UNIVERZITA KARLOVA

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA FARMACEUTICKEJ BOTANIKY A EKOLÓGIE

DIPLOMOVÁ PRÁCA

Alkaloidy *Papaver rhoeas* L. (Papaveraceae) a jejich biologická aktivita vztažená k Alzheimerovej chorobě II.

Alkaloids of *Papaver rhoeas* L. (Papaveraceae) and their biological activity related to Alzheimer´s disease II.

Vedúci katedry: doc. Ing. Lucie Cahlíková, Ph.D.

Vedúci diplomovej práce: PharmDr. Jakub Chlebek, Ph.D.

Hradec Králové, 2017

Marta Čakurdová

Týmto by som sa chcela poďakovať predovšetkým PharmDr. Jakubovi Chlebkovi, Ph.D. za odborné vedenie celej mojej práce, za poskytnuté cenné rady a materiály pri vypracovaní diplomovej práce, za obetavú pomoc, a taktiež za trpezlivosť pri práci v laboratóriu. Ďalej doc. PharmDr. Jiřímu Kunešovi, Ph.D. za zmeranie a interpretáciu NMR spektier a identifikáciu jednotlivých alkaloidov. Prof. RNDr. Lubomírovi Opletalovi, CSc. za zmeranie biologickej aktivity jednotlivých alkaloidov. Poďakovanie patrí aj celému kolektívu na Katedre farmaceutickej botaniky a ekológie, za pomoc a skvelé podmienky pri práci.

„Prehlasujem, že táto práca je mojím pôvodným autorským dielom. Všetka literatúra a ďalšie zdroje, z ktorých som pri spracovaní čerpala, sú uvedené v zozname použitej literatúry a v práci sú riadne citované. Práca nebola použitá k získaniu iného alebo rovnakého titulu.“

V Hradci Králové, 2017

.....

PODPIS

OBSAH

Prehľad obrázkov ---------- 8

Prehľad tabuliek ---------- 9

Zoznam použitých skratiek ---------- 10

1. ÚVOD ---------- 12

2. Cieľ diplomovej práce ---------- 14

3. Teoretická časť ---------- 15

3.1 Alzheimerova choroba ---------- 15

3.1.1 Epidemiológia ---------- 15

3.1.1.1 Formy Alzheimerovej choroby ---------- 15

3.1.2 Diagnostika Alzheimerovej choroby ---------- 16

3.1.3 Rizikové faktory ---------- 17

3.1.4 Symptómy Alzheimerovej choroby ---------- 17

3.1.5 Neurobiologické zmeny pri Alzheimerovej chorobe ---------- 18

3.1.5.1 Makroskopické zmeny AD ---------- 18

3.1.5.2 Mikroskopické zmeny AD ---------- 19

3.1.5.2.1 Senilné plaky ---------- 19

3.1.5.2.2 β-Amyloid ---------- 19

3.1.5.2.3 Neuronálne klbká ---------- 21

3.1.5.2.4 Apolipoproteín E ---------- 21

3.1.5.2.5 Oxidačný stres ---------- 21

3.1.5.2.6 Ďalšie pôsobenia ---------- 22

3.1.6 Farmakoterapia Alzheimerovej choroby ---------- 23

3.1.6.1 Acetylcholín ---------- 23

3.1.6.2 Acetylcholínesteráza a butyrylcholínesteráza ---------- 24

3.1.6.2.1 Donepezil ---------- 25

3.1.6.2.2 Rivastigmin ---------- 25

3.1.6.2.3 Galanthamin ---------- 26

3.1.6.2.4 Huperzin A ---------- 26

3.1.6.3 Antagonisti NMDA-receptorov ---------- 27

3.1.6.3.1 Memantin ---------- 27

3.1.6.4 Doplnková liečba ---------- 27

3.1.6.4.1 *Ginkgo biloba* L. ---------- 28
3.1.6.4.2 Nootropiká ---------- 28
3.1.6.4.3 Voľné kyslíkové radikály ---------- 28
3.1.6.4.4 Protizápalové látky a estrogény ---------- 29
3.1.6.5 Nové perspektívy liečby ---------- 29
3.1.6.5.1 Antiamyloidná terapia ---------- 29
3.1.6.5.2 Inhibítory τ-agregácie ---------- 30
3.1.6.5.3 Pasívna a aktívna imunizácia ---------- 30
3.1.6.5.4 Inhibícia prolyloligopeptidázy ---------- 30
3.1.6.5.5 Chemoterapeutiká ---------- 32

3.2 Papaver rhoeas L. (Papaveracea) ---------- 33
3.2.1 Taxonomické zaradenie ---------- 33
3.2.2 Čeľaď Papaveraceae ---------- 34
3.2.3 Morfologický popis rastliny *Papaver rhoeas* L. ---------- 34
3.2.4 Zber a sušenie *Papaver rhoeas* L. ---------- 35
3.2.5 Účinky *Papaver rhoeas* L. ---------- 35
3.2.6 Otrava spôsobená *Papaver rhoeas* L. ---------- 36
3.2.7 Obsahové látky *Papaver rhoeas* L. ---------- 37
3.2.8 Isochinolínové alkaloidy ---------- 37
3.2.8.1 Rhoeadinový typ ---------- 37
3.2.8.2 Protoberberínový typ ---------- 38
3.2.8.3 Protopínový typ ---------- 40
3.2.8.4 Aporfínový typ ---------- 41

4. Experimentálna časť ---------- 43

4.1 Materiál a vybavenie ---------- 43
4.1.1 Rozpúšťadlá a chemikálie ---------- 43
4.1.2 Pomocné látky ---------- 43
4.1.3 Detekčné činidla ---------- 43
4.1.4 Chromatografické adsorbenty ---------- 44
4.1.5 Prístrojové vybavenie ---------- 44
4.1.6 Sústavy na vyvíjanie ---------- 44

4.2 Všeobecné postupy práce ---------- 45
4.2.1 Príprava a čistenie rozpúšťadiel ---------- 45
4.2.2 Odparovanie extraktov a frakcií ---------- 45
4.2.3 Sušenie a skladovanie frakcií a izolovaných čistých látok ---------- 45

4.2.4 Príprava dosiek pre preparatívnu tenkovrstevnú chromatografiu ---------- 45
4.2.5 Chromatografické metódy ---------- 45
4.2.5.1 Stĺpcová chromatografia ---------- 45
4.2.5.2 Tenkovrstevná chromatografia ---------- 46
4.2.6 Štruktúrna analýza ---------- 46
4.2.6.1 GC-MS analýza ---------- 46
4.2.6.2 NMR analýza ---------- 46
4.2.6.3 Optická otáčavosť ---------- 47
4.2.6.4 Teplota topenia ---------- 47

4.3 Izolácia alkaloidov ---------- 48
4.3.1 Pôvod rastlinného materiálu ---------- 48
4.3.2 Príprava alkaloidného extraktu ---------- 48
4.3.3 Stĺpcová chromatografia alkaloidného extraktu ---------- 49
4.3.4 Separácia a čistenie alkaloidov z frakcie č. 1 (20-27; 440 mg) ---------- 50

4.4 Stanovenie biologickej aktivity ---------- 51
4.4.1 Stanovenie cholínesterázovej aktivity ---------- 51
4.4.1.1 Chemikálie ---------- 51
4.4.1.2 Pufre ---------- 51
4.4.1.3 Biologický materiál ---------- 52
4.4.1.4 Získanie erytrocytárnej AChE a BuChE z plazmy ---------- 52
4.4.1.5 Stanovenie cholínesterázovej inhibičnej aktivity (IC_{50}) ---------- 53
4.4.2 Stanovenie inhibície prolyloligopeptidázy ---------- 55
4.4.2.1 Chemikálie ---------- 55
4.4.2.2 Stanovenie POP ---------- 55

5. Výsledky ---------- 56

5.1 Štruktúrna analýza ---------- 56
5.1.1 (—)-Stylopin (MC-1) ---------- 56
5.1.1.1 NMR analýza ---------- 56
5.1.1.2 GC-MS analýza ---------- 58
5.1.1.3 Optická otáčavosť ---------- 59
5.1.1.4 Teplota topenia ---------- 59
5.1.2 (+)-Rhoeadin (MC-2) ---------- 59
5.1.2.1 NMR analýza ---------- 59
5.1.2.2 GS-MS analýza ---------- 61
5.1.2.3 Optická otáčavosť ---------- 62

5.1.2.4 Teplota topenia ---------- 62

5.2 Výsledky inhibičných aktivít izolovaných alkaloidov ---------- 62

6. Diskusia ---------- 63

7. Abstrakt ---------- 65

8. Abstract ---------- 66

9. Použitá literatúra ---------- 67

PREHĽAD OBRÁZKOV

Obr. 1 struktura β-amyloidu 20
Obr. 2 metabolizmus acetylcholínu[21] 23
Obr. 3 *Papaver rhoeas* L. 33
Obr. 4 Rhoeadínové alkaloidy 38
Obr. 5 Protoberberínové alkaloidy 39
Obr. 6 Protopínové alkaloidy 41
Obr. 7 Aporfínové alkaloidy 42
Obr. 8 Hromadné TLC spojených frakcií alkaloidného extraktu 50
Obr. 9 TLC frakcia 20-27 alkaloidného extraktu 50
Obr. 10 Štruktúra (—)-stylopinu 56
Obr. 11 ^{1}NMR spektrum (—)-stylopinu 57
Obr. 12 ^{13}C NMR spektrum (—)-stylopinu 58
Obr. 13 EI spektrum (—)-stylopinu 58
Obr. 14 Štruktúra (+)-rhoeadinu 59
Obr. 15 ^{1}NMR spektrum (+)-rhoeadinu 60
Obr. 16 ^{13}C spektrum (+)-rhoeadinu 61
Obr. 17 EI spektrum (+)-rhoeadinu 61

