristika

Rod *Fumaria* zahrnuje více než 40 druhů.<sup>66</sup> Patří mezi jednoleté byliny hojně rozšířené po celé Evropě. Dále se mohou objevit ve střední a západní Asii, jeden druh se našel dokonce i ve východní Africe. Byliny jsou charakteristické svým tenkým kořenem a bohatě větvenými lodyhami.<sup>65</sup>

### 3.2.3 Morfologický popis

Zemědým lékařský je jednoletá sivozelená bylina s tenkým kořenem. Lodyha je přímá nebo vystoupavá někdy popínavá a bohatě větvená, 10-30 (-50)cm dlouhá s 2× zpeřenými řapíkatými listy. Lístky jsou řapíkaté, dlanitě a děleně zpeřené v 2-3 mm široké úkrojky. Květní hrozny jsou delší než jejich 2-3 cm dlouhé stopky, řídké až husté, 10-40květé. Květy bývají dlouhé 5-9 mm. Koruna je barvy purpurově růžové, bledě růžově červené, řidčeji bělavě růžová na vrcholu tmavě purpurová. Plod tvoří kulovitá jednosemenná nažka dosahující délky 1,7-2,6 mm.<sup>65</sup>

### 3.2.4 Stanoviště a rozšíření

Zemědým lékařský roste především na poli, úhoří a rumišti. Řidčeji se vyskytuje v ruderalizovaných křovinách a jako plevel v zahradách, sadech a parcích.

Roste hojně po celé Evropě. Můžeme se s ním setkat od Středozeří přes východ po Západosibiřskou nížinu, Kaspické moře, Madeiru a až po Kanárské ostrovy.<sup>65</sup>

### 3.2.5 Lidové léčitelství

Nať rostliny byla dříve oficiální pro obsah význačných alkaloidů např. fumaricinu, protopinu aj. Směs alkaloidů ovlivňuje činnost hladké svaloviny a střevní peristaltiku.<sup>67</sup>

Užívala se šťáva z čerstvých rostlin nebo sušená droga. V lidovém léčitelství se užívá dodnes.<sup>65</sup> Nejčastěji byl zemědým používán jako droga povzbuzující vyměšování a odstraňující trávicí potíže. Nálev je doporučován jako laxativum, mírné diuretikum, při žlučnickových a jaterních nemocech, žaludeční dyspepsii, při zácpě a při chorobách se zvýšeným zadržováním vody v těle. Společně s listem ořešáku slouží k přípravě vnějších hojivých obkladů při kožních vyrážkách, ekzémech a krvácejících hemoroidech.<sup>68</sup>

### 3.2.6 Fytoterapeutika

Extrakty z nadzemních částí některých druhů jsou v řadě zemí součástí fytoterapeutik užívaných především u hepatobiliárních a gastrointestinálních obtíží.<sup>69</sup> U fytoterapeutik jsou extrakty standardizovány na protopin.<sup>70,71</sup>

**Protopin** blokuje  $\text{Ca}^{2+}$  kanály a relaxuje hladké svalstvo.<sup>72</sup> Inhibuje tromboxan  $\text{A}_2$  syntetasu katalyzující přeměnu prostaglandinu  $\text{PG}_2$  s antiagregačním a vazodilatačním účinkem na tromboxan, který má proagregační a vazokonstrikční efekt.<sup>73</sup> Na základě

tohoto zjištění se uvažuje o využití antiagregačních účinků protopinu u léčby trombóz.<sup>74</sup> Protopin a tetrahydrokoptisin, který z něj vzniká, vykazují neuroleptický účinek.<sup>75</sup>

### 3.2.7 Obsahové látky

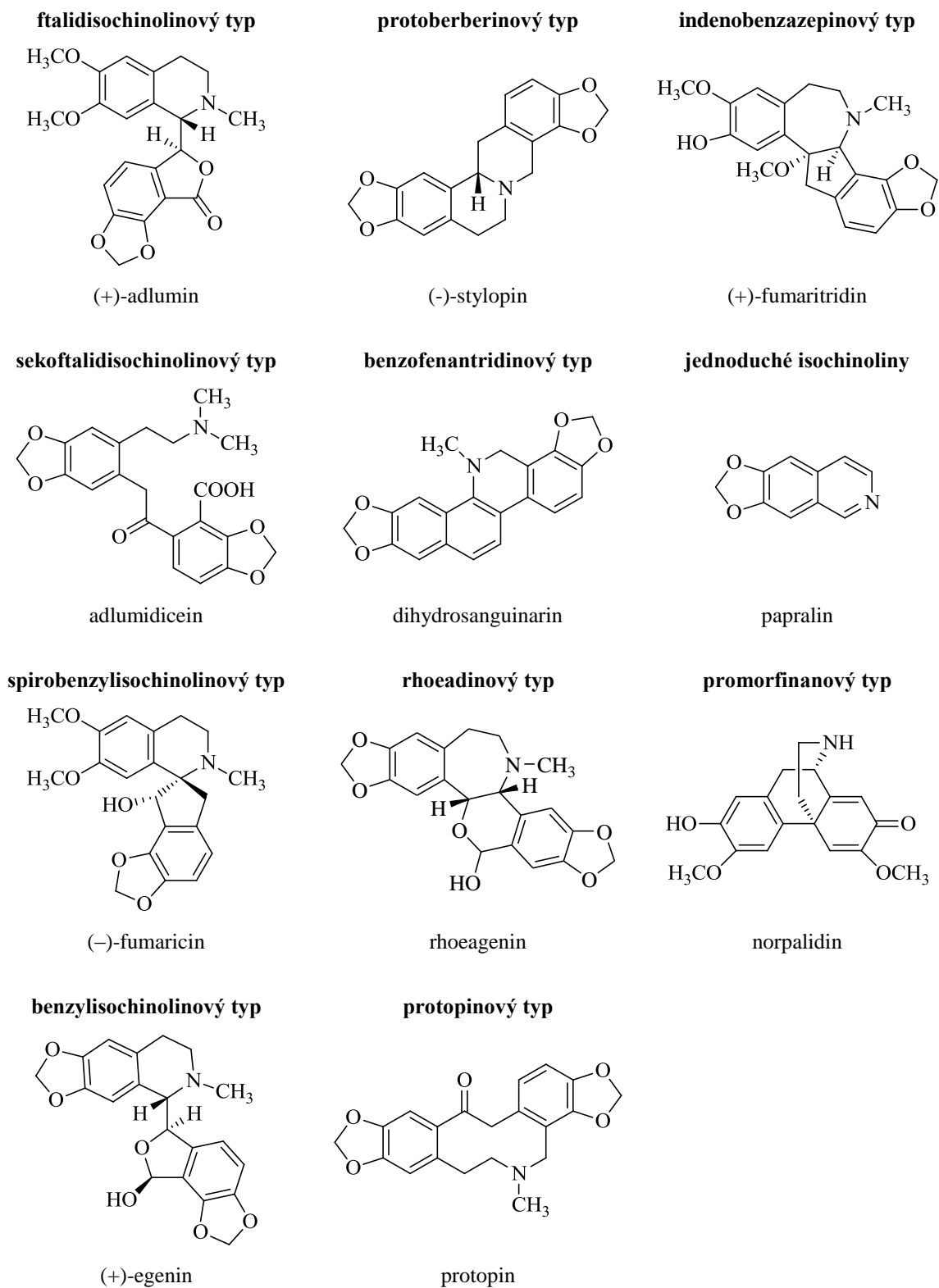
#### 3.2.7.1 Isochinolinové alkaloidy

Mezi hlavní obsahové látky rodu *Fumaria* patří isochinolinové alkaloidy. Bylo popsáno přes 137 isochinolinových alkaloidů různých strukturních typů (obr. 2).<sup>76</sup> Spektrum alkaloidů v rodu *Fumaria* závisí na druhu a geografickém výskytu rostliny (tab. 1).<sup>66</sup>

Tab. 1 Výskyt jednotlivých strukturních typů alkaloidů v druzích rodu *Fumaria*<sup>66</sup>

Rod <i>Fumaria</i>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<i>Fumaria agrafa</i> Lag.	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-
<i>Fumaria asepala</i> Boiss.	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>Fumaria bella</i> P. D. Sell	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-
<i>Fumaria bracteosa</i> Pomel	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
<i>Fumaria capreolata</i> L.	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-
<i>Fumaria cilicia</i> Hausskn.	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>Fumaria densiflora</i> DC.	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-
<i>Fumaria gaillardotii</i> Boiss.	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-
<i>Fumaria indica</i> Hausskn.	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-
<i>Fumaria kralikii</i> Jord.	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-
<i>Fumaria macrocarpa</i> Parl.	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-
<i>Fumaria macrosepala</i> Boiss.	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-
<i>Fumaria micrantha</i> Lag.	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-
<i>Fumaria microcarpa</i> Pugsley	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
<i>Fumaria muralis</i> Green.	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-
<b><i>Fumaria officinalis</i> L.</b>	<b>+</b>	<b>-</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>-</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>-</b>	<b>-</b>
<i>Fumaria parviflora</i> Lam.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
<i>Fumaria petteri</i> Rchb.	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-
<i>Fumaria rostellata</i> Knaf	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	-
<i>Fumaria schleicheri</i> Soy. – Will.	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-
<i>Fumaria schramii</i> Velen	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-
<i>Fumaria spicata</i> L.	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-
<i>Fumaria vaillantii</i> Loisel.	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-

1 typ isochinolinový, 2 benzyloisochinolinový, 3 aporfinový, 4 protoberberinový, 5 benzofenanthridinový, 6 protopinový, 7 ftalidisochinolinový, 8 sekoftalidisochinolinový, 9 indenobenzazepinový, 10 spirobenzyloisochinolinový, 11 promorfinanový, 12 rhoeadinový



Obr. 2 Strukturní typy isochinolinových alkaloidů rodu *Fumaria*

Alkaloidy z *Fumaria officinalis* L. byly izolovány z nadzemní části rostliny resp. natě. Přehled isochinolinových alkaloidů různých strukturních typů izolovaných anebo identifikovaných v této rostlině, jsou uvedeny níže (tab. 2).

Tab. 2 Isochinolinové alkaloidy *Fumaria officinalis* L.<sup>77</sup>

Alkaloidní strukturní typ	Alkaloidy
indenobenzazepinový	bulgaramin, (+)-fumaritridin, (+)-fumaritrin, fumarofin
spirobenzylisochinolinový	dihydrofumarilin, epihydrofumarilin, (-)-fumaricin, fumarilicin, (+)-fumarilin, fumaritin, fumaritin- <i>N</i> -oxid, fumaritridin, (+)-fumarofycin, (-)- <i>O</i> -methylfamurofycin, (+)-parfumidin
protoberberinový	(-)-cheilathifolin, koptisin, (±)-scoulerin, (-)-scoulerin, (±)-sinaktin, (-)-sinaktin, (±)-stylopin, (-)-stylopin, (-)-kanadin
benzofenantridinový	korydamin a sanguinarin
protopinový	protopin a kryptopin

### 3.2.7.2 Fenolové sloučeniny

Druhou skupinu látek s výraznými biologickými účinky tvoří fenolové sloučeniny. Tato skupina látek byla analyzována pouze u *F. officinalis* L.. Byly izolovány flavonoidy isokvercetin, kvercetin-3,7-glukosid, kvercetin-3-arabinosyl-glukosid, rutin a kamferol-arabinosid.<sup>66</sup> Mimoto byly popsány hořčiny, třísloviny, slizy, minerální látky a kyseliny: kyselina (-)-kaffeoyl-D-jablečná, (-)-feruloyl-D-jablečná a (-)-*p*-kumaroyl-D-jablečná<sup>78</sup>, fumarová, kávová a chlorogenová.<sup>79</sup>

### 3.2.8 Biologická aktivita obsahových látek

#### 3.2.8.1 Biologická aktivita extraktů z rostlin rodu *Fumaria*

Významný antipyretický účinek byl zaznamenán při podávání směsi látek získaných z hexanového, chloroformového a vodného extraktu *Fumaria parviflora* Lam.<sup>80</sup> Ethanolický extrakt *Fumaria parviflora* Lam. vykazuje významný kardiinhibiční, antiarytmický, hypotenzivní a antipyretický účinek.<sup>81</sup> U alkaloidního extraktu *Fumaria officinalis* L. byla popsána antiarytmická aktivita.<sup>82</sup> Na modelu primárních kultur potkaních hepatocytů byla testována cytotoxicita a hepatoprotektivita extraktů *Fumaria officinalis* L. a *Fumaria densiflora* DC. Hepatoprotektivní účinky celkových extraktů jsou ve srovnání se samotným proteinem malé.<sup>66</sup>

#### 3.2.8.2 Biologická aktivita fenolových kyselin

Stále větší pozornost se věnuje studiu biologické aktivity fenolových látek. U derivátů kyseliny skořicové, kávové, ferulové a *p*-kumarové byl zaznamenán cholagogní účinek.



Prokázalo se, že kyselina kávová inhibuje spasmolytickou aktivitu.<sup>83</sup> Spolu s kyselinou chlorogenovou inhibuje peroxidaci mastných kyselin LDL lipoproteinů.<sup>84</sup> Obě kyseliny aktivují jaterní enzymové systémy sloužící k biotransformaci xenobiotik.<sup>85</sup> Hojně zastoupená kyselina fumarová byla terapeuticky použita při léčbě lupenky.<sup>86</sup>

### 3.2.8.3 *Biologická aktivita alkaloidů*

U isochinolinových alkaloidů nalezených v rostlinách rodu *Fumaria* byly prokázány tyto biologické aktivity (níže jsou uvedené alkaloidy, které vykazují vykazující biologickou aktivitu):

- **(+)-fumarofycin:** antioxidační úč., antilipoperoxidační úč.<sup>87</sup>,
- **koptisin:** kardioprotektivní úč., antioxidační úč.,<sup>88</sup> inhibiční úč. na tvorbu osteoklastů, antipyretický úč., antifotooxidativní úč., protizánětlivý úč.,<sup>89</sup> hypoglykemický úč.,<sup>90</sup> neuroprotektivní úč., antioxidační úč.,<sup>91</sup> anfungální úč.<sup>92</sup>,
- **(-)-skulerin:** sedativní úč.<sup>93</sup>,
- **(-)-sinaktin:** antivirotický úč., antibakteriální úč.<sup>94</sup>,
- **(±)-stylopin:** antimikrobiální úč.<sup>95</sup>,
- **(-)-stylopin:** chemoprotektivní úč.,<sup>96</sup> antiflogistick úč.,<sup>97</sup> cytotoxický úč.,<sup>98</sup> inhibice cytochromu CYP 2D6, CYP 2C19, CYP 3A4<sup>99</sup>,
- **(-)-kanadin:** antioxidační úč.,<sup>100</sup> antibakteriální úč.,<sup>101</sup> chemopreventivní úč.<sup>102</sup>,
- **sanguinarin:** protizánětlivý úč.,<sup>103</sup> antibakteriální úč.<sup>104</sup>,
- **kryptopin:** antibakteriální úč.,<sup>105</sup> anthelmintický úč.<sup>106</sup>,
- **protopin:** antiagregační úč.,<sup>107</sup> neuroprotektivní úč.,<sup>108</sup> ihibiční úč. na mozkou GABA transaminasu,<sup>109</sup> inhibice AChE a BuChE,<sup>110</sup> stimulační úč. na glutamátdehydrogenasu,<sup>111</sup> antagonist opiodních  $\delta$ -receptorů,<sup>112</sup> antihypertenzivní úč., negativně ionotropní úč.<sup>113</sup>

### 3.2.8.4 *Inhibitory cholinesteras izolované z rostlin patřících do řádu Papaverales*

Do řádu Papaverales patří rostliny čeledí Papaveraceae a Fumariaceae, které jsou si blízké nejen po stránce botanické, ale i z hlediska obsahových látek. V rostlinách řádu Papaverales byly nalezeny účinné inhibitory cholinesteras. V následující tabulce uvádím příklady isochinolinových alkaloidů identifikovaných jako inhibitory cholinesterás, společně s jejich hodnotami IC<sub>50</sub> (tab. 3).