PREHĽAD TABULIEK

Tabuľka č. 1 Parametre kolóny 49

Tabuľka č. 2 Spojené frakcie alkaloidného extraktu 49

Tabuľka č. 3 Cholínesterázová a antioxidačná aktivita štandardných látok 54

Tabuľka č. 4 Výsledky inhibičných aktivít izolovaných alkaloidov 62

ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK

Aβ	β-amyloid
AD	Alzheimerova choroba (Alzheimer Disease)
Ach	acetylcholín
AChE	acetylcholínesteráza
AMK	aminokyselina
ApoE	apolipoproteín E
APP	amyloidný prekurzorový proteín
BuChE	butyrylcholínesteráza
Ca^{++} kanály	vápenaté kanály
CNS	centrálna nervová sústava
COX-2	cyklooxygenáza-2
CSF	cerebrospinálna tekutina
GABA	γ-aminomaslová kyselina
ChAT	cholínacetyltransferáza
IL-1	interleukín-1
IL-2	interleukín-2
IL-6	interleukín-6
IChE	inhibítor cholínesteráz
IAChE	inhibítor acetylcholínesteráz

MMSE	Mini-Mental-State-Examination
NMDA	*N*-methyl-D-aspartát
NO	oxid dusnatý
PET	pozitrónová emisná tomografia
PGE2	prostaglandín 2
PS-1	presenilín 1
PS-2	presenilín 2
SPECT	jednoprotónová emisná tomografia
TNF-α	tumor nekrotizujúci faktor α
VNS	vegetatívny nervový systém

1. ÚVOD

Podľa Svetovej zdravotníckej organizácie (WHO) sa demencia Alzheimerovho typu radí medzi 10 hlavných smrteľných ochorení. So zvyšujúcim sa vekom obyvateľstva riziko vzniku Alzheimerovej choroby narastá. Štatistika zo západných krajín informuje, že Alzheimerovou chorobou trpí približne 1% ich obyvateľov, a tomuto ochoreniu pripisujú štvrté miesto najčastejších príčin smrti.[1]

Alzheimerova choroba je závažné degeneratívne onemocnenie, ktoré neovplyvňuje len osoby, ktoré ňou trpia, ale ovplyvňuje aj príbuzné osoby a priateľov. Alzheimerova choroba začína pomaly a nenápadne, prejavuje sa zníženou schopnosťou pamäte a kognitívnych funkcií, ktoré sa postupne zhoršujú. Alzheimerova choroba sa nedá vyliečiť, môžeme len zmierňovať a spomaľovať jej progresiu. Zlatým štandardom liečby Alzheimerovej choroby sú inhibítory cholínesteráz (IChE) a antagonisti NMDA receptorov. Sú to postupy farmakoterapie založené na dôkazoch. V súčasnosti je spektrum IChE úzke, používa sa donepezil, rivastigmin, galanthamin. V minulosti sa používal aj takrin, ale kvôli jeho nežiadúcim účinkom (hepatotoxicite) bol z liečby vyradený. Ďalšou látkou je memantin, ktorý patrí medzi antagonistov NMDA receptorov. Ako perspektívna látka sa javí huperzin A, ktorý je terapeuticky používaný v Číne, ale v Európe a USA sa stále nachádza v klinickej fázy skúšania. V súčasnosti sa skúma široká škála ďalších postupov farmakoterapie, ale tieto postupy nie sú momentálne dostatočne založené na dôkazoch. K týmto postupom patrí ovplyvňovanie ukladania Aβ, blokácia agregácie τ-proteínu, imunizácia či inhibícia prolyloligopeptidázy.

Mnoho pracovísk na svete sa zaoberá výskumom potenciálnych liečiv proti Alzheimerovej chorobe. Medzi tieto pracoviská zaoberajúce sa výskumom prírodných látok potenciálne využiteľných pri terapii tohto ochorenia patrí aj skupina ADINACO na katedre botaniky a ekológie, ktorá sa touto problematikou zaoberá už dlhodobo.

V rámci screeningu potenciálnych zdrojov prírodných látok bola nájdená selektívna inhibičná butyrylcholínesterázová aktivita alkaloidného extraktu z *Papaver rhoeas* L. Jeho sekundárne metabolity (alkaloidy) a ich biologická aktivita vzťahujúca sa k Alzheimerovej chorobe sa stali náplňou moje diplomovej práce.

2. Cieľ diplomovej práce

Ciele diplomovej práce:

1. izolácia najmenej jedného alkaloidu v čistej forme pomocou chromatografických metód z vybranej frakcie získanej z chromatografickej separácie alkaloidného extraktu z *Papaver rhoeas* L. (Papaveraceae)

2. podiel na určení štruktúry spektrálnymi metódami (GC-MS, NMR) a určenie optickej otáčavosti a teploty topenia vyizolovaných látok

3. podiel na určení biologickej aktivity čistých izolovaných látok voči inhibícii acetylcholínesterázy, butyrylcholínesterázy a prolyloligopeptidázy

3. Teoretická časť

3.1 Alzheimerova choroba

Alzheimerova choroba (AD) je definovaná ako závažné neurodegeneratívne ochorenie mozgu, pri ktorom dochádza k strate neurónov, a táto strata vedie k atrofii mozgového tkaniva. Ochorenie popísal ako prvý Alojz Alzheimer, nemecký psychiater. Vo svojej štúdii sa venoval mikroskopickej analýze mozgu. Prácu s názvom ,,O zvláštnej chorobe mozgovej kôry" publikoval v roku 1907 a zaoberal sa v nej prípadom pacientky A. Deterovej. Uvádza v nej celý komplex príznakov ako je znížená schopnosť logického myslenia a pamäti, dezorientácia v priestore, depresia a sluchové halucinácie, ktorými pacientka trpela.[1]

3.1.1 Epidemiológia

Na základe výsledkov projektu EuroCoDe (European Collaboration on Dementia) žije v Európe 7,3 miliónov obyvateľov s demenciou. Nakoľko Česká republika nemá spoľahlivé výsledky o výskyte ochorenia, predpokladá sa, že v ČR žije viac než 120 tisíc pacientov s AD. Toto číslo sa vzhľadom k starnutiu populácie každým rokom zvyšuje, na základe čoho je zvýšený výskyt pacientov s neurodegeneratívnym ochorením.[2]

Výskyt demencie v detskom a strednom veku je vzácnejší. Včasná diagnóza AD sa môže objavovať už v 40.-50. roku života. Väčšina prípadov sa objavuje až po 65. roku života.[3]

3.1.1.1 Formy Alzheimerovej choroby

Familiárna (vrodená, včasná) forma AD je veľmi vzácna, trpí ňou asi 5 % pacientov. Vzniká na genetickom podklade u mladších ľudí.

Sporadickou (oneskorenou) formou AD trpí približne 80 % pacientov. Je to typické ochorenie vo vyššom veku.[4]

Demencia je v detskom veku veľmi vzácna, môže vzniknúť pri cytostatickej liečbe hlavne hematologických ochorení. Ak sa vyskytla porucha intelektu dôsledkom vrodenej poruchy alebo vznikla do dvoch rokov dieťaťa, hovoríme o oligofrénii.[5]

3.1.2 Diagnostika Alzheimerovej choroby

Len odborné vyšetrenie lekárom-špecialistom môže posúdiť, či daná zmena alebo symptóm pripomína demenciu alebo inú zmenu duševného stavu. Na diagnostike AD sa podieľa pacient, opatrovateľ a lekár, ktorý zapisuje všetky získané výsledky pacienta.[1]

Dôležitou súčasťou stanovenia diagnózy je anamnéza, ktorá zahŕňa osobnú, rodinnú, farmakologickú, sociálnu a pracovnú anamnézu. Špecialista sa informuje aj o súčasných ochoreniach pacienta. Pokračuje laboratórny skríning, EKG, interné vyšetrenie a neurologické vyšetrenie. Často sa využívajú testy pamäti. Najčastejším z nich je MMSE, test kreslenia hodín či Wechslerova škála pamäti.[1]

V klinickom výskume AD je najdôležitejšie zobrazovacie vyšetrenie pomocou počítačovej tomografie (CT) a magnetickej rezonancie (MR), ktoré môžu odhaliť aj organické poškodenie CNS. Súčasťou sú aj neurozobrazovacie vyšetrenia ako napríklad PET a SPECT, ktoré vyhľadávajú biologické znaky typické pre ochorenie. Na základe uvedených vyšetrovacích metód, ako aj pomocou nálezu patologického τ-proteínu, môžeme diagnostikovať AD.[1]

AD je možné diagnostikovať aj na základe genetického vyšetrenia. Určuje sa mutácia na dlhom ramene chromozómu 21, taktiež na 1. a 14. chromozóme. Vyšetruje sa aj výskyt rizikového činiteľa apolipoproteínu E4 (ApoE4) na 14. chromozóme.[6]

3.1.3 Rizikové faktory

Frekvencia výskytu AD narastá s vekom. Stále sa diskutuje, či výskyt AD súvisí s narastajúcim vekom alebo s procesom starnutia. Obidva typy AD v nižšom aj vyššom veku, vyskytujúce sa v niektorých rodinách, sú na genetickom podklade. Vysokým rizikom vzniku choroby je kombinácia genetického vplyvu s vonkajším prostredím.[7]

Rizikovým faktorom pre vznik AD vo vyššom veku je alela ε-4 pre ApoE, mutácia na mitochondriálnej DNA a locus na 12. chromozóme.[7]

Rizikovým faktorom pre vznik AD v nižšom veku je mutácia na chromozómoch 21, 14 a 1. K rizikovým faktorom zvyšujúcim pravdepodobnosť vzniku choroby patrí aj fajčenie, poškodenia mozgu, infekcie mozgu a uvádza sa aj nižšie vzdelanie.[7]

3.1.4 Symptómy Alzheimerovej choroby

Symptómy AD zahŕňajú hlavne duševné problémy. Dochádza k zmenám emočného správania, k zmenám myslenia, vnímania, k jazykovým zmenám a k strate pamäti. Ako prvý príznak sa objaví zabúdanie. Pacient zabúda na bežné činnosti, zhoršuje sa krátkodobá pamäť. Postupne dochádza k náročnosti plnenia úloh, zabúdanie mien príbuzných, jazykové problémy, zabúdanie názvov predmetov, dochádza k strate záujmu o veci. Pacient stráca svoju osobnosť a neskôr aj sociálnu zručnosť ako je kúpanie sa, obliekanie či stravovanie. So zhoršovaním AD sa príznaky stupňujú a narúšajú schopnosť postarať sa o samého seba. Môže dôjsť aj k problémom ovládania stolice a moču, ako aj k problémom prehĺtania.[8]

Na základe varovných príznakov môžeme včas odhaliť začiatok AD. Medzi tieto príznaky patria výpadky pamäti, problémy s plánovaním a riešením problémov, problémy s dokončením bežných prác, dezorientácia v čase a priestore, problémy s hľadaním slov, strácanie vecí.[9]

3.1.5 Neurobiologické zmeny pri Alzheimerovej chorobe

AD súvisí so zmenami v hipokampe a v častiach mozgovej kôry, ktoré úzko súvisia s našou pamäťou a premýšľaním.[10]

AD je charakterizovaná stratou cholínergných neurónov a ich kortikálnych projekcií z nucleus basalis, ktoré súvisia s asociačnými oblasťami v prednom mozgu. Cholínergná synaptická funkcia je zvlášť citlivá na toxický peptid β-amyloid (Aβ) a stratu synaptických vezikúl. Postupné zhoršovanie hustej cholínergnej inervácie mozgovej kôry prispieva k výrazným kognitívnym a behaviorálnym poruchám pri AD. Choroba je spájaná aj so zníženou úrovňou neurotransmiterov ako je acetylcholín (ACh), cholínacetyltransferáza (ChAT) a acetylcholínesteráza (AChE).[11]

3.1.5.1 Makroskopické zmeny AD

So zvyšujúcim sa vekom človeka dochádza k znižovaniu hmotnosti aj veľkosti jeho mozgu. Už v minulosti ľudia dosahovali menšiu výšku ako ľudia narodení neskôr, čo súvisí s antropologickými premenami ľudstva. Terry a kol. štatisticky dokázali podstatný pokles hmotnosti mozgového tkaniva s narastajúcim vekom, obzvlášť po 55. roku života. Porovnávali pokles hmotnosti mozgu u ľudí, ktorí zomreli po 77. roku života, s ľuďmi, ktorí zomreli vo veku 20 - 49 rokov. Tento pokles bol až 18 %. S vekom klesá taktiež objem mozgu, ale aj hrúbka mozgovej kôry. Najviac je to pozorované vo frontálnej oblasti a najmenej v dolnej parietálnej oblasti kôry. Do 50 rokov sa zaznamenáva najväčší pokles sivej hmoty, neskôr dochádza k poklesu bielej hmoty. Naopak mozgové komory sa rozširujú. Celkový pokles hmotnosti mozgu sa môže znížiť až o 300 gramov.[7]

3.1.5.2 Mikroskopické zmeny AD

Medzi hlavné mikroneuropatologické znaky patria extraneuronálny β-amyloid a intraneuronálny τ-proteín. Uvedené depozity tvoria tzv. senilné plaky a neuronálne klbká.[3]

3.1.5.2.1 Senilné plaky

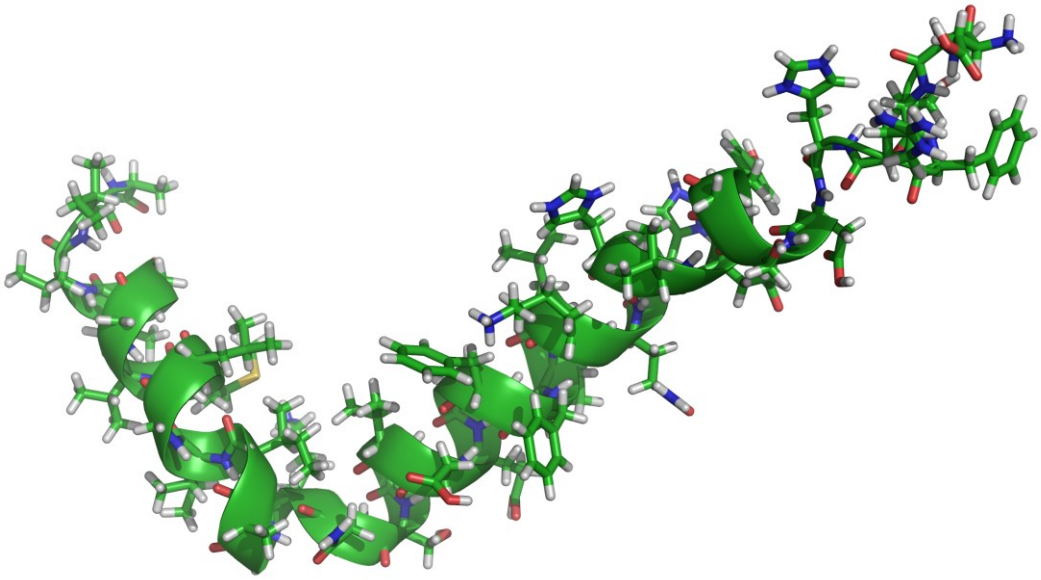
Charakteristickým znakom AD sú senilné alebo amyloidné plaky, ktoré sú nerozpustné a vytvárajú nepravidelný tvar. Senilné plaky sú tvorené patologicky vzniknutou bielkovinou, tzv. Aβ. Uvedená bielkovina vzniká štiepením transmembránového amyloidného prekurzorového proteínu (APP), ktorý sa nachádza vo väčšine mozgových buniek.[12]

Plaky sa vyskytujú v mozgu aj v priebehu normálneho starnutia organizmu, ale v prípade AD sú prítomné vo väčšom počte.[7]

V okolí senilných plakov môžeme pozorovať sterilný zápal. Pri tejto reakcii dochádza k stimulácii mikroglií a astrocytov, aktivuje sa COX-2 a po určitom čase sa začnú vylučovať cytokíny a kyslíkové radikály, ktoré následne spôsobia neurodegeneratívne premeny.[13]

3.1.5.2.2 β-Amyloid

Aβ je dôležitý biomarker AD, molekula bielkoviny tvorená z 39 – 43 aminokyselín (AMK) (Obr.1). Tento peptid odvodený od APP bol po prvýkrát izolovaný z CSF u pacientov s AD a pacientov s Downovým syndrómom. Hoci funkcia APP nebola doposiaľ vyriešená, na základe rozsiahlych výskumov máme znalosti, ako sa Aβ vytvára, následne degraduje v mozgu alebo transportuje na periféria. Konečné množstvo Aβ, ktoré sa akumuluje v amyloidných depozitách sa určuje na základe týchto faktorov.[14]



Obr. 1 struktura β-amyloidu[15]

Enzymatické zmeny zodpovedné za premenu APP na Aβ sú v súčasnosti známe. APP sa štiepi dvomi membránovými endoproteázami, a to β-sekretázou a γ-sekretázou. β-Sekretáza ako prvá štiepi APP na veľký derivát sAPPβ s N-terminálnym zakončením, ktorý obsahuje 99 AMK. Hneď dochádza k štiepeniu γ-sekretázou za vzniku Aβ s C-terminálnym zakončením. Štiepenie γ-sekretázou je nepresné, čo vedie k heterogenite peptidu. Vzniká peptid so 40 AMK a až následne peptid, ktorý obsahuje 42 AMK. Tieto nerozpustné častice sa spájajú do väčších celkov, stávajú sa toxickými a poškodzujú rôzne bunkové organely. Hydrofóbny a fibrilogenický Aβ42 má zvýšenú schopnosť agregácie a je hlavnou príčinou vzniku depozitov v mozgu.[14]

Zvýšená tvorba Aβ42 je dôsledkom mutácie génu pre APP na 21. chromozóme, génu kódujúcom presenilín 1 na 14. chromozóme, a taktiež génu, ktorý kóduje presenilín 2 na 1. chromozóme.[7]

3.1.5.2.3 Neuronálne klbká

Neurofibrinálne klbká sú nerozpustné vlákna vo vnútri mozgových buniek. Klbká sa skladajú hlavne z τ-proteínu, ktorý je súčasťou mikrotubúl a je kódovaný génom na 17. chromozóme. Mikrotubuly pomáhajú transportovať živiny a ďalšie dôležité látky z jednej časti nervovej bunky k druhej. τ-Proteín má dôležitú biologickú úlohu ako je stabilizácia mikrotubúl v neurónoch a ďalších bunkách. Stabilizácie mikrotubúl sa zúčastňuje defosforylovaná forma τ-proteínu. Na druhej strane, abnormálny τ-proteín nájdený u pacientov s AD, je fosforylovaná forma, ktorá vzniká na základe prevahy kináz nad fosfatázami. Pri tejto nerovnováhe nastáva agregácia abnormálneho τ-proteínu. Postupne sa vytvárajú vlákna, ktoré majú tvar dvojzávitnice. Na syntéze špirálovitých vlákien sa podieľajú aj excitačné AMK, ktoré majú škodlivé pôsobenie a zúčastňujú sa na degeneratívnom poškodení mozgu.[16]

3.1.5.2.4 Apolipoproteín E

ApoE je proteín, ktorý je tvorený 299 AMK. Podieľa sa na metabolizme lipidov, avšak zohráva úlohu aj pri neurodegeneratívnych ochoreniach. ApoE je kódovaný na 19q13.2 chromozóme a vyskytuje sa v troch alelách: ApoE2, ApoE3 a ApoE4, ktoré sa líšia navzájom v dvoch AMK.[17]