Tab. 3. Inhibitory cholinesteras izolované z rostlin řádu Papaverales

Rostlina	Sloučenina	Aktivita IC <sub>50</sub> (μM)		Ref
		AChE	BuChE	
<i>Corydalis speciosa</i> Maxim.	protopin	16,1	–	114
	palmatin	5,8	–	115
	berberin	3,3	–	
<i>Corydalis turtschaninovii</i> Bess.	palmatin	0,74	–	116
	jatrorrhizin	2,08	–	
	koptisin	1,01	–	116
	korydalin	25,1	108,7	
	xylopinin	26,5	92,0	
	stylopin	20,8	95,6	
	korydalinin	20,3	85,5	
	oxyberberin	10,5	117,5	
	korytenchin	48,5	–	117
	pseudokoptisin	24,5	–	
	protopin	10,2	26,8	
	oxoglaucidalin	5,5	47,5	
	oxoglaucin	2,1	29,2	
	glaucin	2,5	58,2	
	<i>Corydalis cava</i> (L.) Schweigg & Koerte	kanadin	12,4	483,0
korydalin		40,5	>1000	118
korykavidin		223,0	46,2	
kanadalin		20,1	85,2	
<i>Fumaria vaillantii</i> Loisel.	kanadin	2,6	–	
	bulbokapnin	2,0	–	119
	protopin	1,80	–	
<i>Sanguinaria canadensis</i> L.	protoberberin	34 <sup>1</sup>	>100 <sup>2</sup>	
	pseudokoptisin	11 <sup>1</sup>	–	
	13-methylberberin	8 <sup>1</sup>	–	
	koptisin	5,8 <sup>1</sup>	>100 <sup>2</sup>	120,121
	pseudoepiberberin	5,1 <sup>1</sup>	–	
	koralyln	1,3 <sup>1</sup>	–	
	berberin	0,98 <sup>1</sup>	>100 <sup>2</sup>	
	chelilutin	20 <sup>1</sup>	–	
	sangvilutin	11 <sup>1</sup>	–	
chelerythrin	9,4 <sup>1</sup>	14 <sup>2</sup>		

<sup>1</sup> mozková krysí AChE, <sup>2</sup> lidská sérová BuChE; pokud není uvedeno jinak, pro stanovení inhibice cholinesterás byla používána AChE z elektrického úhoře (*Electrophorus electricus*) a koňská sérová BuChE.

## 4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 4.1 Materiál a vybavení

#### 4.1.1 Rozpouštědla a chemikálie

- chloroform p. a. (Penta a.s., ing. Švec, CZ) ( $\text{CHCl}_3$ )
- diethylether č. (LachNer, CZ) ( $\text{Et}_2\text{O}$ )
- kyselina chlorovodíková 35%, p. a. (Lachema) ( $\text{HCl}$ )
- ethanol 95%, denaturovaný methanolem, p.a. (Penta a.s.) ( $\text{EtOH}$ )
- lékařský benzín lékopisné kvality ČL 2009 (Penta a.s., ing. Švec, CZ) (LB)
- diethylamin p.a. (LachNer) ( $\text{Et}_2\text{NH}$ )
- cyklohexan p. a. (Penta a.s., ing. Švec, CZ) ( $\text{C}_6\text{H}_{12}$ )
- toluen p. a. (Penta a.s., ing. Švec, CZ) ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_3$ )
- destilovaná voda ( $\text{H}_2\text{O}$ )

#### 4.1.2 Pomocné látky

- uhličitan sodný 10% roztok (w/w)
- křemelina Celite C 535 John's Manville (Sigma-Aldrich, CZ)

#### 4.1.3 Využívané soustavy pro tenkovrstvou chromatografii (TLC)

- $\text{C}_6\text{H}_{12} + \text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_3 + \text{Et}_2\text{NH}$  (65:30:5, 55:40:5, 45:45:10)
- $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_3 + \text{Et}_2\text{NH}$  (97:3, 9:1, 95:5)
- $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_3 + \text{CHCl}_3 + \text{Et}_2\text{NH}$  (45:45:10)
- $\text{C}_6\text{H}_{12} + \text{Et}_2\text{NH}$  (9:1)

#### 4.1.4 Chromatografické adsorbenty

- Kieselgel  $\text{SiO}_2$  60 F254, fa Merck, 20 × 20 cm, hliníková deska s vrstvou silikagelu pro TLC s hloubkou vrstvy 0,2 mm
- Oxid hlinitý ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) deaktivovaný 6%  $\text{H}_2\text{O}$ , stupeň deaktivace Brockmann III, fa ACROSS, velikost zrn 40-200  $\mu\text{m}$

#### 4.1.5 Přístrojové vybavení

- Plynový chromatograf s hmotnostním detektorem Agilent Technologies 7890 A GC 5975 inert MSD (Agilent Technologies Santa Clara, CA, USA)
- NMR Varian Iniova 500 (Varian, USA)
- Vakuová odparka Büchi Rotavapor R-114 (Büchi, Flawil, Switzerland)
- Vakuová odparka pro poloprovodní použití Laborota 20 Heidolph (Heidolph, Germany)
- Polarimetr ADP 220 BS (Bellingham + Stanley Ltd., Kent, UK)
- Büchi Melting Point B-540 (Büchi, Flawil, Switzerland)
- Reader Synergy<sup>TM</sup> HT Multi-Detection Microplate Reader (BioTek, USA)

#### 4.1.6 Rostlinný materiál

Sušená nať *Fumaria officinalis* L. (Fumariaceae) byla dodána firmou Megafyt s. r. o., (Vrané nad Vltavou). Vertifikace byla provedena Prof.RNDr. L. Opletalem, CSc. a dokladové vzorky rostliny jsou uloženy v herbáři na FaF UK HK.

## **4.2 Obecné postupy**

### **4.2.1 Příprava a čištění rozpouštědel**

Před použitím byla všechna používaná rozpouštědla čištěna destilací. Nejprve byl zachycen předek (přibližně 5 %, většinou s vodným azeotropem), následně bylo vydestilováno zbylých cca 90 % rozpouštědla. Rozpouštědla se uchovávají chráněna před světlem v hnědých nádobách.

### **4.2.2 Odpařování extraktů a frakcí**

Alkaloidní extrakty a jednotlivé frakce získané z chromatografických sloupců nebo preparativní TLC byly odpařeny na vakuové odparce Büchi Rotavapor R-114 při 40°C na vodní lázni za sníženého tlaku.

### **4.2.3 Sušení a skladování frakcí a izolovaných čistých látek**

Získané frakce z chromatografických sloupců a chemicky čisté látky byly vysoušeny v exsikátoru nad silikagelem minimálně 24 hodin. Následně byly uskladněny v chladničce při teplotě 2–8 °C.

### **4.2.4 Detekce alkaloidů**

#### **4.2.4.1 TLC detekce**

TLC detekce se používá pro zjištění přítomnosti alkaloidů v jednotlivých frakcích nebo ke zjištění čistoty izolovaných alkaloidů. Detekce je prováděna v oblasti UV světla při vlnové délce  $\delta = 254$  a 366 nm. Po pozorování chromatogramu pod UV lampou následuje postřík detekčním činidlem (Dragendorffovo činidlo dle Muniera). Přítomnost alkaloidů se projeví oranžovým zbarvením.

### **4.2.5 Příprava sloupcové chromatografie**

Naléváním suspenze silikagelu v mobilní fázi byl připraven chromatografický sloupec. Na kolonu byla nanášena chromatografovaná směs látek ve formě roztěru.

Roztěr byl připraven rozpuštěním surového extraktu v chloformu a přidáním 350g adsorbentu hliníku v poměru 1:4. Na vodní lázni bylo ze vzniklé suspenze odpařeno rozpouštědlo. Před aplikací na kolonu byl roztěr dosušen za sníženého tlaku v exsikátoru po dobu 24 hodin.

#### **4.2.6 Příprava litých desek pro preparativní TLC**

Na skleněné desky pro preparativní TLC se nalila suspenze tvořená komerčním silikagelem a destilovanou vodou. Desky se nechaly schnout nejméně po dobu 24 hodin před použitím.

## **4.3 Strukturní analýza**

### **4.3.1 GC-MS analýza**

GC-MS spektra byla měřena na spektrometru Agilent 7890A GC 5975 inert MSD pracujícím v EI modu při 70 eV. Separace byla provedena na koloně DP-5 MS (30 m × 0.25 mm × 0.25 μm), Agilent Technologies Santa Clara, CA, USA). Teplotní program byl nastaven na následující teplotní gradient: od 100-180 °C teplota stoupala 15 °C/min, 1 min byla teplota udržována na 180 °C a pak dále teplota stoupala od 180-300 °C rychlostí 5°C/min a 40 min byla teplota udržována na 300 °C. Teplota injektoru byla 280 °C, průtok nosného plynu (héliu) byl nastaven na 0,8 ml/min. Detekční rozmezí bylo m/z 35-600, teplota detektoru byla 200 °C. 1 μl alkaloidního roztoku (1 mg/ml) byl nastříknut ve „split mode“ v poměru 1:10. Jednotlivé alkaloidy byly identifikovány na základě porovnání jejich MS a porovnáním se spektry v NIST knihovně, v literatuře a se spektry referenčních látek již dříve izolovaných na katedře farmaceutické botaniky a ekologie FaF UK.

### **4.3.2 NMR analýza**

Všechna NMR spektra byla měřena na spektrometru Varian Iniova 500. Pracovní frekvence byla pro jádra <sup>1</sup>H 499,9 MHz a pro <sup>13</sup>C jádra 125,7 MHz. Spektra <sup>13</sup>C NMR byla měřena v 5 mm SW širokopásmové sondě. <sup>1</sup>H NMR spektra byla měřena v inverzní 5 mm ID PFG sondě s využitím standardních pulzních frekvencí. Všechna měření byla prováděna v deuteriochloroformu při teplotě 25 °C. Hodnoty chemických posunů jsou uváděny v jednotkách ppm. Hodnoty <sup>1</sup>H NMR spekter jsou vztaženy k inertnímu standardu (hexamethyldisilan, 0,04 ppm). Naproti tomu hodnoty <sup>13</sup>C NMR spekter jsou vztaženy k signálu solventu (76,99 ppm).

### **4.3.3 Optická otáčivost**

Optická otáčivost byla měřena na polarimetru ADP 220 BS v chloroformu při 25°C.

### **4.3.4 Teplota tání**

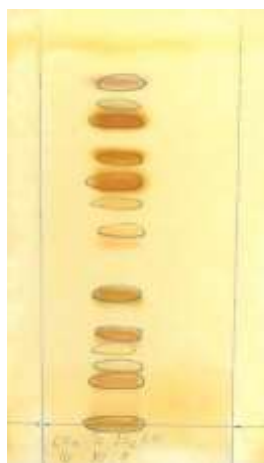
Teploty tání byly měřeny na bodotávku Büchi Melting Point B-540. Výchřevnost byla nastavena tak, aby do 10 °C před předpokládanou teplotou tání u dané látky stoupala teplota ve výchřevném bloku rychle (15 °C/min.) a pak stoupala postupně (0,5 °C/min.) do maximální teploty, která byla o 10 °C vyšší než předpokládaná teplota bodu tání látky.

## 4.4 Izolace alkaloidů

### 4.4.1 Příprava sumárního alkaloidního extraktu

Sumární alkaloidní extrakt ze suché natě zemědělu byl připraven z 25,15 kg suché rozdrobené drogy. Droga byla perkolována 95% EtOH v poměru 1:8,15. Extrakt byl zahuštěn přibližně na 7 litrů objemu. Po zahřátí při 70 °C byly k extraktu přidány 3 litry vody a 2 litry 2% HCl (pH ~ 1,5). Po zředění 5 litry vody a zchladnutí na 30 °C byl extrakt zfiltrován přes vlizelín. Zbytek na filtru byl promyt 3 litry 0,1% HCl a poté 2 litry vody. Získaný objem filtrátu byl doplněn do 20 litrů. Filtrát byl zalkalizován 10% uhličitanem sodným na pH ~ 9,5 (cca 3 litry). Získaná suspenze byla vytřepána po částech 5 × 5 litry diethyletheru. Etherové výtřepky byly zbaveny vody a organická vrstva byla odpařena. Celkem bylo získáno 99 g tmavě hnědého, viskózního odparku. Pro snazší čištění byl etherový výtřepok rozdělen na dvě části rozpuštěním v CHCl<sub>3</sub> (47,6 g a 48,2 g). Každá část byla rozpuštěna ve 400 ml 2% HCl na pH ~1–2 a doplněna destilovanou vodou do 1 l. Pro přefiltrování byla použita křemelina. Získané filtráty byly alkalizovány 10% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> na pH 9-10 a následně 6krát vytřepány 200 ml CHCl<sub>3</sub>. Po vytřepání byla provedena zkouška Mayerovým činidlem, která neprokázala další přítomnost alkaloidů ve vodé fázi. Po přečištění byly obě přečištěné části opět spojeny se získkem 87,5 g přečištěného sumárního extraktu.

Dle TLC sumárního étherového výtřepku byla zjištěna přítomnost minimálně 10 alkaloidů (R<sub>f</sub> látek: 0,76; 0,67; 0,61; 0,55; 0,48; 0,45; 0,33; 0,24; 0,12; 0). Dále byly detekovány další dvě látky s R<sub>f</sub>: 0,85 a 0,80, které však po detekci Dragendorffovým činidlem nedávaly charakteristické oranžové zbarvení.



Obr. 3. Sumární alkaloidní diethyletherový výtřepok *Fumaria officinalis* L.