ApoE4 je rizikovým faktorom pre AD, hlavne u formy AD s oneskoreným nástupom. ApoE3 je najčastejšia forma u ľudí, ale vo vzťahu s AD je neutrálnou alelou. ApoE2 je alela asociovaná s nižším rizikom vývoja AD.[18]

ApoE sa spolu s Aβ ukladá do amyloidných plakov a viaže sa na neuronálne klbká.[19]

3.1.5.2.5 Oxidačný stres

Oxidačný stres je stav, pri ktorom dochádza k porušeniu rovnováhy medzi oxidantami a antioxidantami v prospech oxidantov. Pri tejto reakcii sa vo zvýšenej miere produkujú voľné radikály, ktoré sú schopné atakovať sacharidy, tuky, lipidy,

ale aj DNA. Dochádza k poškodeniu samotných buniek a tkanív. Mnoho ochorení je sprevádzaných nadprodukciou voľných radikálov, výnimkou nie sú ani neurodegeneratívne ochorenia ako je AD.[20]

Voľné radikály sú molekuly, ktoré majú jeden alebo viac nepárových elektrónov na vonkajších orbitách. Z uvedeného dôvodu sú vysokoreaktívne, a preto sa snažia dosiahnuť čo najviac stabilnú konfiguráciu prijatím ďalšieho elektrónu alebo vodíkového atómu.[20]

Voľné radikály ohrozujú fyziologické funkcie a životaschopnosť buniek poškodením biologických štruktúr. Pri poškodení sa vytvárajú sekundárne reaktívne zlúčeniny, ktoré môžu spôsobiť apoptózu alebo vytvorenie nekrotických ložísk. Najviac náchylné na oxidačné poškodenie je mozgové tkanivo. Kumulácia radikálových produktov tak vedie k jeho dysfunkcii až neurodegenerácii.[20]

Tvorbu voľných radikálov a následné poškodenie buniek obmedzuje rada antioxidačných reakcií ako napríklad procesy v mitochondriách na základe superoxiddismutázy a katalázy alebo glutationperoxidázy, prípadne funkcie vitamínov α-tokoferolu a askorbátu.[7]

3.1.5.2.6 Ďalšie pôsobenia

Familiárna podoba AD vzniká na základe mutácie génu, ktorý kóduje transmembránový proteín presenilín 1 (PS-1) na 14. chromozóme a presenilín 2 (PS-2) na 1. chromozóme.[6]

Pozmenené formy PS-1 a PS-2 pôsobia ako γ-sekretázy a odštepujú APP za vzniku tvorby Aβ.[21]

Zo zápalových činiteľov tu patrí interleukín-1 (IL-1) a interleukín-6 (IL-6). IL-1 zvyšuje syntézu Aβ, zvyšuje syntézu α 1-antichymotrypsínu, tromboplastínu, C3 zložky komplementu a ApoE3. Dochádza tak k zvýšenej tvorbe amyloidu a senilných plakov.

V ľudskom mozgu s AD je preukázaná prítomnosť zápalového mediátora IL-6, zatiaľ čo u ľudí s klinicky normálnym starnutím mozgu sa IL-6 nenachádza.[7]

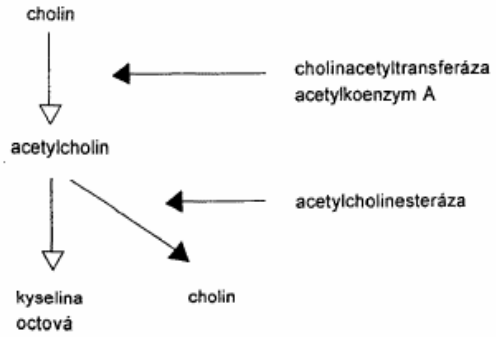
3.1.6 Farmakoterapia Alzheimerovej choroby

V súčasnosti AD nie je vyliečiteľná choroba, ale správnou liečbou a prístupom pacienta možno spomaliť jej rozvoj a zlepšiť kvalitu života pacienta. Využívajú sa farmakologické a nefarmakologické liečebné postupy, najvhodnejšia je ich kombinácia.[1]

Hlavným princípom terapie je ovplyvniť acetylcholínergný a glutamátergný systém. Farmakoterapia zahrňuje liečivá, ktoré zvyšujú koncentráciu Ach v CNS s využitím u miernych až ťažkých foriem AD. U stredne závažných až závažných foriem AD sa uplatňujú liečivá, ktoré ovplyvňujú glutamátové receptory.[22]

3.1.6.1 Acetylcholín

Ach je neurotrasmiter, ktorý vzniká z cholínu za pomoci acetylkoenzýmu A a enzýmu ChAT. Ukladá sa do presynaptických častí neurónu a v prípade potreby sa uvoľňuje z vezikúl. Po uvoľnení sa v synaptickej štrbine rozkladá enzýmom AChE na cholín a kyselinu octovú (Obr.2). Cholín sa spätne vychytáva do presynaptickej časti neurónu a resyntetizuje sa na Ach.[21]



Obr. 2 metabolizmus acetylcholínu21

Ach sa viaže na nikotínové a muskarínové receptory. Nikotínové receptory, ionotropné, sú lokalizované v prednom mozgu a mozgovom kmeni. Muskarínové, metabotropné receptory spriahnuté s G-proteínom, sú lokalizované v CNS a VNS.[21]

3.1.6.2 Acetylcholínesteráza a butyrylcholínesteráza

Pri AD dochádza k poškodeniu acetylcholínergného systému, ktorý je potrebný pre mechanizmus pamäti. K jeho poškodeniu dochádza už v skorých štádiách ochorenia. Znižuje sa tvorba i uvoľňovanie Ach z presynaptických zakončení. Dochádza k menšej tvorbe enzýmu ChAT, znížený je aj cholínový uptake. Množstvo muskarínových receptorov sa nemení na rozdiel od nikotínových receptoroch, ktorých je menej. Po uvoľnení Ach do synaptickej štrbiny dochádza k jeho odbúravaniu AChE. V ľudskom mozgu boli zistené dva najdôležitejšie izoformy AChE označované ako G1 a G4. U zdravých ľudí prevláda forma G4, u pacientov s AD prevláda forma G1 a znižuje sa forma G4. Pri AD sa nadmerne tvorí enzým butyrycholínesteráza BuChE, ktoré sú u zdravých ľudí v minimálnych množstvách. BuChE odbúravajú Ach a zhoršujú acetylcholínergný prenos.[23]

BuChE je aktivovaná gliovými elementami v oblasti alzheimerových plakov a spôsobuje odburávanie Ach.[24]

V súčasnej terapii sa uplatňujú inhibítory cholínesteráz, ktoré blokujú odburávanie Ach. Niektoré inhibítory blokujú len AChE a iné odburávajú len BuChE. Od inhibítorov sa očakáva, že budú špecificky inhibovať mozgové formy AChE a nie periférne formy.[24]

Zlatým štandardom terapie AD sú inhibítory cholínesteráz (IChE) – donepezil, galanthamin a rivastigmin. Uvedené liečivá majú preukázaný terapeutický efekt u ľahkej a stredne ťažkej formy AD. Ich mechanizmom účinku je inhibícia enzýmu AChE, ktorý odbúrava Ach. Inhibíciou enzýmu zvýšime množstvo Ach, ktorý je potom schopný

viazať sa na svoje receptory. Užívaním IChE môžeme predĺžiť život pacienta aj o niekoľko rokov.[25]

Predpokladá sa, že inhibítory acetylcholínesterázy (IAChE) zasahujú do produkcie Aβ tým, že znižujú jeho tvorbu ovplyvňovaním enzýmu γ-sekretáz.[24]

Medzi prvé IChE patril tetrahydroaminoakridin – takrín, i keď jeho výsledky boli dostačujúce, ale z trhu bol stiahnutý kvôli hepatotoxicite.[24]

3.1.6.2.1 Donepezil

Patrí medzi piperidínové deriváty a pôsobí ako reverzibilný inhibítor AChE. V súčasnosti je najviac využívaný vo svete, ale aj u nás. Prvý mesiac sa dávkuje 1× 5 mg denne, pri dobrom účinku sa titruje na 1× 10 mg denne. Jeho eliminačný polčas je približne 70 hodín, odbúrava sa v pečeni pomocou P450, ma málo liekových interakcií a nie je hepatotoxický.[24]

Donepezil je kontraindikovaný pri gastroduodenálnej vredovej chorobe a pri ťažkých poruchách srdca. Medzi najzákladnejšie nežiadúce účinky patrí nauzea, dyspepsie, nechutenstvo a môže dôjsť k spomaleniu srdcového rytmu.[23]

3.1.6.2.2 Rivastigmin

Karbamátový derivát, ktorý patrí k ďalším najpoužívanejším inhibítorom AChE. Pôsobí pseudoireverzibilne, inhibuje nielen AChE, ale aj BuChE. Jeho dávka sa postupne titruje každé dva týždne od 2× 1,5mg až po maximálnu dávku 2× 6mg denne. Eliminačný polčas sú 2 hodiny a nemá významné riziko metabolických interakcií.[24]

Rivastigmin má rovnaké kontraindikácie a gastrointestinálne nežiadúce účinky ako donepezil, ale na rozdiel od donepezilu ho môžeme podávať perorálne alebo vo forme náplastí.[23]