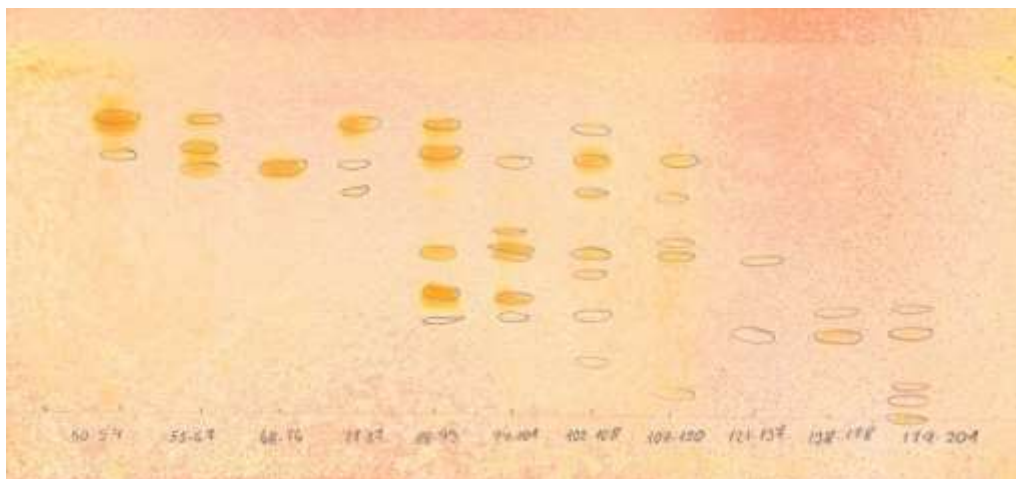
## 4.4.2 Izolace isochinolinových alkaloidů pro biologické testy

### 4.4.2.1 Separace alkaloidního výtřepku na chromatografickém sloupci

Přečištěný diethyletherový výtřepok byl separován preparativní sloupcovou chromatografií. Nejprve byl připraven roztěr rozpuštěním sumárního extraktu (87,5 g) v  $\text{CHCl}_3$  a smícháním s 350 g  $\text{Al}_2\text{O}_3$  (poměr 4:1) deaktivovaného 6%  $\text{H}_2\text{O}$  (fa ACROSS, velikost zrn 40-200  $\mu\text{m}$ ), který byl odpařen na vodní lázni do sucha a dosušen v exsikátoru. Jako stacionární fáze byl použit oxid hlinitý neutrální ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ , fa ACROSS, velikost zrn 40-200  $\mu\text{m}$ ) deaktivovaný 6%  $\text{H}_2\text{O}$ , stupeň deaktivace Brockmann III, množství adsorbentu 2 625 g (poměr 30:1 k množství roztěru) se stupňovitým způsobem eluce. Eluce byla provedena směsí rozpouštědel LB +  $\text{CHCl}_3$  (9:1, 17:3, 4:1, 7:3 3:2, 1:1, 2:3, 1:4), pokračovala  $\text{CHCl}_3$  a následně směsí  $\text{CHCl}_3$  + EtOH (3:1, 1:1). Eluáty byly jímány po 500 ml. Celkem bylo získáno 201 frakcí, které byly kontrolní TLC spojeny do 11 souhrných frakcí ( $A_1 - A_{11}$ , obr. 4). Použité mobilní fáze:  $\text{C}_6\text{H}_{12}$  +  $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_3$  +  $\text{Et}_2\text{NH}$  (65:30:5, 55:40:5),  $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_3$  +  $\text{Et}_2\text{NH}$  (97:3, 9:1) a  $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_3$  +  $\text{CHCl}_3$  +  $\text{Et}_2\text{NH}$  (45:45:10).

Tab. 4 Spojené sumární alkaloidní frakce

Frakce $A_{1-11}$	Rozmezí frakcí	Mobilní fáze	Hmotnost odparku (g)
$A_1$	50 – 54		0,30
$A_2$	55 – 67	LB + $\text{CHCl}_3$ (3:2)	13,89
$A_3$	68 – 76		6,30
$A_4$	77 – 87	LB + $\text{CHCl}_3$ (3:2, 1:1)	9,60
$A_5$	88 – 93		13,59
$A_6$	94 – 101	LB + $\text{CHCl}_3$ (1:1)	7,70
$A_7$	102 – 108		1,00
$A_8$	109 – 120		1,46
$A_9$	121 – 137	LB + $\text{CHCl}_3$ (1:1, 2:3)	2,00
$A_{10}$	138 – 178	LB + $\text{CHCl}_3$ (2:3, 1:4), $\text{CHCl}_3$	8,75
$A_{11}$	179 – 201	$\text{CHCl}_3$ , $\text{CHCl}_3$ + EtOH (3:1, 1:1)	10,90



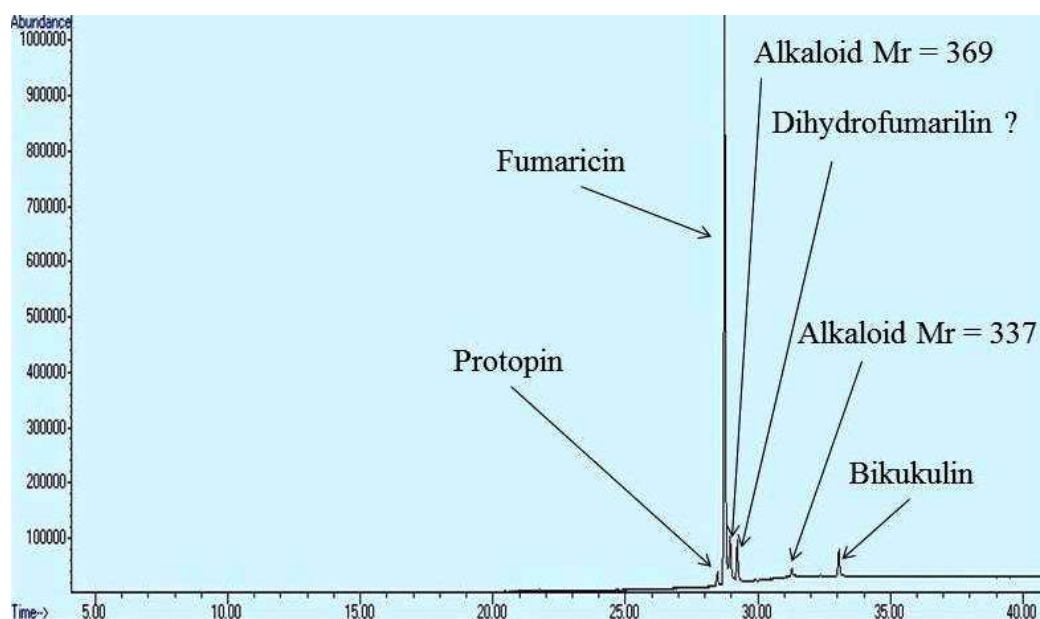
Obr. 4 Souhrnná deska frakcí  $A_1$ - $A_{11}$  (Adsorbent  $\text{SiO}_2$ , MF:  $\text{To} + \text{Et}_2\text{NH}$  9:1, dráha 7,5cm,  $1\times$ , UV+Dragendorffovo činidlo)

#### 4.4.2.2 Separace alkaloidů z frakce č. 88 - 93

Dle TLC byla ve frakci prokázána přítomnost 6 alkaloidů po detekci s Dragendorffovým činidlem. Počet alkaloidů prokázaných TLC (Adsorbent  $\text{SiO}_2$  60 F254 (fa Merck), komora nasycená,  $\text{C}_6\text{H}_{12} + \text{To} + \text{Et}_2\text{NH}$  (55 + 40 + 5), počet vyvíjení  $2\times$ , dráha vyvíjení 9 cm, detekce Dragendorff. č. + UV 254nm) odpovídá počtu alkaloidů prokázaných analýzou GC-MS. Ve frakci se pravděpodobně nachází tyto alkaloidy: fumaricin, bikukulin, protopin a tři alkaloidy neznámé struktury.



Obr. 5 Chromatogram frakce 88-93



Obr. 6 Chromatogram frakce 88-93 GC-MS

Krystalizací frakce z EtOH + CHCl<sub>3</sub> bylo získáno 1,86 g bílých krystalů a 7,8 g matečného louhu. Pomocí TLC detekce bylo prokázáno, že 1,86 g krystalů obsahuje 3 alkaloidy. Směs byla separována pomocí preparativní TLC na 38 litých vrstvách 15 cm × 15 cm na silikagelu (adsorbent SiO<sub>2</sub> 60 GF 254, fa Merck). Pro vyvíjení byla použita mobilní fáze C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>CH<sub>3</sub> + EtNH<sub>2</sub> (9:1), počet vyvíjení 1×, dráha 12,5 cm, detekce UV 254 nm. Směs byla rozdělena do tří zón (1, 2, 3) s R<sub>f</sub> 0,7; 0,65; a 0,2. Jednotlivé zóny byly z desek vyškrábány a eluovány směsí EtOH + CHCl<sub>3</sub> (1:1). Separace byla kontrolována analytickou TLC. Jednotlivé zóny po eluci a odpaření vážily: 1. zóna 0,66 g, 2. zóna 0,52 g a 3. zóna 0,68 g.

#### 4.4.2.2.1 Izolace alkaloidů z 1. zóny (0,66 g)

Zóna obsahovala podle TLC a analýzy 2 alkaloidy (DK-1, DK-2). Alkaloidy byly separovány na 14 preparativních TLC litých deskách 15 × 15 (adsorbent SiO<sub>2</sub> 60 GF 254, dráha vyvíjení 12,5 cm, mobilní fáze: C<sub>6</sub>H<sub>12</sub> + EtNH<sub>2</sub> (9:1), počet vyvíjení 2×). Alkaloidy se rozdělily do dvou zón (R<sub>f</sub> 0,74 a 0,61). Zóny byly vyškrábány a eluovány z adsorbentu směsí CHCl<sub>3</sub> + EtOH a následně byly podrobeny krystalizaci.

Tab. 5 Alkaloidy 1. zóny

Zóna	Hmotnost (mg)	Alkaloid
Zóna č. 1	235	DK-1
Zóna č. 2	160	DK-2

#### 4.4.2.2 Izolace alkaloidů z 2. zóny (0,52 g)

Opakovanou krystalizací ze směsi EtOH + CHCl<sub>3</sub> byl opět získán DK-2 (117,4 mg).

#### 4.4.2.3 Izolace alkaloidů z 3. zóny (0,68 g)

V zóně byl prokázán pomocí TLC jeden alkaloid, který byl přečištěn krystalizací ze směsi CHCl<sub>3</sub> + EtOH. Celkem bylo získáno 430 mg drobných narůžovělých krystalů. Alkaloid byl detekován pomocí NMR a GC-MS analýz jako DK-3.

#### **4.4.2.3 Izolace alkaloidů z matečného louhu po krystalizaci frakce 88 – 93 (7,8 g)**

Matečný louh byl nejprve přečištěn přes vrstvu neutrálního Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (fa ACROSS, velikost zrn 40-250 μm, deaktivovaného 6 % H<sub>2</sub>O) ve směsi CHCl<sub>3</sub> + LB (1:1). Přečištěním bylo získáno 6,3 g matečného louhu, který byl chromatografován ve formě roztěru (1:4) na chromatografickém sloupci (adsorbent 600 g neutrálního Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> fa ACROSS, velikost zrn 40-250 μm, deaktivovaného 6 % H<sub>2</sub>O, velikost kolony: Ø 3,8 × 70 cm, výška sloupce: 50 cm) stupňovitou elucí CHCl<sub>3</sub> + LB (3:7; 2:3; 1:1; 3:4 a 100% CHCl<sub>3</sub>), jednotlivé frakce byly jímány po 100 ml. Celkem bylo získáno 6 spojených frakcí. Separace byla sledována pomocí TLC (adsorbent SiO<sub>2</sub>, Merck 60 F254, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>CH<sub>3</sub> + Et<sub>2</sub>NH (95:5)).

Tab. 6 Přehled spojených frakcí získaných z matečného louhu

Rozmezí frakcí	Mobilní fáze	Hmotnost odparku (g)
12 – 21	LB + CHCl <sub>3</sub> (3:7)	1,05
22 – 29	LB + CHCl <sub>3</sub> (3:7)	1,53
30 – 59	LB + CHCl <sub>3</sub> (2:3)	1,91
60 – 66	LB + CHCl <sub>3</sub> (2:3, 1:1)	0,42
67 – 74	LB + CHCl <sub>3</sub> (1:1)	0,79
75	LB + CHCl <sub>3</sub> (3:4), CHCl <sub>3</sub> 100%	0,36

#### 4.4.2.3.1 Frakce 12 – 21 (1,05 g)

Tato frakce nebyla dále zpracovávána. Podle GC-MS analýzy obsahuje především DK-2 a minoritně DK-3.

#### 4.4.2.3.2 Frakce 22 – 29 (1,53 g) a 30 – 59 (1,91 g)

Frakce obsahují jako hlavní alkaloid DK-3, který byl detekován GC-MS analýzou. Byl získán opakovanou krystalizací z CHCl<sub>3</sub> + EtOH v množství 1,36 g. Ve frakci 22 – 29 byl

GC-MS analýzou detekován alkaloid s Mr 353, který nebylo možno izolovat z důvodu jeho minoritního zastoupení. Podle GC-MS se pravděpodobně jedná o dihydrofumarilin.

#### 4.4.2.3.3 Frakce 60 – 66 (0,42 g) a 67 – 74 (0,79 g)

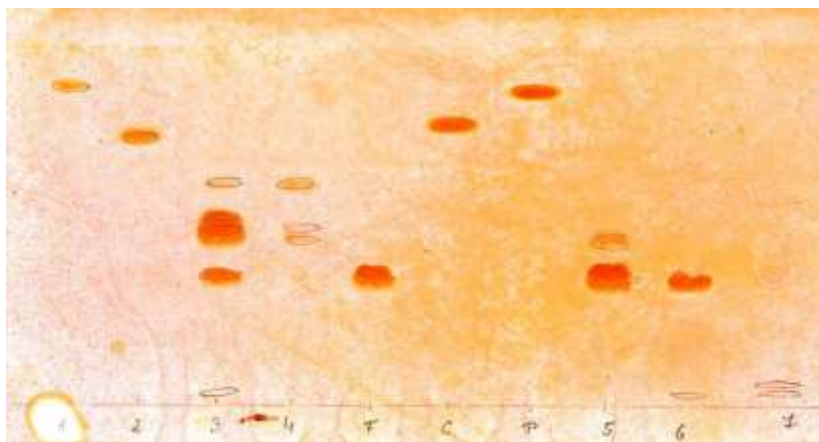
Frakce byly na základě výsledků GC-MS analýz spojeny a zpracovány společně jako frakce 60 – 74 (1,21 g) na 24 litých preparativních TLC deskách 15 × 15 cm (adsorbent SiO<sub>2</sub> 60 GF 254, fa Merck), počet vyvíjení 2×, dráha vyvíjení 8,5 cm, MF: C<sub>6</sub>H<sub>12</sub> + C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>CH<sub>3</sub> + Et<sub>2</sub>NH (45:45:10). Frakce byla separována do 7 zón (obr. 7).

Tab. 7 Separace frakce 60-74

Zóna	Rf	Hmotnost (g)
1	0,78	0,016
2	0,67	0,093
3	0,44	0,231
4	0,40	0,039
5	0,33	0,296
6	0,30	0,105
7	0,06	0,013

Ze zóny 2 byl z CHCl<sub>3</sub> vykrytalizován alkaloid DK-4 v množství 0,377 g, který byl identifikován na základě NMR a GC-MS analýz. Zóny 3 a 4 byly sjednoceny a kromě DK-3 obsahovaly další dva alkaloidy o Mr<sub>1</sub>=337 a Mr<sub>2</sub>=369. Tyto látky se od sebe nepodařilo rozdělit preparativní TLC ani semipreparativní HPLC kvůli podobným fyzikálně-chemickým vlastnostem a minoritnímu zastoupení.

Ostatní frakce nebyly dále zpracovávány z důvodu malých hmotností jednotlivých frakcí nebo obsahovaly už izolované alkaloidy.



Obr. 7. Souhrnné TLC alkaloidů frakce 60-74

## **4.5 Stanovení inhibiční aktivity alkaloidů a alkaloidních extraktů vůči erythrocytární AChE a sérové BuChE**

### **4.5.1 Chemikálie a materiál**

#### *Chemikálie:*

10mM acetylthiocholin jodid, (Sigma-Adrich)  
10mM butyrylthiocholin jodid, (Sigma-Adrich)  
0,1 M fosfátový pufr, pH 7,4 (chemikálie pro přípravu pufru: dihydrát dihydrogenfosforečnanu sodného, p.a. (Lachema); dodekahdrát hydrogenfosforečnanu disodného, p.a. (Lachema)  
5mM 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina,  $\geq 98\%$  (Sigma-Aldrich)  
huperzin A, (TAZHONGHUI – Tai'an zhonghui Plant Biochemical Co., Ltd., China)  
galanthamin hydrobromid, (Changsha Organic Haerb Inc., China)  
dimethylsulfoxid, (Sigma-Adrich)

#### *Materiál:*

Jako zdroj acetylcholinesterasy byla použita pouzdra lidských erythrocytů.  
Zdrojem butyrylcholinesterasy byla lidská plazma.  
Měření bylo prováděno v mikrotitračních destičkách.

### **4.5.2 Přístroj použitý pro stanovení cholinesterasové inhibiční aktivity**

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

### **4.5.3 Podmínky měření**

Experimenty byly prováděny za těchto podmínek:

- při teplotě 37°C
- v prostředí fosfátového pufru (pH 7,4)
- při vlnové délce spektrofotometru 436 nm
- v mikrotitračních destičkách

#### 4.5.4 Příprava erytrocytárních pouzder

Erytrocytární pouzdra byla připravena z čerstvě odebrané krve, ke které byl přidán 1 ml citrátu sodného na 10 ml krve podle lehce upravené metody Stecka a Kanta.<sup>122</sup> Plazma (HuBuChE) byla oddělena z krve pomocí centrifugace při rychlosti 4000 ot./min za použití centrifugy Boeco U-32R s rotorem Hettich 1611. Erytrocyty byly přemístěny do 50ml zkumavek a třikrát promyty 5mM fosfátovým pufrem (pH 7,4), obsahujícím 150mM chloridu sodného (12 000 ot./min, Avanti J-301, rotor JA-30.50). Promyté erytrocyty byly míchány s 5mM fosfátovým pufrem (pH 7,4) po dobu 10 minut, čímž došlo k jejich lýze. Následně byly centrifugovány rychlostí 20 000 ot./min a vzniklá pouzdra (HuACHE) byla třikrát promyta fosfátovým pufrem.

#### 4.5.5 Stanovení cholinesterasové inhibiční aktivity (hodnoty IC<sub>50</sub>)

Pro stanovení hodnoty IC<sub>50</sub> byla použita Ellmanova spektrofotometrická metoda s použitím 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoové kyseliny (DTNB).<sup>123</sup> Jako substráty se používají estery thiocholinu, které jsou cholinesterasami štěpeny na thiocholin a příslušnou kyselinu. Stanovuje se SH- skupina thiocholinu, která se naváže na DTNB za vzniku žlutě zbarveného produktu, který se stanovuje spektrofotometricky při vlnové délce 436 nm. Sleduje se nárůst absorbance za 1 minutu. Hodnoty IC<sub>50</sub> byly vypočítány z naměřených hodnot poklesu aktivity acetylcholinesterasy nebo butyrylcholinesterasy nelineární regresí v programu GraphPad Prism (verze 3.02 pro Windows; výrobce Graph Pad Software, San Diego, CA, USA). Výsledky byly porovnány s hodnotami IC<sub>50</sub> známých inhibitorů cholinesteras: galathaminem (IC<sub>50</sub> HuAChE = 1,710 ± 0,065 μM, HuBuChE = 42,30 μM ± 1,30 μM), huperzinem A (IC<sub>50</sub> HuAChE = 0,033 ± 0,001 μM, HuBuChE > 1000 μM). % I (inhibice) byla počítána dle vzorce,

$$\%I = 100 - (\Delta A_{BL} / \Delta A_{SA}) \times 100,$$

kde  $\Delta A_{BL}$  je nárůst absorbance slepého vzorku za 1 minutu a  $\Delta A_{SA}$  je nárůst absorbance měřeného vzorku.

#### 4.5.6 Cholinesterasová aktivita sumárního alkaloidního extraktu

Ze sumárního alkaloidního extraktu bylo odebráno potřebné množství, které bylo naředěno DMSO na roztoky o požadované koncentraci pro zjištění hodnoty IC<sub>50</sub> sumárního alkaloidního extraktu modifikovanou Ellmanovou metodou. Hodnoty IC<sub>50</sub> byly vypočítány

z naměřených hodnot poklesu aktivity AChE a BuChE nelineární regresí v programu GraphPad Prism. Získané hodnoty byly porovnány s hodnotami známých inhibitorů cholinesteras (galanthaminem, huperzinem A a fysostigminem).

Tab. 8. Inhibiční aktivita alkaloidního extraktu *Fumaria officinalis* L vůči AChE a BuChE.

Testovaný vzorek	IC <sub>50</sub> (μg/ml)	
	AChE	BuChE
alkaloid. extrakt	39,23 ± 1,96	40,32 ± 1,08
galanthamin <sup>1</sup>	1,71 ± 0,07	42,3 ± 1,3
huperzin A <sup>1</sup>	0,03 ± 0,001	> 1000
fysostigmin <sup>1</sup>	0,063 ± 0,001	0,130 ± 0,004

<sup>1</sup>referenční látka

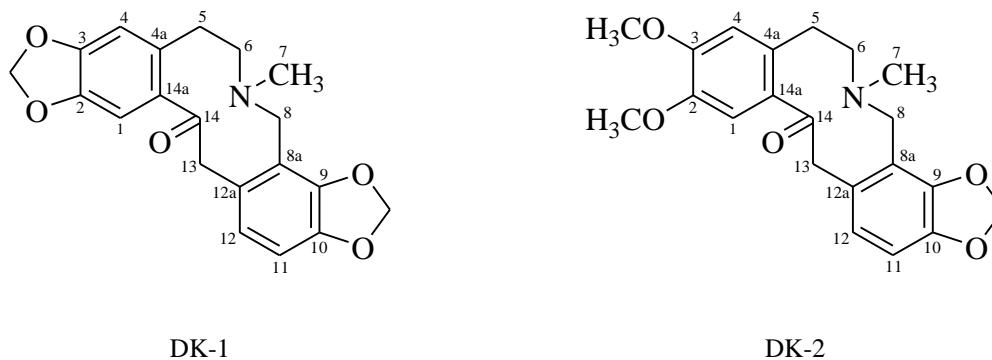
Sumární alkaloidní extrakt z natě *Fumaria officinalis* L. vykazoval cholinesterasovou inhibiční aktivitu vůči lidským cholinesterasám. Alkaloidní extrakt vykazoval přibližně stejnou inhibici AChE i BuChE.



## 5 VÝSLEDKY

### 5.1 Strukturní analýza

#### 5.1.1 Protopin (DK-1) a kryptopin (DK-2)



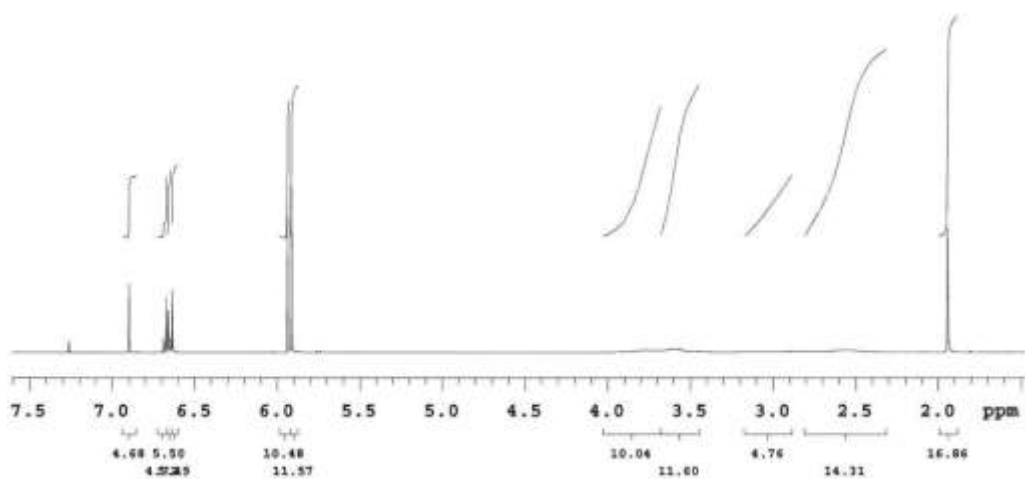
Obr. 8 Struktura protopinu (DK-1) a kryptopinu (DK-2)

##### 5.1.1.1 NMR analýza

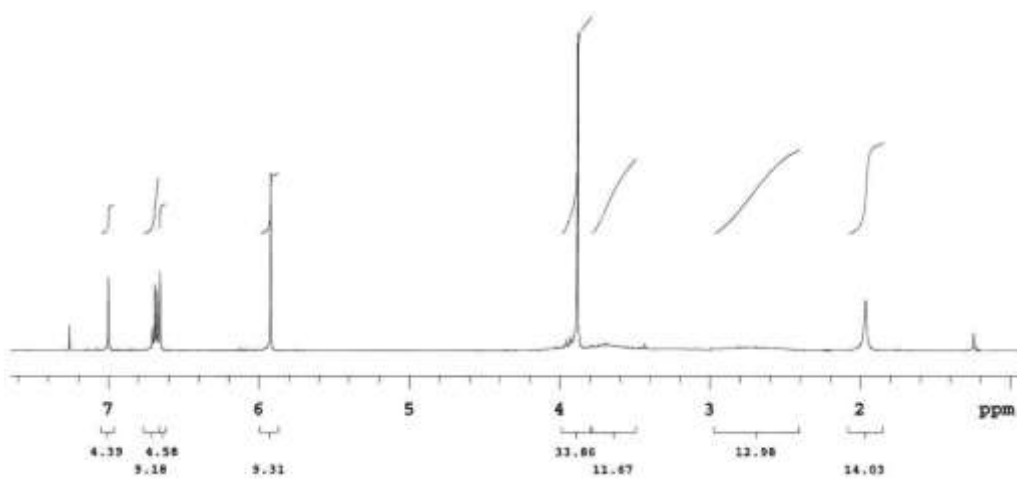
Tab. 9 <sup>1</sup>H NMR posuny a multiplicita signálů v CDCl<sub>3</sub> (25 °C) při 500 MHz protopinu a kryptopinu

H	Protopin	Kryptopin
1	6.90 s	7.01s
4	6.62 s	6.66 s
5	2.7 br s	2.7 br 4
6	2.7 br s	2.7 br s
7	2.04 s	2.03 s
8	3.7 br s	3.7 br s
11	6.67 m	6.66 m
12	6.68 m	6.71 m
13	3.74 br s	3.85 br s
-O-CH <sub>2</sub> -O- (2', 3')	5.93 s	-
-OCH <sub>3</sub> (2')	-	3.88 s
-OCH <sub>3</sub> (3')	-	3.88 s
-O-CH <sub>2</sub> -O- (9', 10')	5.92 s	5.93 s

Zkratky: s (singlet), m (multiplet), br (široký)



Obr. 9  $^1\text{H}$  NMR spektrum protopinu



Obr. 10  $^1\text{H}$  NMR spektrum kryptopinu

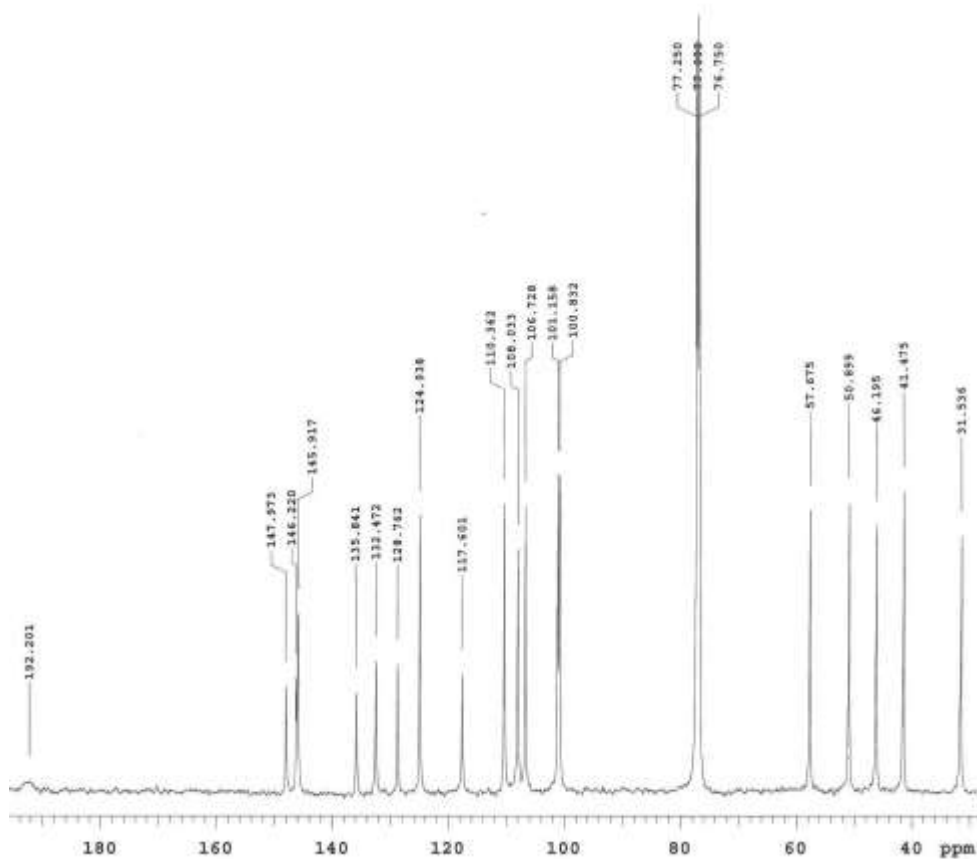
Tab. 10  $^{13}\text{C}$  NMR posuny a multiplicita signálů v  $\text{CDCl}_3$  (25 °C) při 125 MHz protopinu a kryptopinu

C	Protopin	Kryptopin
1	107.9 d	112.1 d
2	146.1 s	147.3 s
3	148.1 s	149.5 s
4	110.2d	113.4 d
4a	131.7 s	130.6 s
5	30.9 t	31.7 t
6	57.4 t	57.4 t
7	41.6 q	41.6 q
8	51.3 t	50.8 t
8a	116.9 s	116.9 s