3.1.6.2.3 Galanthamin

Je to alkaloid, ktorý sa izoluje z niektorých druhov snežienok a narcisov. Pôsobí duálnym efektom. Reverzibilne inhibuje AChE, ale taktiež allostericky moduluje presynaptické i postsynaptické nikotínové receptory. Dávkovanie sa titruje po mesiaci. Začína sa 2× 4 mg denne až po maximálnu dávku 2× 12 mg denne. Eliminačný polčas má 5 – 7 hodín. Kontraindikácie a nežiadúce účinky sú rovnaké ako u donepezilu a rivastigminu.[24]

3.1.6.2.4 Huperzin A

Huperzin A bol v roku 1986 izolovaný z *Huperzia serrata* Thunb. čeľaď Huperziaceae. Je to alkaloid, ktorý je silným reverzibilným inhibítorom AChE a využíva sa pri terapii AD v Číne. Má neuroprotektívne účinky, zlepšuje pamäť, zlepšuje učenie a znižuje úzkosť. Má slabšie nežiadúce účinky ako galanthamin a dlhšie pôsobenie ako rivastigmin či donepezil. Rýchlejšie prestupuje cez hematoencefalickú bariéru a má lepšiu biologickú dostupnosť pri perorálnom podaní. Prebiehajú štúdie, ktoré skúmajú vplyv Huperzin A na terapiu schizofrénie a závislosti na návykových látkach.[26]

3.1.6.3 Antagonisti NMDA-receptorov

Pri ťažších formách AD je poškodený glutamátergný systém. Dochádza k nadmernému uvoľňovaniu glutamátu a k jeho zníženému spätnému vychytávaniu v určitých oblastiach mozgu, ktoré majú význam pre pamäť. Pri ťažších formách sa používa slabší inhibítor NMDA receptoru, a to memantin.[23]

NMDA receptory sú ionotropné excitačné receptory, ktoré sú spojené s Ca^{++} ionovými kanálmi a otvárajú ich. Na receptoroch prebieha dôležitý dej pre pamäť. Pri neurodegeneratívnych ochoreniach ako je AD, vaskulárnych i posttraumatických zmenách CNS dochádza k nadmernému uvoľňovaniu excitačných AMK (glutamát, aspartát) a nadmernému podráždeniu NMDA receptorov. Dochádza k nadmernému influxu – vstupu Ca do neurónov, ďalej sa aktivujú enzýmy ako sú proteinkinázy a fosfatázy, ktoré spôsobia zmeny a usporiadanie proteínov. Odkryje sa gén pre apoptózu a neuróny začnú zanikať. Týmto nežiadúcim procesom bránia inhibítory NMDA receptorov.[27]

3.1.6.3.1 Memantin

Nekompetitívny antagonista NMDA receptorov, ktorý blokuje ich hyperaktiváciu a zvýšenú apoptózu neurónov. Je vhodný v monoterapii, ale aj v kombinácii s donepezilom. Memantin je kontraindikovaný pri psychotických príznakoch, ale pri jeho užívaní môže dôjsť k prechodnému výskytu psychotických príznakov. Dávka sa titruje postupne každý týždeň od 5 mg na deň až na 20 mg na deň.[23]

3.1.6.4 Doplnková liečba

Doplnková liečba sa využíva pri terapii ľahkých foriem AD. Ich použitie nie je jednoznačne založené na dôkazoch – Evidence-Based Medicine. V týchto prípadoch si musíme uvedomiť, že pacient nedostáva dostatočne účinnú liečbu.[27]

3.1.6.4.1 *Ginkgo biloba* L.

Medzi najviac predávané doplnkové prípravky patrí štandardizovaný extrakt z *Ginkgo biloba* L. Za štandardizovaný prípravok extraktu *Ginkgo biloba* L. sa považuje EGb 761. Uvedený extrakt obsahuje 24 % flavonoidných glykozidov, 6 % terpénových laktónov a menej ako 5 ppm ginkolických kyselín.[28]

Množstvo štúdií preukázalo neuroprotektívne účinky EGb 761 a účinnosť v liečbe a prevencii neurodegeneratívnych ochorení. Má antioxidačné účinky, protektívny efekt na mitochondrie, antiapoptotický efekt, protizápalový efekt, zabraňuje agregácii Aβ. Podávanie extraktu nie je vhodné pacientom užívajúcim warfarín, kyselinu acetylsalicylovú a iné antiagregačné látky z dôvodu zvýšeného krvácania.[29]

3.1.6.4.2 Nootropiká

U AD dochádza k zníženému neuronálnemu metabolizmu, hlavne metabolizmu glukózy a bunkovej proteosyntézy. Používajú sa nootropiká, ktoré zvyšujú mozgový metabolizmus, zvyšujú odolnosť nervového tkaniva k hypoxii, zvyšujú metabolizmus glukózy a proteosyntézu. Zlepšujú kognitívne procesy ako učenie a pamäť. Medzi nootropiká patrí piracetam a pyritinol, ktoré však nepreukázali dostatočné účinky ani pri zvýšených dávkach. Pyritinol má taktiež účinok aj na odstránenie voľných radikálov.[7]

3.1.6.4.3 Voľné kyslíkové radikály

Pri AD majú uplatnenie aj voľné kyslíkové radikály, ktoré za normálnych okolností v tele vznikajú, ale zároveň sú aj likvidované za pomoci enzýmov ako je kataláza, superoxiddismutáza a glutationperoxidáza. U AD dochádza k nepomeru medzi ich vznikom a zánikom, v prospech ich vzniku. K ich zániku sa používajú látky tzv. „scavengery“ - vychytávače voľných radikálov. Medzi takéto látky patrí vitamín E (α-tokoferol), vitamín C (kyselina askorbová), retinol, ale aj pyritinol a extrakt *Ginkgo biloba* L.[30]

3.1.6.4.4 Protizápalové látky a estrogény

V okolí senilných plakov dochádza k tvorbe sterilného zápalu. Štúdia McGeera preukázala, že podávaním protizápalových látok pôsobíme ochranne pred vznikom AD. Tieto nesteroidné antiflogistiká musia prechádzať hematoencefalickou bariérou, aby mohli inhibovať COX-1 a COX-2 v mieste zápalu. Iné výsledky štúdií preukázali ochranný účinok, u iných štúdií boli výsledky negatívne.[31]

Estrogény zlepšujú prietok krvi v mozgových tepnách. Predpokladalo sa, že preventívne podávanie estrogénov u žien pôsobí protektívne proti AD. Zistilo sa, že u žien v menopauze, u ktorých sa nepodával estrogén bol vyšší výskyt AD než u žien, ktoré mali nasadenú estrogénnu liečbu.[7]

3.1.6.5 Nové perspektívy liečby

V súčasnosti prebieha okolo 700 rôznych klinických štúdií, ktoré sú zamerané na liečbu AD. Na základe znalostí o patogenéze AD došlo k hľadaniu nových terapeutických postupov. Skúma sa široká škála látok s rozdielnym mechanizmom, či už je to ovplyvňovanie ukladania Aβ, blokácia agregácie τ-proteínu, imunizácia, či inhibícia prolyloligopeptidázy.[32]

3.1.6.5.1 Antiamyloidná terapia

Za primárny znak AD je pokladané ukladanie Aβ v mozgu pacienta. Výskum sa snažil zamerať na kaskádu vzniku Aβ. V roku 1999 sa snažili zabrániť vzniku neurotických plakov, a to vakcináciou. Vakcína zabraňovala vzniku neurotických plakov, ovplyvňovala aj kognitívnu dysfunkciu, ale jej testovanie muselo byť ukončené z dôvodu výskytu nežiadúcich účinkov, kedy sa rozvinula postvakcinačná encefalitída.[33]

Ďalším ovplyvňovaním bola inhibícia enzýmu, ktorý bol zodpovedný za produkciu Aβ. Inhibítory β-sekretázy a modulátory γ-sekretázy sa vyznačovali dobrou toleranciou a perorálnou aplikáciou, ale nakoniec nepreukázali zlepšenie

pamäti a kognitívnych funkcií. Látky fenserin a deferoxamin mali redukovať APP, z ktorého vzniká Aβ, ale nepreukázal sa žiadny klinický efekt.[32]

3.1.6.5.2 Inhibítory τ-agregácie

Inhibítory τ-agregácie (TAIs) sú látky, ktoré zabraňujú agregácii τ -proteínu. Výskum začal už v roku 1990. Najviac klinicky pokročilý TAIs je AL-108, ktorý interaguje s mikrotubulami, znižuje τ-hyperfosforyláciu a zvyšuje hladinu rozpustných τ-proteínov. Nedávno dokončená štúdia dokázala, že je bezpečný a dobre tolerovaný v dávke 15 mg dvakrát denne. V klinických skúškach prebieha intravenózna formulácia AL-208 pre mierne kognitívne poruchy. V randomizovaných štúdiách sa skúšal aj methylthioniniumchlorid, ktorý sa podával trikrát denne v dávke 60 mg. Zistilo sa, že zlúčenina zabraňuje oligomerizácii a agregácii τ-proteínu, rozpúšťa ho na menšie fragmenty, ktoré sú eliminované.[34]

3.1.6.5.3 Pasívna a aktívna imunizácia

V súčasnosti sú látky pre aktívnu a pasívnu imunizáciu v klinickom výskume. Pasívna imunoterapia zachováva umelé hladiny protilátok proti Aβ. Podávajú sa v infúziách a ich efektivita je najmä v skorých štádiách AD, kedy zabraňujú akumulácii Aβ.[32]

V klinickej fáze sú gantenerumab a krenezumab. Bapineuzumab je monoklonálna protilátka, ktorá rozpoznávala N-terminálny koniec amyloidu. Boli zistené menšie zmeny biomarkerov, ale žiadne zlepšenie klinických príznakov. Solanezumab je monoklonálna protilátka, ktorá rozpoznávala strednú časť amyloidu, ale mala len mierny efekt na kognitívne príznaky.[35]

3.1.6.5.4 Inhibícia prolyloligopeptidázy

POP je to enzým serínových peptidáz, ktorý štiepi malé hormóny peptidového charakteru, neuroaktívne peptidy a bunkové faktory.[36]

POP hydrolyzuje peptidové väzby na karboxylovom konci L-prolínu. Cytosolický enzým POP preukázal svoju úlohu na rade biologických procesov, ale jeho presná funkcia je stále neznáma. Experimentálne sa zisťoval jeho efekt v kognitívnych a duševných procesoch zapojením sa do signalizačnej dráhy inositol-fosfát a schopnosti metabolizovať bioaktívne peptidy.[37]

Významnú úlohu má nielen pri neurodegeneratívnych procesoch, ale aj v patologických procesoch ako sú poruchy príjmu potravy, poruchy nálad, vysoký krvný tlak a poruchy bunkového cyklu. Na základe zistenia zvrátiť stratu pamäti u zvieracích modelov došlo k zrýchlenému vývoju inhibítorov POP.[38]

Mozgová POP aktivita je spojená s poškodením neurónov a zúčastňuje sa na patogenéze AD.[39]

Okrem cholínergných neurónov mnoho ďalších neuropeptidov môže hrať úlohu pri kognitívnych funkciách ako je učenie a pamäť. Medzi tieto peptidy patrí vasopresín, neuronsin, oxytocín, substancia P a bradykinín. Ich spoločným znakom je citlivosť na enzým POP. Účinky POP pri poruchách pamäti sú rozporné. Niektoré zistenia naznačujú, že pokles aktivity POP je charakteristický pre generalizovaný proces neurodegenerácie, vrátane AD a demencie. Avšak pri AD zmeny v činnosti POP, ktoré sú závislé na oblasti mozgu, sú stále skúmané. Zníženie aktivity POP bolo pozorované v mozgovej kôre, zatiaľ čo v okcipitálnej kôre je aktivita POP zvýšená. U AD hladina vasopresínu a substancie P je znížená v oblastiach podieľajúcich sa na kognitívnych procesoch, a to v kortikálnej oblasti a hipokampe. Zistenia naznačujú, že POP aktivita a druhotné účinky na úrovni neuropeptidov by mohli predstavovať potenciálne terapeutický cieľ pre liečenie kognitívnych porúch. Bolo študovaných niekoľko inhibítorov POP u zvierat. Štúdie s potkanmi preukázali, že inhibítory POP zvyšujú účinky pamäti. Medzi tieto inhibítory patria JTP-4819 a S17092. Inhibítor JTP-4819 zlepšil výkon hipokampu lézií u potkanov. Inhibítor S 17092 bol bezpečne podávaný pacientom v klinických štúdiách s cieľom zlepšiť niektoré aspekty pamäti. Prvý účinný

inhibítor POP bol *Z*-Pro-prolinal. Mnoho ďalších inhibítorov bolo syntetizovaných alebo extrahovaných z mikroorganizmov a liečivých rastlín. Ich antiamnestické účinky boli študované u potkanov. V poslednej dobe je niekoľko sto inhibítorov POP predmetom aktívneho výskumu. Cieľom štúdie je zistiť, či účinná inhibícia mozgovej POP by zlepšila dlhodobú pamäť.[40]

3.1.6.5.5 Chemoterapeutiká

V roku 2010 bola v časopise Neurology publikovaná práca, ktorá sa zaoberala asociáciou AD a rakoviny. Na základe rozsiahlej kohortovej štúdie sa zistil výsledok, že pacienti, ktorí trpeli AD mali nižšiu pravdepodobnosť vzniku zhubného nádoru. A naopak, pacienti, ktorí trpeli rakovinou mali nižšie riziko vzniku AD. To platí hlavne pre pacientov, ktorí trpia AD a nie pre pacientov s vaskulárnou demenciou. U pacientov s AD sa zistilo, že výskyt zhubného nádoru sa znižuje o 60 %. A u pacientov s rakovinou sa výskyt AD znižuje o 43 %, to platí len pre pacientov s AD bez vaskulárnej demencie. Proces neurodegenerácie a nádorového bujnenia riadia podobné signálne dráhy, ktoré po vychýlení do extrémnych polôh môžu byť výsledkom tejto asociácie. [41]

Ďalšia kohortová štúdia ukázala, že riziko rozvoja AD je výrazne znížené u pacientov liečených chemoterapiou v porovnaní u pacientov bez chemoterapie. Aj keď na druhej strane chemoterapia môže spôsobiť liekmi indukovanú demenciu. V štúdii na zvieratách je popísané, že chronické podávanie karmustínu výrazne obmedzuje amyloidné plaky. Liek ako paklitaxel, ktorý stabilizuje mikrotubuly a inhibuje mitózu, môže zmierňovať fosforyláciu τ-proteínu.[42]

3.2 *Papaver rhoeas* L. (Papaveracea)

3.2.1 Taxonomické zaradenie

Ríša: Plantae

Podríša: Cormobionta

Oddelenie: Magnoliophyta

Trieda: Magnoliopsida

Podtrieda: Magnoliidae

Rad: Papaverales

Čeľaď: Papaveraceae

Rod: *Papaver* - mak

Druh: *Papaver rhoeas* L. – mak vlčí[43]

***Obr. 3 Papaver rhoeas* L.[44]**

3.2.2 Čeľaď Papaveraceae

Čeľaď obsahuje cez 100 druhov maku. Najdôležitejší druh predstavuje mak siaty (*Papaver somniferum* L.).[45] Rastliny patriace do čeľade Papaveraceae (makovité) sú jednoročné až trvalé byliny. Čeľaď má typické mliečnice, súbor plodolistov, ktoré sú zrastené v jednom kvete a vytvárajú parakarpium, a jednopuzdrový semenník. Kvety sú jednotlivé a striedavé.[46] Plodom je podlhovastá alebo guľovitá tobolka s početnými semenami. Pri poranení dochádza k uvoľneniu mliečnej šťavy tzv. latexu, ktorý obsahuje alkaloidy. Vyskytujú sa v miernom až studenom pásme na severnej pologuli.[47]

3.2.3 Morfologický popis rastliny *Papaver rhoeas* L.

Mak vlčí je jednoročná bylina, ktorá dorastá do výšky až 80 cm. Má jednoduchú alebo len slabo vetvenú lodyhu, ktorá je v hornej časti štetinatá a nesie striedavo prisadlé a perovité listy. Listy sú podlhovastého tvaru. Dolné listy sú stopkaté, ktoré sú perovité a okraje listov sú ostro zúbkaté. Horné listy nasadajú na stonku.[48] Na koncoch stoniek sú kvety, ktoré sú pred rozkvitnutím zohnuté. Korunné plátky sa nachádzajú za dvomi štetinatými kališnými lístkami, ktoré po rozkvitnutí kvetu opadávajú. Mak vlčí má typické štyri veľké korunné plátky červenej farby, ktoré sú široké, na báze majú čiernu škvrnu a navzájom sa prekrývajú. Na rozdiel od iných druhov, mak má čierno-fialové nitkovité tyčinky.[49]

Plodom je sedempuzdrová až deväťpuzdrová tobolka tzv. makovica. Má okrúhly až elipsoidný tvar. Na vrchole je zbytok blizny, ktorý môže byť šesťlaločný až osemnásťlaločný. V čase zrelosti vznikajú otvory, cez ktoré vypadávajú semená pri nárazoch. Tobolka je približne 15 mm dlhá a 7 mm široká a má svetlohnedú až sivohnedú farbu. Jeden plod obsahuje približne päťsto semien. Semená majú obličkovitý tvar a matný povrch. Priemerné semená sú 0,8 mm dlhé a 0,5 mm široké.[50]

3.2.4 Zber a sušenie *Papaver rhoeas* L.

Mak vlčí sa nachádza v teplejších oblastiach Európy. Rozšíril sa v miernom podnebnom pásme po celom svete. Je to burina, ktorá sa nachádza na poliach, v okolí smetísk, na neobrobených zemiach a iných obnažených pôdach.[49] Vyhovujú mu hlavne pôdy výživné, hlinité, zásadité až mierne kyslé.[51] Mak je druh buriny, ktorý je odolný voči látkam ako napríklad výfukové plyny znečisťujúce ovzdušie.[52] Rozkvitá od druhej polovice mája až do konca júla. Počas suchého obdobia sa zbierajú červené korunné plátky (*Flos papaveris*). Po rozkvitnutí sa plátky chytia v hornej časti a odtrhnú sa všetky naraz smerom hore. Sušia sa porozkladané v tieni alebo umelým teplom do 35 stupňov Celzia. Po skončení sušenia droga musí mať pôvodnú farbu, charakteristický pach a horkú slizovitú chuť.[49]

3.2.5 Účinky *Papaver rhoeas* L.