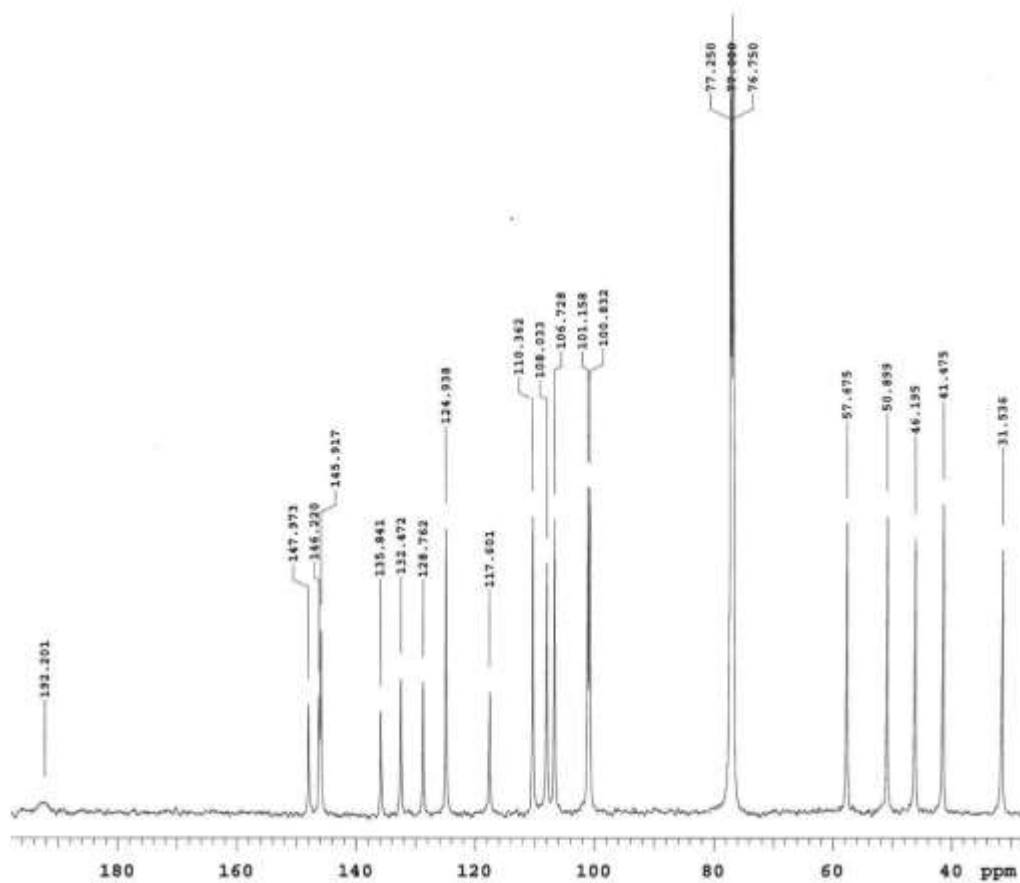
Tab. 10  $^{13}\text{C}$  NMR posuny a multiplicita signálů v  $\text{CDCl}_3$  (25 °C) při 125 MHz protopinu a kryptopinu (pokračování)

C	Protopin	Kryptopin
9	146.0 s	146.1 s
10	146.1 s	146.2 s
11	106.9 d	106.9 d
12	124.7 d	124.8 d
12a	128.3 s	129.0 s
13	45.6 t	45.7 t
14	184.1 s	187.5 s
14a	135.2 s	134.1 s
-O-CH <sub>2</sub> -O- (2', 3')	101.3 t	-
-OCH <sub>3</sub> (2')	-	56.0 q
-OCH <sub>3</sub> (3')	-	56.0 q
-O-CH <sub>2</sub> -O- (9', 10')	101.2 t	100.9 t

Zkratky: s (singlet), d (dublet), t (triplet), q (quartet)



Obr. 11  $^{13}\text{C}$  NMR spektrum protopinu



Obr. 12  $^{13}\text{C}$  NMR spektrum kryptopinu

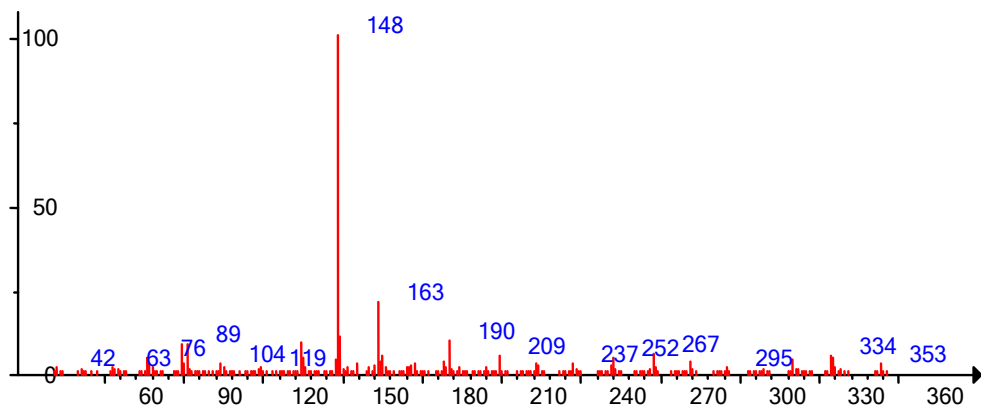
### 5.1.1.2 MS analýza

Protopin

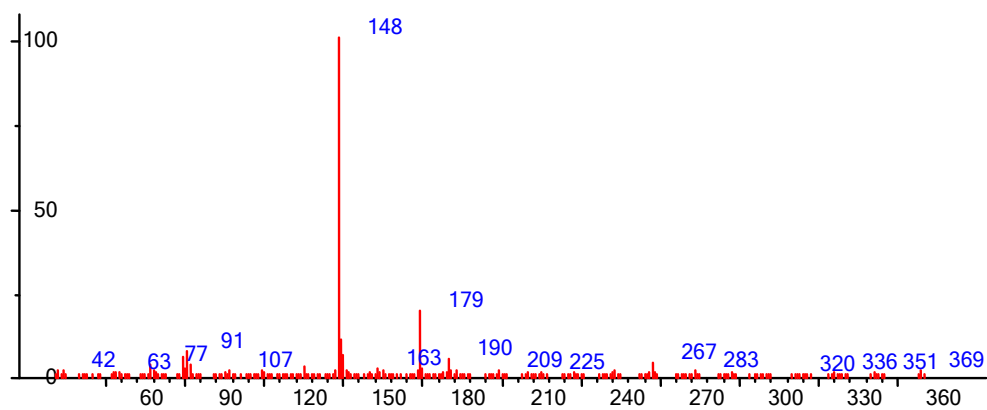
EI-MS ( $m/z$ ) 353(4), 334(5), 320(4), 267(6), 209(5), 190(10), 163(22), 148(100), 134(9).

Kryptopin

EI-MS ( $m/z$ ) 369(2), 267(3), 190(6), 179(21), 148(100), 135(2).



Obr. 13 EI-MS spektrum protopiu



Obr. 14 EI-MS spektrum kryptopinu

### 5.1.1.3 Teplota tání

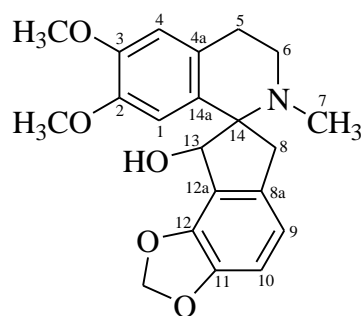
Protopin: 205–206 °C

Kryptopin: 219–220 °C

### 5.1.1.4 Optická otáčivost

Protopin a kryptopin: neměřeno (sloučeniny neobsahují ve své molekule centrum chiralit). Jedná se o opticky neaktivní sloučeniny.

### 5.1.2 (-)-Fumaricin (DK-3)

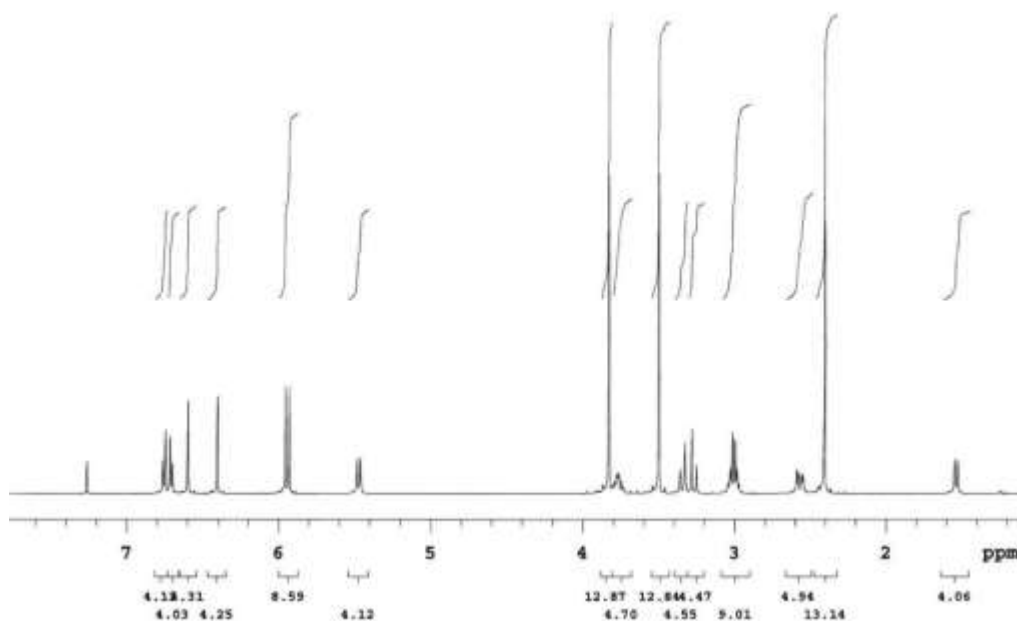


Obr. 15 (-)-fumaricin

#### 5.1.2.1 NMR analýza

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 25°C):

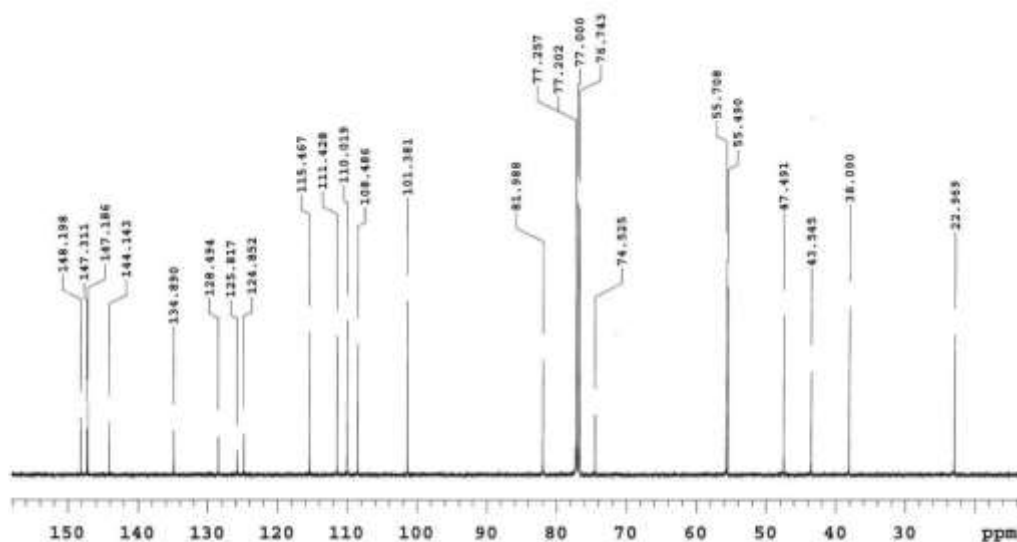
2.41, s, 3H (NMe); 2.57, m, 1H, (H-5a); 2.97-3.06, m, 2H, (H-65a, H-5b); 3.28, dd, 1H, (H-13a); 3.34, dd, 1H, (H-13b); 3.51, s, 3H, (2-OCH<sub>3</sub>); 3.78, m, (H-6b); 3.84, s, 3H, (3-OCH<sub>3</sub>); 4.56, brs, 1H, (H-8); 5.94, d, 1H, (-O-CH<sub>2</sub>-O-); 5.97, d, 1H, (-O-CH<sub>2</sub>-O-); 6.41, s, 1H, (H-1); 6.61, s, 1H, (H-4); 6.72, ddd, 1H, (H-12); 6.76, dd, 1H, (H-11).



Obr. 16  $^1\text{H}$  NMR spektrum (-)-fumaricinu

$^{13}\text{C}$  NMR (125 Hz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $25^\circ\text{C}$ ):

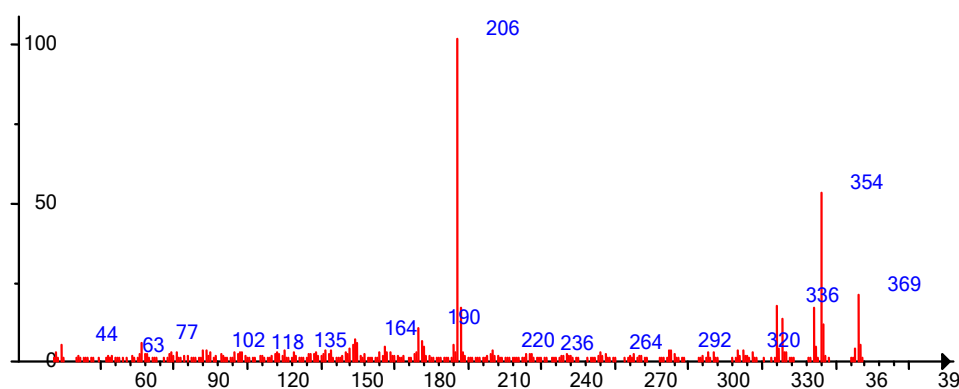
23.03, t, (C-5); 38.15, q, (NMe); 43.64, t, (C-13); 47.53, t, (C-6); 55.52, q, (2-OCH<sub>3</sub>); 55.73, q, (3-OCH<sub>3</sub>); 74.51, s, (C-7); 82.10, d, (C-8); 101.40, t, (-O-CH<sub>2</sub>-O-); 108.51, d, (C-11); 110.03, d, (C-1); 111.46, d, (C-4); 115.48, d, (C-12); 124.92, s, (C-8a); 125.93, s, (C-7a); 128.62, s, (C-4a); 134.98, s, (C-12a); 144.16, s, (C-9); 147.18, s, (C-2); 147.31, s, (C-10); 148.19, s, (C-3).



Obr. 17  $^{13}\text{C}$  NMR spektrum (-)-fumaricinu

### 5.1.2.2 MS analýza

EI-MS ( $m/z$ ) 369(21), 354(52), 336(17), 206(100), 190(10).