Kvety maku majú dlhú históriu liečebného používania, hlavne u starších ľudí a detí. Používal sa ako liek proti bolestiam, pri terapii dráždivého kašľa, ale aj pri znižovaniu nadmernej nervovej aktivity. Na rozdiel od maku siateho (*Papaver somniferum* L.) je nenávykový. Obsahuje alkaloidy, ktoré sú stále predmetom vyšetrovania. Kvety a okvetné lístky majú analgetické, zvláčňujúce, expektoračné, hypnotické, mierne narkotické a sedatívne účinky. Vo forme infúzií sa používa v terapii bronchiálnych ťažkostí, v terapii kašľa, nespavosti, zlého trávenia, nervových porúch a miernych bolestiach. Kvety sa používajú tiež pri liečbe žltačky. Rastlina má protirakovinové účinky.[53]

Listy rastliny *P.rhoeas* obsahujú významné nutričné látky. Vďaka prítomnosti vlákniny, vitamínu C, vitamínu E (tokoferol), β-karoténu, draslíka, vápnika a polyfenolov môžu priaznivo ovplyvňovať ľudské zdravie. Zo štúdií sa zistilo, že je v nich prítomná adekvátna koncentrácia antioxidačných látok.[54]

Pri príprave čaju proti kašľu sa mieša spolu aj s plodom feniklu, s koreňom kostihoja, kvetom slezu a listom podbeľa. Mak môže byť aj súčasťou sedatívnej čajoviny spolu s listom medovky, koreňom valeriány, kvetom hlohu a myšieho chvostu.[55]

Z kvetov sa získava červené farbivo, ktoré je prchavé. Sirup vyrobený z okvetných lístkov slúži ako farbivo do čajových zmesí, ale aj vín.[53]

V iránskej ľudovej medicíne používali mak pri zápalových ochoreniach, hnačkách, nespavosti, na tlmenie bolesti, pri terapii kašľa a na zníženie abstinenčných príznakov po opiátoch. Pri črevných a močových podráždeniach slúžil na ukľudnenie.[56]

3.2.6 Otrava spôsobená *Papaver rhoeas* L.

Najčastejší druh maku, ktorý môžeme vidieť na lúkach a poliach je *P. rhoeas*. Tento druh je jedovatý pre zvieratá. Pre ľudí nie je jedovatý až na jeho kvety. Za jedovaté účinky je zodpovedný alkaloid rhoeadin. Alkaloidy patria medzi najčastejšie toxické látky, ktoré sú rozpustné v organických rozpúšťadlách. Rastlinné alkaloidy majú fyziologické účinky na metabolizmus živých organizmov. Ich konzumácia môže spôsobiť poruchy CNS alebo poruchy pečene, a môže spôsobiť náhlu smrť. Orálna konzumácia môže spôsobiť príznaky ako je zvracanie, nevoľnosť, únava a vyčerpanie. V štúdii Kocak S. a kol. sa zaoberali tromi prípadmi otravy, ktoré boli spôsobené konzumáciou *P. rhoeas*. Pri otravách sa prejavili hlavne vedľajšie účinky na CNS. Na základe prípadov uvedených v štúdii, sa zistilo, že mladší pacienti sú citlivejší a je dôležitá opatrnosť. U pacientov, ktorí sú hospitalizovaní z dôvodu otravy, sa vykonáva výplach žalúdka, podáva sa aktívne uhlie a dôležitá je hydratácia. Pacienti sú pozorovaní ďalších 24 hodín.[57]

3.2.7 Obsahové látky *Papaver rhoeas* L.

Hlavnú obsahovú látku *P.rhoeas* L. predstavuje alkaloid (+)-rhoeadin. Patria tu aj ďalšie alkaloidy v menších množstvách allokryptopin, kryptopin, protopin, koulteropin, berberin, koptisin, (–)-sinaktin, (±)-stylopin, (+)-isokorydin, (+)-remerin a (+)-rhoeagenin.[58]

Okrem alkaloidov obsahuje taktiež antokyanové farbivá cyanin a mekocyanin, slizové látky, triesloviny a kyselinu mekonovú.[51]

3.2.8 Isochinolínové alkaloidy

Isochinolínové alkaloidy sú veľká skupina látok sekundárneho metabolizmu. Skupina zahŕňa široký rozsah štrukturálnych látok na rozdiel od iných skupín alkaloidov.[59]

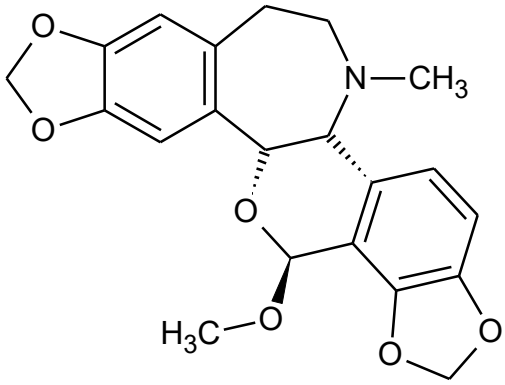
Aminokyselina tyrozín je prekurzor syntézy isochinolínových alkaloidov. Prekurzorom AMK tyrozínu je fenylalanín.[60]

3.2.8.1 Rhoeadinový typ

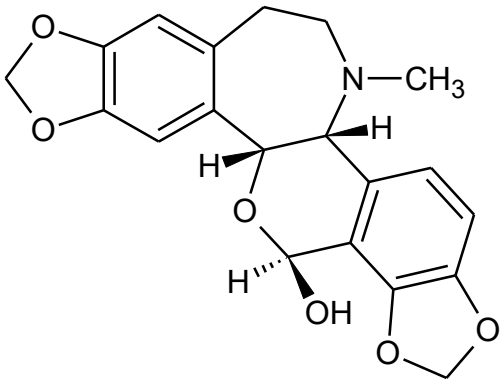
Alkaloidy rhoeadinového typu patria do veľkej skupiny isochinolínových alkaloidov. Biogeneticky sú príbuzné isochinolínovým alkaloidom, ale zo štrukturálneho hľadiska sa líšia. Alkaloid (+)-rhoeadin bol izolovaný z *P.rhoeas v roku 1865.* Existuje približne 25 druhov alkaloidov rhoeadinu rastlinného pôvodu, ktoré sa vyskytujú v rode *Papaver*. V malých množstvách boli alkaloidy preukázané v rode *Bocconia frutescens* L. a v niekoľkých himalájskych druhoch *Meconopsis*. Rhoeadinové alkaloidy sú rozšírené v rode *Papaver*, ale nie sú prítomné vo všetkých druhoch rastlín tohto rodu. Nachádzajú sa v sekcii *Orthorhoeades*, *Argemonerhoeades*, v niektorých zo sekcií *Pilos* a *Glauca* a v *Papaver somniferum*. Medzi rhoeadinové alkaloidy patria aj (+)-alpinigenin, alpinin, epialpinin, (+)-epiglaudin, glaukamin, (+)-glaudin,

(+)-isorhoeadin, (+)-oreodin, (+)-oreogenin, (+)-isorhoeagenin, (+)-isorhoeagenin-*D*-glukosid, *N*-methylporphyroxigenin, papaverrubin A-H, (+)-rhoeadin a (+)-rhoeagenin.[61]

Alkaloid (+)-rhoeadin vyizolovaný z kvetov maku vlčieho má mierne sedatívne a antitusické účinky.[62]



(+)-rhoeadin



(+)-rheagenin

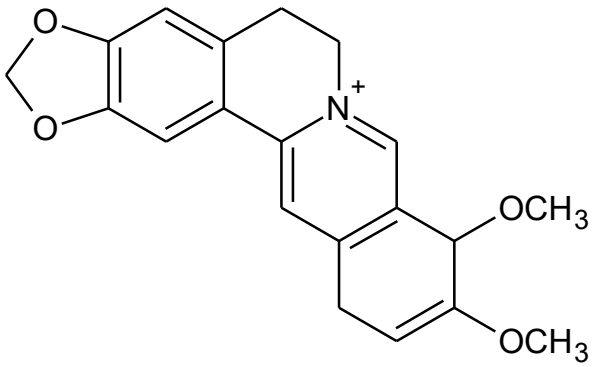
Obr. 4 Rhoeadínové alkaloidy

3.2.8.2 Protoberberínový typ

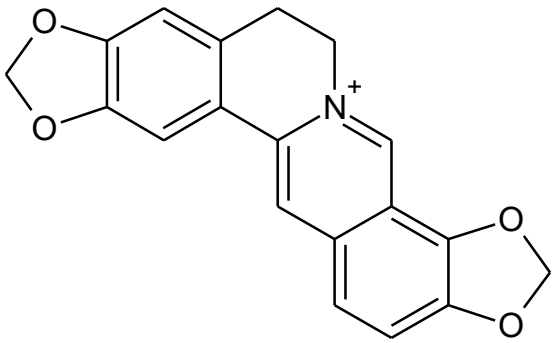
Protoberberíny sú modifikované benzyltetrahydroizochinolínové alkaloidy. Prekurzorom protoberberínov je (S)-retikulín. Počas reakcie z (S)-retikulínu vzniká (S)-skulerín, ktorý je dôležitým metabolitom pre ďalšie biosyntetické pochody. Berberínový typ alkaloidov je prítomný v čeľadiach dračovité (*Berberidaceae)*, makovité (*Papaveraceae)*, rutovité (*Rutaceae)*, iskerníkovité (*Ranunculaceae) a zemedymovité (Fumariaceae)*.[63] Z maku vlčieho bol vyizolovaný hlavný alkaloid berberínového typu, a to berberín. Vo veľkom množstve štúdií, berberin preukázal množstvo biologických aktivít. Základom jeho využitia v modernej medicíne je terapia bakteriálnych hnačiek, hypercholesterolémie, rôznych zápalov a neurodegeneratívnych ochorení. Berberín experimentálne preukázal schopnosť potláčať rast nádorových buniek u rakoviny prostaty, prsníka, podžalúdkovej žľazy, ale aj leukémie. V čínskej

medicíne je rozšírené jeho používanie pri liečbe zhubného bujnenia.[64] Zistili sa aj antidiabetické účinky berberínu, ako je znižovanie hyperglykémie, polyúrie a polyfágie. U liečivých rastlín obsahujúcich berberín sa predpokladá, že sú vhodné k fytoterapeutickému používaniu spolu so štandardnou liečbou pri metabolickom syndróme a pri prevencii diabetes mellitus 2. typu.[65]