Obr. 18 EI-MS spektrum (-)-fumaricinu

### 5.1.2.3 Teplota tání

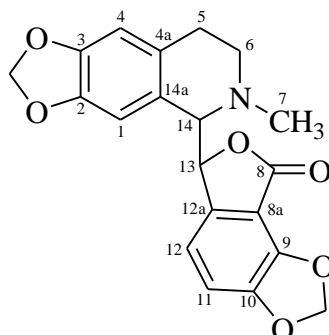
174-176 °C

#### **5.1.2.4 Optická otáčivost**

$[\alpha]_{\text{D}} = -21^{\circ}$  (c 0,146,  $\text{CHCl}_3$ )



### 5.1.3 (+)-Bikukulin (DK-4)

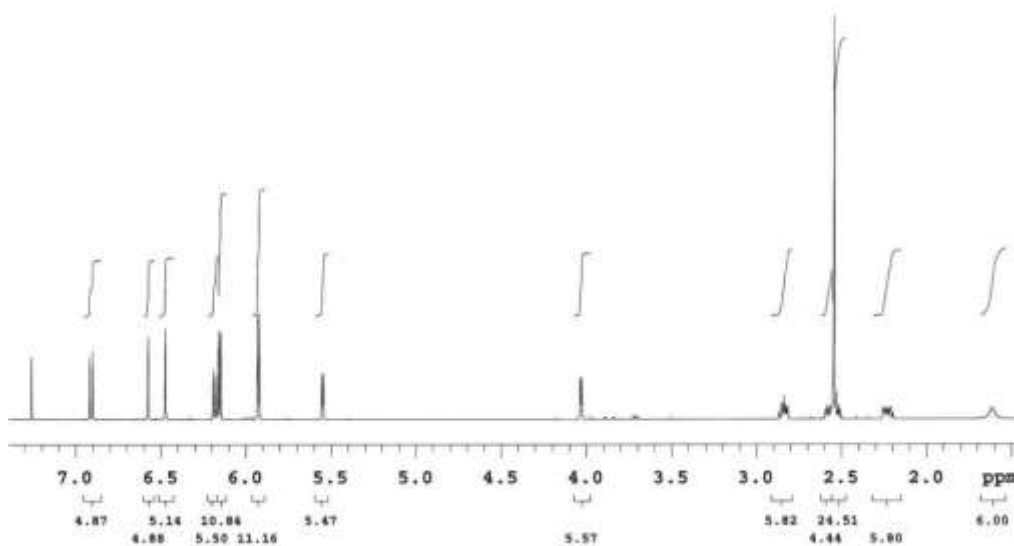


Obr. 19 (+)-bikukulin

#### 5.1.3.1 NMR analýza

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 25°C):

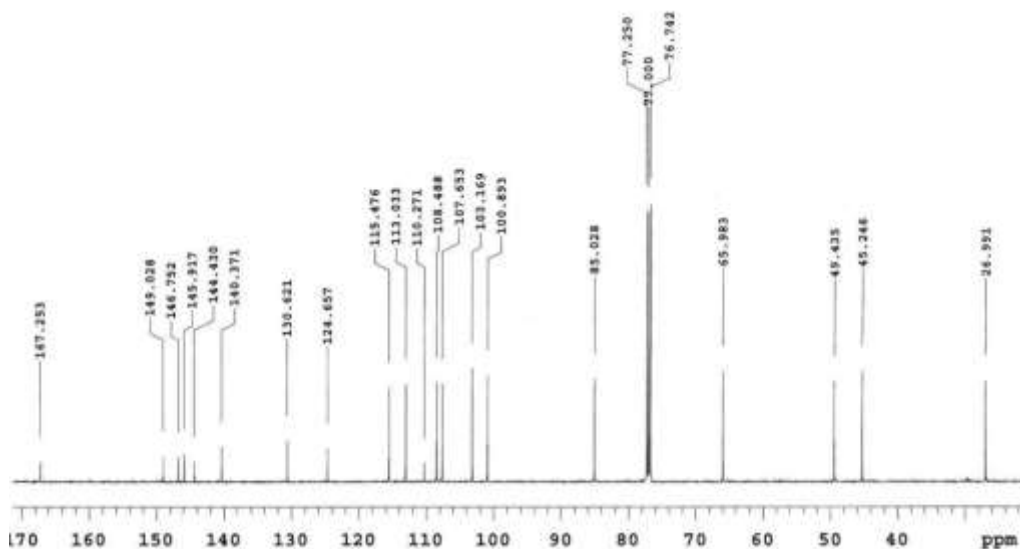
2.55, s, 3H, (N-CH); 2.41-2.86, m, 4H, (H-5, H-6); 4.03, d, 1H, (H-14); 5.54, d, 1H, (H-13); 5.94, 6.15, 2 s, 2x 2H, (2 x -O-CH<sub>2</sub>-O-, (2,3), (9,10)); 6.23, m, 1H, (H-12); 6.48, s, 1H, (H-1); 6.57, s, 1H, (H-1); 6.94, d, 1H, (H-11).



Obr. 20  $^1\text{H}$  NMR spektrum (+)-bikukulinu

$^{13}\text{C}$  NMR (125 Hz,  $\text{CDCl}_3$ , 25°C):

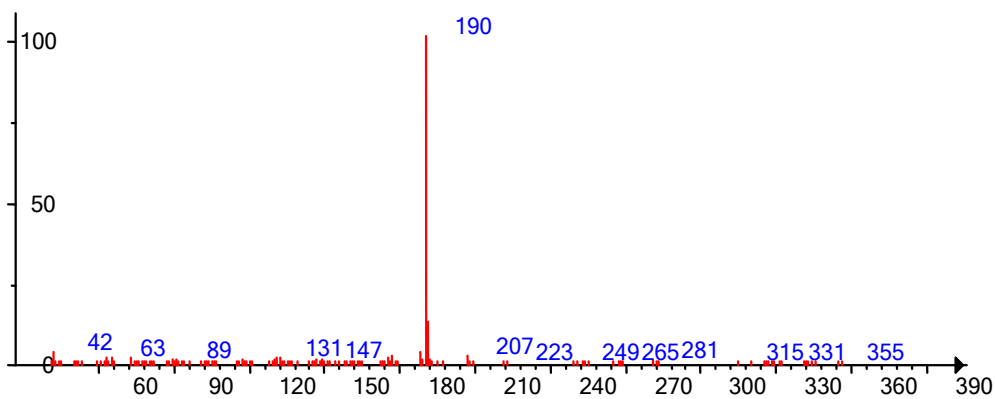
27.0, t, (C-5); 45.2, q, (C-7); 66.1, d, (C-14); 84.9, d, (C-13); 100.9, t, (-O-CH<sub>2</sub>-O-, (2, 3)); 100.9, t, (-O-CH<sub>2</sub>-O-, (9, 10)); 107.7, d, (C-1); 108.5, d, (C-4); 110.3, s, (C-8a); 113.0, d, (C-11); 115.6, d, (C-12); 124.7, s, (C-4a); 130.6, s, (C-12a); 140.5, s, (C-9); 144.5, s, (C-2); 146.0, s, (C-3); 146.8, s, (C-10).



Obr. 21  $^{13}\text{C}$  NMR spektrum (+)-bikukulinu

### 5.1.3.2 MS analýza

EI-MS ( $m/z$ ) 367(<1), 190(100).



Obr. 22 EI-MS spektrum (+)-bikukulinu

### 5.1.3.3 Teplota tání

214-216 °C

### 5.1.3.4 Optická otáčivost

$[\alpha]_{\text{D}} = +89$  (c 0,0336,  $\text{CHCl}_3$ )

## 5.2 Biologická aktivita izolovaných alkaloidů

U izolovaných alkaloidů byla otestována jejich inhibiční aktivita vůči erytrocytární AChE a sérové BuChE. Výsledky jsou uvedeny v nadcházející tabulce (tab. 11).

Tab. 11 Inhibiční aktivita alkaloidů izolovaných z *Fumaria officinalis* L. vůči AChE a BuChE

Alkaloidy	IC <sub>50</sub> (μM)	
	AChE	BuChE
protopin	345,4 ± 6,9	239,6 ± 7,2
kryptopin	477,7 ± 47,3	270,8 ± 39,1
(-)-fumaricin	> 1000	> 1000
(+)-bikukulin	626,1 ± 122,7	329,0 ± 90,2
galanthamin <sup>1</sup>	1,71 ± 0,07	42,3 ± 1,3
huperzin A <sup>1</sup>	0,03 ± 0,001	> 1000
fysostigmin <sup>1</sup>	0,063 ± 0,001	0,130 ± 0,004

<sup>1</sup>referenční látka

## 6 DISKUZE

Obsahové látky z *Fumaria officinalis* L. (Fumariaceae) byly vybrány pro studium inhibičních aktivit vůči lidským cholinesterasám na základě screeningu bioguided assay Ellmanovou spektrofotometrickou metodou *in vitro*, ve které sumární alkaloidní extrakt vykazoval srovnatelnou slibnou inhibiční aktivitu vůči AChE i BuChE ( $IC_{50} = 39,23 \pm 1,96 \mu\text{g/ml}$  a  $IC_{50} = 40,32 \pm 1,08 \mu\text{g/ml}$ ; tab. 8).

Cílem této diplomové práce bylo chromatografické zpracování výtřepku, obsahujícího terciární isochinolinové alkaloidy, který byl připraven ze sumárního alkaloidního extraktu. V rámci diplomové práce byla dále izolačně zpracována spojená frakce 88–93 ( $A_5$ ). Na základě TLC byla ve frakci  $A_5$  prokázána přítomnost šesti látek, které vykazovaly pozitivní reakci s Dragendorffovým činidlem. Z frakce se podařilo získat pomocí sloupcové chromatografie, preparativní TLC a následné krystalizace ze směsi  $\text{CHCl}_3 + \text{EtOH}$  čtyři látky v čisté formě a to v množství umožňujícím jejich identifikaci a otestování vůči lidským cholinesterasám (HuAChE a HuBuChE). Zbývající dvě látky nebyly izolovány z důvodu zcela minoritního zastoupení, které by nebylo dostačující pro biologické testy.

Látky byly identifikovány na základě NMR, GC-MS analýz, optické otáčivosti a teplot tání. Získaná data byla porovnána s odbornou literaturou, alkaloidy byly určeny jako protopin, kryptopin, (–)-fumaricin a (+)-bikukulin.

Výše zmíněné látky byly již dříve izolovány. Protopin byl identifikován v rostlinách patřících do čeledi Berberidaceae (v rodu *Berberis*), Fumariaceae (v rodu *Corydalis*, *Dicentra*, *Fumaria*), Papaveraceae (v rodu *Chelidonium*, *Eschscholtzia*, *Argemone*, *Papaver*, *Sanguinaria* a *Macleaya*) a Sapindaceae (v rodu *Pteridophyllum*). Mimo řád Papaverales byl kryptopin nalezen v čeledi Ranunculaceae (v rodu *Thalictrum*).<sup>124</sup> (–)-Fumaricin byl izolován z různých druhů rodu *Fumaria* (*Fumaria densiflora* DC., *Fumaria parviflora* Lam. a *Fumaria schramii* Velen).<sup>125,126,127</sup> (+)-Bikukulin byl izolován z *Fumaria bastardii* Boreau (Fumariaceae).<sup>128</sup>

Inhibiční aktivita vůči HuAChE a HuBuChE byla stanovena *in vitro* spektrofotometrickou Ellmanovou metodou. Pouzdra lidských erytrocytů byla použita jako zdroj AChE, zdrojem BuChE byla lidská plazma. AChE i BuChE pocházely od zdravých dárců. Získané hodnoty  $IC_{50}$  ( $\mu\text{M}$ ) byly porovnány se standardy galanthaminem, huperzinem A a fysostigminem. Galanthamin je selektivním inhibitorem AChE ( $IC_{50} =$

1,71 ± 0,07 μM), vůči BuChE vykazuje nevýraznou aktivitu (IC<sub>50</sub> = 42,3 ± 1,3 μM). Naproti tomu je Huperzin A vůči BuChE zcela neaktivní. Vykazuje silnou inhibiční aktivitu vůči AChE (IC<sub>50</sub> = 0,03 ± 0,001 μM). Fysostigmin patří mezi významné inhibitory cholinesterás, dříve používaným v terapii AD, v důsledku silných nežádoucích účinků se od něj v současné terapii ustoupilo. V mé studii byl použit jako pozitivní standard, který signifikantně inhibuje AChE i BuChE (IC<sub>50</sub> = 0,063 ± 0,001 μM a IC<sub>50</sub> = 0,130 ± 0,004 μM). Nejvýraznější inhibiční aktivitu vůči HuAChE a HuBuChE z izolovaných alkaloidů vykazoval protopin (IC<sub>50</sub> = 345,4 ± 6,9 μM a IC<sub>50</sub> = 239,6 ± 7,2 μM); literatura u protopinu uvádí významnější inhibici AChE (14,5 μM a 16,1 μM).<sup>129, 130</sup> (-)-Fumaricin byl vůči cholinesterásám zcela neaktivní (IC<sub>50</sub> > 1000 μM). Kryptopin a (+)-bikukulin vykazovaly vůči AChE velmi slabou inhibiční aktivitu (IC<sub>50</sub> = 477,7 ± 47,3 μM; IC<sub>50</sub> = 626,1 ± 122,7 μM) a vůči BuChE byly také velmi slabě aktivní (IC<sub>50</sub> = 270,8 ± 39,1 μM a IC<sub>50</sub> = 329,0 ± 90,02 μM)). (-)-Fumaricin a kryptopin byly testovány na cholinesterasovou inhibiční aktivitu vůbec poprvé. Literatura uvádí (+)-bikukulin jako kompetitivní inhibitor acetylcholinesterázy (K<sub>i</sub> = 65 μM).<sup>131</sup> Rozdílné hodnoty IC<sub>50</sub> naměřené v naší studii s porovnáním s literaturou mohou být způsobeny použitím jiných enzymových modelů (AChE z elektrického úhoře, myší mozková AChE atd.)

Výsledkem diplomové práce je, žádný z izolovaných alkaloidů nevykazoval lepší nebo srovnatelnou inhibiční aktivitu lidských cholinesterás než pozitivní kontrolní látky. S jistotou lze říci, že žádná z izolovaných látek nenese účinek, který vykazoval sumární alkaloidní extrakt. Přestože žádná z látek nevykazuje výraznou inhibiční aktivitu vůči lidským cholinesterásám nelze je zavrhnout v potenciálním uplatnění v terapii AD, protože tyto látky budou dále podrobeny řadě dalších testů *in vitro* na katedře farmaceutické botaniky a ekologie ve spolupráci s Centrem pokročilých studií FVZ v Hradci Králové UO v Brně (antiradikálová aktivita, inhibice beta-sekretasy, agregace Abeta 1-42, inhibice prolylendopeptidasy, inhibice GSK3-beta a některé další připravované testy).

## 7 LITERATURA

---

- <sup>1</sup> Koukolík F., Jiráček R.: *Alzheimerova nemoc a další demence*. 1. vyd. Grada, Praha 1998.
- <sup>2</sup> Berkov S., Bastida J., Nikolova M., Viladomat F., Codina C.: Rapid TLC/GC-MS identification of acetylcholinesterase inhibitors in alkaloid extracts. *Phytochem. Anal.* 2008, 19, 411-419.
- <sup>3</sup> Glenner G. G., Wong C. W.: Alzheimer's disease and Down's syndrome: sharing of a unique cerebrovascular amyloid fibril protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1984, 122, 1131-1135.
- <sup>4</sup> Masters C. L., Simms G., Wcinman N. A., Multhaup G., McDonald B. L., Beyreuther K.: Amyloid plaque core prote in Alzhemier dinase and Down syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1985, 82, 4245-4249.
- <sup>5</sup> Haass C, Selkoe D. J.: Soluble protein oligomers in neurodegeneration: Lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2007, 8, 101-12.
- <sup>6</sup> Busciglio J, Pelsman A, Wong C, et al.: Aletered metabolism of the amyloid beta precursor protein in associated with mitochondrial dysfunction in Down's syndrome. *Neuron* 2002, 33, 677-688.
- <sup>7</sup> Tanzi R. E, Bertram L.: Twenty years of the Alzheimer's dinase amyloid hypothesis: A genetic perspective. *Cell* 2005, 120, 545-555.
- <sup>8</sup> <http://www.news-medical.net/news/2009/03/11/46767.aspx>, staženo 13. března 2013
- <sup>9</sup> Kaye R, Head E, Thompson J. L., et al.: Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis. *Science* 2003, 300, 486-489.
- <sup>10</sup> Klein W. L., Krafft G. A., Finch C. E.: Targeting small Abeta oligomers: The solution to an Alzheimer's disease conundrum? *Trends Neurosci.* 2001, 2, 219-224.
- <sup>11</sup> Walsh D. M., Selkoe D. J.: A beta oligomers – decade of discovery. *J. Neurochem.* 2007, 101, 1172-1184.
- <sup>12</sup> Kamenetz F., Tomita T., Hsieh H. et al.: APP processing and synaptic function. *Neuron* 2003, 37, 92537.
- <sup>13</sup> Kanemitsu H., Tomiyama T., Mori H.: Human neprilysin is capable of degrading amyloid beta peptide not only in the monomeric form but also the pathological oligomeric form. *Neurosci. Lett.* 2003, 350, 113-116.
- <sup>14</sup> Iwata N., Tsubuki S., Takaki Y. et al.: Metabolic regulation of brain Abeta by neprilysin. *Science* 2001, 292, 1550-1552.
- <sup>15</sup> Qiu W. Q., Walsh D. M., Ye Z. et al.: Insulin-degrading enzyme regulates extracellular levels of amyloid beta-protein by degradation. *J. Biol. Chem.* 1998, 273, 32730-32738.
- <sup>16</sup> Leissring M. A., Farris W., Chang A. Y. et al.: Enhanced proteolysis of beta-amyloid in APP transgenic mice prevents plaque formation, secondary pathology, and premature death. *Neuron* 2003, 40, 1087-1093.
- <sup>17</sup> Farris W., Mansourian S., Chang Y. et al.: Insulin-degrading enzyme regulates the levels of insulin, amyloid beta-protein, and the beta-amyloid precursor protein intracellular domain in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2003, 100, 4162-4167.
- <sup>18</sup> Lee V. M., Goedert M., Trojanowski J. Q.: Neurodegenerative tautopathies. *Annu. Rev. Neurosci* 2001, 24, 1121-1159.

- 
- <sup>19</sup> Iqbal K., Alonso Adel C., Chen S et al.: Tau pathology in Alzheimer's disease and other tauopathies. *Biochim. Biophys. Acta* 2005, *1739*, 198–210.
- <sup>20</sup> Geula C, Wu C. K, Saroff D., Lorenzo A., Yuan M., Yankner B. A.: Aging renders the brain vulnerable to amyloid  $\beta$ -protein neurotoxicity. *Nat. Med.* 1998, *4*, 827–831.
- <sup>21</sup> Santacruz K., Lewis J., Spies T. et al.: Tau suppression in a neurodegenerative mouse model improves memory function. *Science* 2005, *309*, 476–481.
- <sup>22</sup> Oddo S., Vasilevko V., Caccamo A., Kitazawa M., Cribbs D. H., LaFerla F. M.: Reduction of soluble A $\beta$  and tau, but not soluble A $\beta$  alone, ameliorates cognitive decline in transgenic mice with plaques and tangles. *J. Biol. Chem.* 2006, *281*, 39413–39423.
- <sup>23</sup> Marques M. A., Crutcher K. A.: Apolipoprotein E-related neurotoxicity as a therapeutic target for Alzheimer's disease. *J. Mol. Neurosci* 2003, *20*, 327–337.
- <sup>24</sup> Ramassamy C., Krzywkowski P., Averill D., Lussier-Cacan S., Theroux L., Christen Y., Davignon J., Poirier J.: Impact of apo E deficiency on oxidative insults and antioxidants levels in the brain. *Mol. Brain Res.* 2001, *86*, 76–83.
- <sup>25</sup> Lee Y., An M., Laskowitz D., Warner D. S., Pearlstein R. D.: Apolipoprotein E protects against oxidative stress in mixed neuronal-glia cell cultures by reducing glutamate toxicity. *Neurochem. Int.* 2004, *44*, 107–118.
- <sup>26</sup> Querfurth H. W., LaFerla F. M.: Alzheimer's disease. *New Engl. J. Med.* 2010, *362*, 329–344.
- <sup>27</sup> Beffert U., Poirier J.: ApoE associated with lipid has a reduced capacity to inhibit beta-amyloid fibril formation. *Neuroreports* 1998, *9*, 3321–3323.
- <sup>28</sup> Ramassamy C., Averill D., Beffert U., Theroux L., Lussier-Cacan S., Cohn J. S., Christen Y., Schoofs A., Davignon J., Poirier J.: Oxidative insults are associated with apolipoprotein E genotype in Alzheimer's disease. *Neurobiol.* 2000, *7*, 23–37.
- <sup>29</sup> Jordan J., Galindo M. F., Miller R. J., Reardon C. A., Getz G. S., LaDu M. J.: Isoform specific effect of apolipoprotein E on cell survival and  $\beta$ -amyloid-induced toxicity in rat hippocampal pyramidal neuronal cultures. *J. Neurosci.* 1998, *18*, 195–204.
- <sup>30</sup> Torre J. C., Stefano G. B.: Evidence that Alzheimer's disease is a microvascular disorder: the role of constitutive nitric oxide. *Brain Res. Rev.* 2000, *34*, 119–136.
- <sup>31</sup> Kosunen O., Talasniemi S., Lehtovirta M.: Relation of coronary atherosclerosis and apolipoprotein E genotypes in Alzheimer's disease. *Stroke* 1995, *26*, 743–748.
- <sup>32</sup> Greenberg S. M., Briggs M. E., Hyman B. J., Kokoris G., Takis C.: Apolipoprotein E<sub>4</sub> is associated with the presence and earlier onset of hemorrhage in cerebral amyloid angiopathy. *Stroke* 1996, *27*, 1333–1337.
- <sup>33</sup> Sperling R. A., Jones K. J., Rentz D., Albert M. S., Holman D. L.: Spect cerebral perfusion and apolipoprotein E genotype. *Neurology* 1998, *50*, 438–439.
- <sup>34</sup> Paris D., Town T., Parker T. A., Humphrey J., Mullan M.: Isoform-specific vasoconstriction induced by apolipoprotein E, modulation of this effect by Alzheimer's beta-amyloid peptide. *Neurosci Lett.* 1998, *256*, 73–76.
- <sup>35</sup> Zafrilla P., Mulero J., Xandri J. M. et al. Oxidative stress in Alzheimer patients in different stages of the disease. *Curr. Med. Chem.* 2006, *13*(9), 1075–1083.

- 
- <sup>36</sup> Zhu X., Smith M. A., Honda K. et al.: Vascular oxidative stress in Alzheimer's disease. *J. Neurol Sci.* 2007; 257(1-2), 240–246.
- <sup>37</sup> Siegel S. J., Bieschke J., Powers E. T. et al.: The oxidative stress metabolite 4-hydroxynonenal promotes Alzheimer protofibril formation. *Biochemistry* 2007, 46(6), 1503–1510.
- <sup>38</sup> Brown G. C., Bal-Price A.: Inflammatory neurodegeneration mediated by nitric oxide, glutamate and mitochondria. *Mol. Neurobiol.* 2003, 27, 325–355.
- <sup>39</sup> Marzolo M. P., Von Bernhardi R., Inestrosa N. C.: Mannose receptor is present in a functional state in rat microglial cells. *J. Neurosci Res.* 1999; 58: 387–395.
- <sup>40</sup> McGeer P. L., Itagaki S., Tago H., McGeer E. G.: Reactive microglia in patients with senile dementia of the Alzheimer type are positive for the histocompatibility glycoprotein HLA-DR. *Neurosci. Lett.* 1987, 79, 195–200.
- <sup>41</sup> Rogers J. T., Leiter J. M., McPhee J., Cahill C. M., Zhan S. S., Potter H., Nilsson L. N.: Translation of the Alzheimer amyloid precursor protein mRNA is up-regulated by interleukin-1 through 5'-untranslated region sequences. *J. Biol. Chem.* 1999, 274, 6421–6431.
- <sup>42</sup> Colton C. A., Snell J., Chernyshev O., Gilbert D. L.: Induction of superoxide anion and nitric oxide production in cultured microglia. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1994, 738, 54–63.
- <sup>43</sup> Poirier J., Davignon J., Bouthillier D., Kogan S., Bertrand P., Gauthier S.: Apolipoprotein E polymorphism and Alzheimer's disease. *Lancet* 1993, 342, 697–699.
- <sup>44</sup> Lincová D., Farghali H. et al.: *Základní a aplikovaná farmakologie*. 2. vyd. Galén, Praha 2007.
- <sup>45</sup> Massoulie J., Pezzemneti L., Bon S., Krejci E., Valette F. M.: Molecular and cellular biology of cholinesterases. *Neurobiol.* 1992, 41, 31–91.
- <sup>46</sup> Chatonnet A., Lockridge O.: Comparison of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase. *Biochem. J.* 1989, 260, 625–634.
- <sup>47</sup> Cokugras A. N.: Butyrylcholinesterase: Structure and Physiological Importance. *Turk. J. Biochem.* 2003, 28 (2), 54–61.
- <sup>48</sup> Houghton P. J., Ren Y., Howes M. J.: Acetylcholinesterase inhibitors from plants and fungi. *Nat. Prod. Rep.* 2006, 23, 181–199.
- <sup>49</sup> Patočka J., Kuča K., Jun D.: Acetylcholinesterase: crucial enzyme of human body. *Acta Med.* 2004, 47, 215–230.
- <sup>50</sup> Giacobini E.: Cholinesterase inhibitors: new roles and therapeutic alternatives. *Pharmacol. Res.* 2004, 50, 433–440.
- <sup>51</sup> Dooley M., Lamb H.: Donepezil. A review of its use in Alzheimer's disease. *Drugs Aging*, 2000, 16(3), 199–226.
- <sup>52</sup> Roongpetch K., Yuan L.: Mechanism of CNS Drugs and their Combinations for Alzheimer's Disease. *CNS Agent in Med. Chem.* 2008, 8, 241–248.
- <sup>53</sup> Spencer, C., Noble. S.: Rivastigmine. A review of its use in Alzheimer's disease. *Drugs Aging*, 1998, 13(5), 391–411.
- <sup>54</sup> Krejčová G, Ševelová L.: Současné poznatky o galanthaminu, reversibilnímu inhibitoru acetylcholinesterasy. *Voj. Zdrav. listy* 2003, 72, 37–44.



- 
- <sup>55</sup> Tang X. C., Han Y. F.: Pharmacological profile of huperzine A, a novel acetylcholinesterase inhibitor from finese herb. *CNS Drug Rev.* 1999, 5, 281–300.
- <sup>56</sup> Wang T., Tang X. C.: Reversal of scopolamine-induced deficits in radial maze performance by (-)-huperzine A: comparison with E2020 and tacrine. *Eur. J. Pharmacol.* 1998, 349, 137–142.
- <sup>57</sup> Cacabelos R., Takeda. M., Winblad B.: The glutamatergic system and neurodegeneration in dementia: preventive strategies in Alzheimer's disease. *Int. J. Geriatr. Psychiatry* 1999, 14, 3–47.
- <sup>58</sup> Lipton S. A.: The molecular basis of memantine in Alzheimer's disease and other neurologic disorders low-affinity, uncompetitive antagonism. *Curr. Alzheimer Res.* 2005, 2, 155–165.
- <sup>59</sup> Jiráček R.: Současné trendy v biologické terapii Alzheimerovy choroby. *Psychiatrie pro praxi* 2006, 1, 8–11.
- <sup>60</sup> Parsons C. G., Stoffler A., Danysz W.: Memantine: a NMDA receptor antagonist that improves memory by restoration of homeostasis in the glutamatergic system—too little activation is bad, too much is even worse. *Neuropharmacol.* 2007, 53, 699–723.
- <sup>61</sup> Wilcock G. K.: Memantine for the treatment of dementia. *Lancet. Neurol.*, 2003, 2, 503–505.
- <sup>62</sup> Parihar M. S., Hemnani T.: Phenolic antioxidant attenuate hippocampal neuronal cell damage against kainic acid induced neurotoxicity. *J. Biosci.* 2003, 28, 121–128.
- <sup>63</sup> Parihar M. S., Hemnani T.: Experimental excitotoxicity provokes oxidative damage in mice brain and attenuation by extract of *Asparagus racemosus*. *J. Neural. Transm.* 2004, 111(1), 1–12.
- <sup>64</sup> Mendoza-Ramirez J. L., Beltran-Parrazal L., Verdugo-Diaz L., Morgado-Valle C., Drucker-Colin R.: Delay in manifestations of aging by rafting NGF cultured chromaffin cells in adulthood. *Neurobiol. Aging* 1995, 16, 907–916.
- <sup>65</sup> Hejny S., Slavík B.: *Květena ČSR*. 1. díl. Academia, Praha 1988.
- <sup>66</sup> Soušek J., Valešová M.: Obsahové látky rodu *Fumaria*. *Chem. listy* 1995, 89, 489.
- <sup>67</sup> <http://rostliny.prirodou.cz/zemedymovite/zemedym/zemedym-lekarsky/>, staženo 28. února 2013.
- <sup>68</sup> Madaus G.: *Lehrbuch der Biologischen Heilmittel*. Georg Olms Verlag, Hildesheim 1979.
- <sup>69</sup> Martindale. *The Extra Pharmacopoeia*. 30. vydání, London 1993.
- <sup>70</sup> Hahn R., Nahrstedt A.: High content of hydroxycinnamic acids esterified with (+)-D-malic acid in the upper parts of *Fumaria officinalis*. *Planta Med.* 1993, 59, 189–190.
- <sup>71</sup> Massa V., Susplugas P., Anelli A.: Sur les pigments phénoliques du *Fumaria officinalis* L. *Trav. Soc. Pharm. Montpellier* 1971, 31, 233–236.
- <sup>72</sup> Bhakuni D. S., Chaturvedi R.: The alkaloids of *Corydalis meifolia*. *J. Nat. Prod.* 1983, 46, 320–324.
- <sup>73</sup> Shiomoto H., Matsuda H., Kubo M.: Effects of protopine on blood platelet aggregation III. Effect of protopine on the metabolic system of arachidonic acid in platelets. *Chem. Pharm. Bull.* 1991, 39, 474–477.
- <sup>74</sup> Shiomoto H., Matsuda H., Kubo M.: Effects of protopine on blood platelet aggregation. III. Effect of protopine on the metabolic system of arachidonic acid in platelets. *Chem. Pharm. Bull.* 1991, 39, 474–477.
- <sup>75</sup> Pandey V. B., Dasgupta B., Bhattacharya S. K., Lal R., Das P. K.: Chemistry and Pharmacology of the Major Alkaloid of *Fumaria indica*. *Curr. Sci.* 1971, 40, 455–457.

- 
- <sup>76</sup> Southon I. W., Buckingham J.: *Dictionary of Alkaloids*. Chapman and Hall, London and New York 1989.
- <sup>77</sup> Soušek J., Gue'don D., Adam T., Bochořáková H., Táborská E., Válka I., Šimánek V.: Alkaloids and Organic Acids Content of Eight Fumaria Species. *Phytochem. Anal.* 1999, 10, 6–11.
- <sup>78</sup> Hahn R., Nahrstedt A.: High content of hydroxycinnamic acids asterified with (+)-D-malic acid in the upper parts of Fumaria officinalis. *Planta Med.* 1993, 59, 189–190.
- <sup>79</sup> Massa V., Susplugas P., Anelli A.: Sur les pigments phénoliques du Fumaria officinalis L. *Trav. Soc. Pharm. Montpellier* 1971, 31, 233–236.
- <sup>80</sup> Khattak S. G., Gilani S. N., Ikram M.: J: Antipyretic studies on some indigenous Pakistani medicinal plants. *Ethnopharmacol.* 1985, 14, 45–51.
- <sup>81</sup> Hilal S. H., Aboutabl E. A., Youssef S. A. H., Shalaby M. A., Sokkar N. M.: Alkaloidal content and certain pharmacological activities of Fumaria parviflora Lam. growing in Egypt. *Plantas Med. Phytoter.* 1989, 23, 109–123.
- <sup>82</sup> Gorbunov N. P., Molokhova L. G., Sukhanov A. A.: Preparation and the arrhythmic activity of the total alkaloids of Fumaria officinalis L. *Khim. Farm. Zh.* 1977, 11, 56–58.
- <sup>83</sup> Ortiz de Urbina J. J., Martin M. L. Sevilla M. A., Montero M. J., Carron I. R., San Roman L.: Antispasmodic activity on rat smooth muscle of polyphenol compounds caffeic and protocatechic acids. *Phytother. Res.* 1990, 4, 71–76.
- <sup>84</sup> Laranjinha L. A., Almeida L. M., Madeira V. M.: Reactivity of dietary phenolic acids with peroxy radicals: antioxidant activity upon low density lipoprotein peroxidation. *Biochem. Pharmacol.* 1994, 48, 487–494.
- <sup>85</sup> Kitts D. D., Wijewickrene A. N.: Effect of dietary caffeic and chlorogenic acids on in vivo xenobiotic enzyme systems. *Plant Foods Hum. Nutr.* 1994, 45, 287–298.
- <sup>86</sup> Peeters A. J., Dijkmans B. A., Van der Schroeff J. G., *Br. J. Rheumatol.* 1992, 31, 502–504.
- <sup>87</sup> Soušek J., Vavreckova C., Psotova J., Ulrichova J., Šimánek V.: Antioxidant and antilipoperoxidant activities of alkaloid and phenolic extracts of eight Fumaria species. *Acta Horticult.* 1999, 501, 239–244.
- <sup>88</sup> Gong L. L., Fang L.-H., Wong S.-B., Sun J.-L., Qin H.-L., Li X. X., Du G.-H.: Coptisine exert cardioprotective effect through anti-oxidative and inhibition of RhoA/Rho kinase pathway on isoproterenol-induced myocardial infarction in rats. *Atherosclerosis.* 2012, 222, 50–58.
- <sup>89</sup> Lee J. W., Iwahashi A., Hasegawa S. I., Yonezawa T., Jeon W.-B., Cha B.-Y., Nagai K., Woo J.-T.: Coptisine inhibits RANKL-induced NF- $\kappa$ B phosphorylation in osteoclast precursors and suppresses function through the regulation of RANKL and OPG gene expression in osteoblastic cells. *J. Nat. Med.* 2012, 66, 8–16.
- <sup>90</sup> Zhu J., Cen X., Chen X., Li X., Chen Z., He F., Li P.: Synergy hypoglycemic activity of berberine alkaloids. *Shizhen Guoyi Guoyao.* 2010, 21, 2282–2284; *Chem. Abstr.* 2011 156, 248543.
- <sup>91</sup> Jung H. -A., Min B. -S., Yokazawa T., Lee J. H., Kim Y. -S., Choi J.S.: Anti-Alzheimer and antioxidant activities of coptidis Rhizoma alkaloids. *Biol. & Pharmaceut. Bull.* 2009, 32, 1433–1438.
- <sup>92</sup> Kong W. J., Zhao Y. L., Xiao X. H., Li Z. L., Jin C., Li H. B.: Investigation of the anti-fungal activity of coptisine and Candida albicans growth by microcalorimetry combined with principal component analysis. *J. Appl. Microbiol.* 2009, 107, 1072–1080.

- 
- <sup>93</sup> Sadritdina F. S., Rezhopov Z.: Relation between chemical structure and sedative activity of derivatives of diisoquinoline alkaloids. *Doklady Akademii Nauk UzSSR*. 1982, 34–35; *Chem. Abstr.* 1983, 98, 83240.
- <sup>94</sup> Orhan I., Ozelik B., Karaoglu T., Sener B.: Antiviral and antimicrobial profiles of selected isoquinoline alkaloids from *Fumaria* and *Corydalis* species. *Zeit. Naturforsch. C: J. Biosci.* 2007, 62, 19–26.
- <sup>95</sup> Abbasoglu U., Sener B., Gunay Y., Temizer H.: Antimicrobial activity of some isoquinoline alkaloids. *Arch. Pharm.* 1991, 324, 379–380.
- <sup>96</sup> Ito C., Itoigawa M., Tokuda H., Kuchide M., Nishino H., Furukawa H.: Chemopreventive activity of isoquinoline alkaloids from *Corydalis* plants. *Planta Med.* 2001, 67, 473–475.
- <sup>97</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.: Stylophine from *Chelidonium majus* inhibits LPS-induced inflammatory mediators in RAW 264.7 cells. *Arch. Pharmacol Res.* 2004, 27, 923–929.
- <sup>98</sup> Lee J., Shon M. Y., Jang D. S., Ha T. J., Hwang S. W., Nam S. H., Seo E. K., Park K. H., Yang M. S.: Cytotoxic isoquinoline alkaloids from *Chelidonium majus* var. *asiaticum*. *Agric. Chem. Biotech.* 2005, 48, 198–201.
- <sup>99</sup> Salminen K. A., Meyer A., Jerabkova L., Korhonen L. E., Rahnasto M., Juvonena R. O., Imming P., Raunio H.: Inhibition of human drug-metabolizing cytochrome P450 enzymes by plant isoquinoline alkaloids. *Phytomedicine* 2011, 18, 533–538.
- <sup>100</sup> Correche E. R., Andujar S. A., Kurdalas R. R., Lechon M. J. G., Freile M. L., Enriz R. D.: Antioxidant and cytotoxic activities of canadine: Biological effects and structural aspects. *Bioorg. Med. Chem.* 2008, 16, 3641–3651.
- <sup>101</sup> Scazzocchio F., Cometa M. F., Tomassini L., Palmery M.: Antibacterial activity of *Hydrastis canadensis* extract and its major isolated alkaloids. *Planta Med.* 2001, 67, 561–564.
- <sup>102</sup> Ito Ch., Itoigawa M., Tokuda H., Kuchide M., Nishino H., Furukawa H.: Chemopreventive activity of isoquinoline alkaloids from *Corydalis* plants. *Planta Med.* 2001, 67, 473–475.
- <sup>103</sup> Niu X., Fan T., Li W., Xing W., Huang H.: The anti-inflammatory mediators from peritoneal macrophages. *Eur. J. Pharmacol.* 2012, 689, 262–269.
- <sup>104</sup> Miao F., Yang X.-J., Zhou L., Hu H.-J., Zheng F., Ding X. D., Sun D.-M., Zhou Ch.-D., Sun W.: Structural modification of sanguinarine and chelerythrine and their antibacterial activity. *Nat. Prod. Res.* 2011, 25, 863–867.
- <sup>105</sup> Su Y., Li S., Li N., Chen L., Zhang J., Wang J.: Seven alkaloids and their antibacterial activity from *Hypecoum erectum* L. *J. Med. Plants.* 2011, 5, 5428–5432.
- <sup>106</sup> Wang G. X., Zhou Z., Jiang D. X., Han J., Wang J. F., Zhao L. W., Li J.: In vivo anthelmintic activity of five alkaloids from *Macleaya microcarpa* (Maxim) Fedde against *Dactylogyrus intermedius* in *Carassius auratus*. *Vet. Parasitol.* 2010, 171, 305–313.
- <sup>107</sup> Matsuda H., Shiimoto H., Naruto S., Namba K., Kubo M.: Antithrombotic action of methanol extract and alkaloidal components from *Corydalis tuber*. *Planta Med.* 1988, 54, 27–33.
- <sup>108</sup> Xiao X., Liu J., Hu J., Zhu X., Yang H., Wang C., Zhang Y.: Protective effects of protopine on hydrogen peroxide-induced oxidative injury of PC12 cells via Ca<sup>2+</sup> antagonism and antioxidant mechanisms. *Eur. J. Pharmacol.* 2008, 591, 21–27.

- 
- <sup>109</sup> Choi S. Y., Bang M. H., Lee E. J., Kwon O. S., Kang T. C., Lee Y. H., Rho Y. D., Baek N. I.: Human brain GABA-T ( $\gamma$ -aminobutyric acid transaminase) inhibitory alkaloids from *Corydalis tuber*. *Agric. Chem. Biotech.* 2003, 46, 67–72.
- <sup>110</sup> Hung T. M., Thuong P. T., Nhan N. T., Mai N. T. T., Qua T. L., Choi J. S., Woo M. H., Min B. S., Bae K.: Cholinesterase inhibitory activities of alkaloids from *Corydalis tuber*. *Nat. Prod. Sci.* 2011, 17, 108–112.
- <sup>111</sup> Lee K. H., Huh J. W., Choi M. M., Yoon S. Y., Yang S. J., Hong H. N., Cho S. W.: Regulation of glutamate level in rat brain through activation of glutamate dehydrogenase by *Corydalis ternata*. *Exp. Mol. Med.* 2005, 37, 371–377.
- <sup>112</sup> Tokuda M., Kawabe T., Hanamura H., Tien J., Fu X., Ding L.: Protopine-type alkaloids showing  $\delta$  receptor antagonist activity for treating stress, anxiety, depression, mental disorder and schizophrenia. Jpn. Kokai Tokkyo Koho 2000, JP 2000191530 A 20000711; *Chem. Abstr.* 2000, 133, 94490.
- <sup>113</sup> Song L. S., Ren G. J., Chen Z. L., Chen Z. H., Zhou Z. N., Cheng H.: Electrophysiological effects of protopine in cardiac myocytes: inhibition of multiple cation channel currents. *Brit. J. Pharmacol.* 2000, 129, 893–900.
- <sup>114</sup> Kim S. R., Hwang S. Y., Jang Y. P., Park M. J., Markelonis G. J., Oh T. H., Kim Y. C.: Protopine from *Corydalis ternata* has anticholinesterase and anti-amnesic activities. *Planta Med.* 1999, 65, 218–221.
- <sup>115</sup> Kim D. K., Lee K. T., Baek N. I., Kim S. H., Park H. W., Lim J. P., Shin T. Y., Eom D. O., Yang J. H., Eun J. S.: Acetylcholinesterase inhibitors from the aerial parts of *Corydalis speciosa*. *Arch. Pharmacol. Res.* 2004, 27, 1127–1131.
- <sup>116</sup> Hai-Tao X., Jiao P., Yan L., Jie Y., Xue B., Xiao-Yan H., Fu-Mei Y., Qian-Yun S.: Acetylcholinesterase inhibitors from *Corydalis yanhusuo*. *Nat. Prod. Res.* 2011, 25, 1418–1422.
- <sup>117</sup> Hung T. M., Thuong P. T., Nhan N. T., Mai N. T. T., Quan T. L., Choi J. S., Woo M. H., Min B. S., Bae K.: Cholinesterase inhibitory activities of alkaloids from *Corydalis tuber*. *Nat. Prod. Sci.* 2011, 17, 108–112.
- <sup>118</sup> Chlebek J., Macáková K., Cahlíková L., Kurfürst M., Kuneš J., Opletal L.: Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase Inhibitory compounds from *Corydalis cava* (Fumariaceae). *Nat. Prod. Comm.* 2011, 6, 607–610.
- <sup>119</sup> Sener B., Orhan I.: Molecular diversity in the bioactive compounds from Turkish plants: evaluation of acetylcholinesterase inhibitory activity of *Fumaria species*. *J. Chem. Soc. Pak.* 2004, 26, 313–315; *Chem. Abstr.* 2004, 142, 151897.
- <sup>120</sup> Ulrichová J., Walterová D., Preininger V., Slavík J., Lenfeld J., Cushman M., Šimánek V.: Inhibition of acetylcholinesterase activity by some isoquinoline alkaloids. *Planta Med.* 1983, 48, 111–115.
- <sup>121</sup> Ulrichová J., Walterová D., Preininger V., Šimánek V.: Inhibition of butyrylcholinesterase activity by some isoquinoline alkaloids. *Planta Med.* 1983, 48, 174–177.
- <sup>122</sup> Steck T. L., Kant J. A.: Preparation of impermeable ghosts and inside-out vesicles from human erythrocyte membranes. *Method. Enzymol.* 1974, 31, 172–180.
- <sup>123</sup> Ellman G. L., Courtney K. D., Andres V., Featherstone R. M.: A new rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 1961, 7, 88–95.
- <sup>124</sup> Guinaudeau H., Shamma M.: The protopine alkaloids. *J. Nat. Prod.* 1982, 45, 237–246.
- <sup>125</sup> Popova M., Boeva A., Dolejs L., Preininger V., Šimánek V., Santavy F.: Isolation and chemistry of alkaloids from plants of the Papaveraceae. LXXIX. Alkaloids from *Fumaria schrammii*. *Planta Med.* 1980, 40, 156–160.

- 
- <sup>126</sup> Alimova M., Israilov I. A., Yunusov M. S., Yunusov S. Yu.: Alkaloids from *Fumaria parviflora*.; Chem. Abstr.1983, 98, 104282.
- <sup>127</sup> Taborska E., Bochorakova H., Sousek J., Sedmera P., vavreckova C., Simanek V.: *Fumaria densiflora* DC. alkaloids. *Chem. Commun.* 1996, 61, 1064–1072.
- <sup>128</sup> Kucukboyaci N., Bingol F., Sener B., Kutney J. P., Stoykov N.: Isoquinoline alkaloids from *Fumaria bastardii*. *Nat. Prod. Sci.* 1988, 4, 257–262.
- <sup>129</sup> Kim D. K., Lee K. T., Back N. I., Kim S. H., Park H. W. Lim J. P., Shin T. Y., Eom D. O, Yang J. H., Eun J. S.: Acetylcholinesterase inhibitors from the aerial parts of *Corydalis spinosa*. *Arch. Pharm. Res.* 2004, 27, 1127–1131.
- <sup>130</sup> Hung T. Tm., Na M., Dat N. T., Ngoc T. M., Youn U., Kim H. J., Min B. S., Lee J., Bae K.: Cholinesterase inhibitory and anti-amnesic activity of alkaloids from *Corydalis turtschaninovii*. *J. Ethnopharmacol.* 2008, 119, 74–80.
- <sup>131</sup> Svenneby G., Roberts E.: Bicuculline and Ni-methylbicuculline. Competitive inhibitors of brain acetylcholinesterase. *J. Neurochem.* 1973, 21(4), 1025–1026.