Ďalším berberínovým alkaloidom je koptisin, ktorý vykazuje inhibičné účinky na produkciu NO, má protikŕčové účinky, antimykotické a antioxidačné účinky. Koptisin silne inhibuje produkciu prozápalových mediátorov NO, IL-1β, IL-6. Protizápalový koptisin sa môže preto využívať pri prevencii a liečbe zápalových ochorení.[66] Iné štúdie ukázali, že koptisin je dobrým kandidátom pre prevenciu chorôb s obezitou pomocou LPS/TLR-4-sprostredkovanej signálnej dráhy.[67] Koptisin výrazne inhibuje proliferáciu buniek osteosarkómu a rast nádoru.[68] Alkaloidu (–)-sinaktinu sú pripisované antibakteriálne a antivirotické účinky.[69] Alkaloid (±)-stylopin má protizápalové účinky tým, že potláča tvorbu NO, PGE2, TNF-α, IL-113 a IL-6.[70]

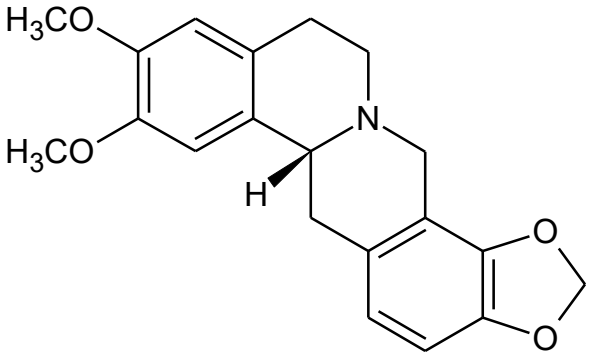


berberin

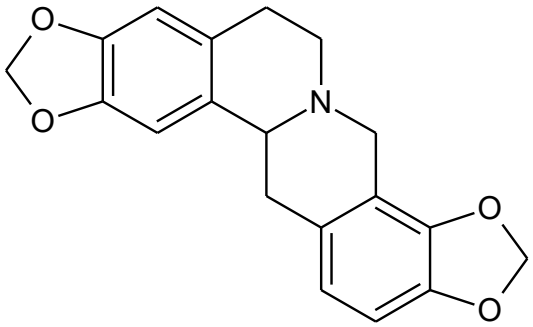


koptisin

Obr. 5 Protoberberínové alkaloidy



(–)-sinaktin



(±)-stylopin

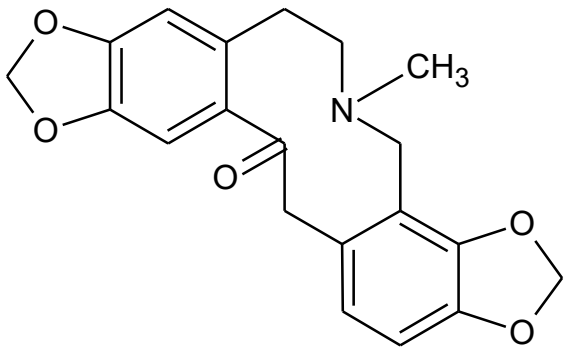
Obr. 5 Protoberberínové alkaloidy (pokračovanie)

3.2.8.3 Protopínový typ

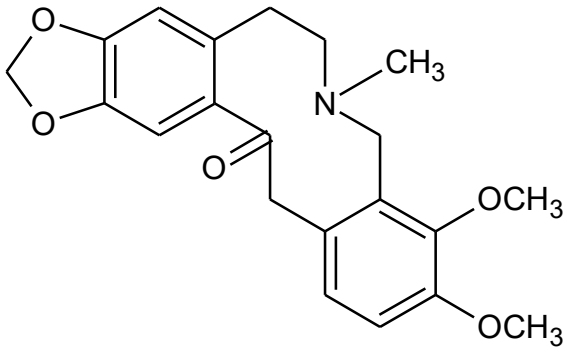
Protopínový typ vzniká z protoberberínového (S)-skulerínu.[63] Ide o skupinu alkaloidov, ktorá je veľmi málo zastúpená. Obsahuje približne 16 zástupcov alkaloidov, ktoré sú v rastlinách často prítomné spolu s inými alkaloidmi. Vyskytujú sa hlavne v čeľadiach makovité (*Papaveraceae*), zemedymovité (*Fumariaceae*), dračovité (*Berberidaceae*), iskerníkovité (*Ranunculaceae*) a rutovité (*Rutaceae*). Patria tu alkaloidy, ktoré sú opticky neaktívne.[71] Najznámejším alkaloidom tejto skupiny, a taktiež nachádzajúcim sa v maku vlčom je protopin. Protopin je často v kombinácii spolu s alkaloidom allokryptopin, kryptopin a ďalšími.[72]

Protopin má hematoprotektívne[73], antiagregačné, protizápalové[74], antioxidačné, anticholínergné a GABA-ergné účinky.[75] Allokryptopin sa ukázal ako antiarytmikum. [76]

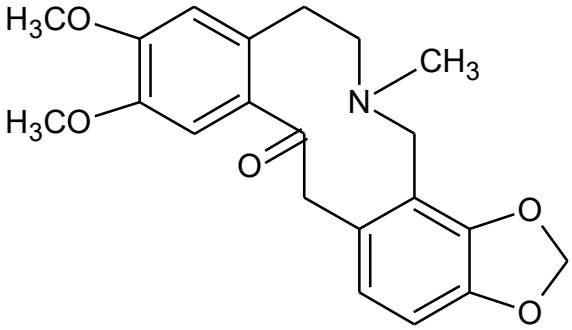
Z tureckého druhu maku vlčieho bol vyizolovaný aj protopínový alkaloid kulteropin, ktorý bol považovaný ze jedinečný alkaloid druhu *Romneya coulteri* Harv.[58]



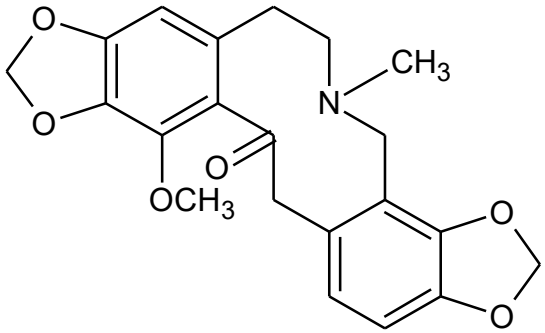
protopin



allokryptopin



kryptopin



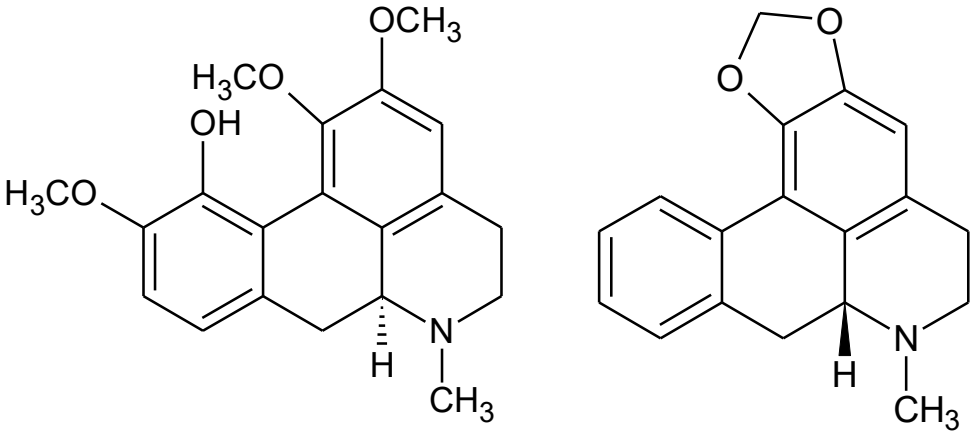
kulteropin

Obr. 6 Protopínové alkaloidy

3.2.8.4 Aporfínový typ

Ďalšia skupina alkaloidov, ktorá vzniká z (S)-retikulínu.[63] Aporfínové alkaloidy nájdeme vo viac než 100 rodoch rastlín. Majú dopamínergné, antioxidačné, antiagregačné a protinádorové vlastnosti. Vzhľadom k ich biologickým vlastnostiam sú predmetom výskumu liečiv s protinádorovou aktivitou. Z maku vlčieho boli vyizolované alkaloidy (+)-isokorydin a (+)-remerin. (+)-Isokorydin inhibuje proliferáciu buniek u hepatocelulárného karcinómu.[77] Alkaloid (+)-remerin pôsobí ako vazodilatans,

antihelmintikum, antimykotikum, proti plasmódiám a antibakteriálne proti G^+ baktériám vrátane *Bacillus cereus, Micrococcus sp.* a *Staphylococcus aureus*.[78]



(+)-isokorydin (+)-remerin

Obr. 7 Aporfínové alkaloidy

4. Experimentálna časť

4.1 Materiál a vybavenie

4.1.1 Rozpúšťadlá a chemikálie

- ethanol 95 %, denaturovaný methanolom, č. (Penta a.s., Ing. Švec) (EtOH)
- chloroform p.a. (Penta a.s., Ing. Švec) ($CHCl_3$)
- diethylether č. (LachNer) (Et_2O)
- destilovaná voda (H_2O)
- kyselina chlorovodíková 35 %, p.a. (Lachema) (HCl)
- lekársky benzín liekopisnej kvality ČL 2009 (Penta a.s., Ing. Švec) (LB)
- cyklohexan p.a. (Penta a.s., Ing. Švec) (C_6H_{12})
- diethylamin p.a. (LachNer) (Et_2NH)
- toluen p.a. (Penta a.s., Ing. Švec) ($C_6H_5CH_3$)

4.1.2 Pomocné látky

- uhličitan sodný 10 % roztok (w/w)
- kyselina chlorovodíková 2 % (w/w)
- kremelina Celite C 535 John´s Manville (Sigma-Aldrich)

4.1.3 Detekčné činidla

- *Dragendorffovo činidlo* – používa sa na detekciu alkaloidov a zlúčenín, ktoré vo svojej štruktúre obsahujú viazaný dusík. Činidlo sa skladá z roztoku A a z roztoku B v pomere 1:1. **Roztok A** vzniká rozpustením 1,7 g dusičnanu bizmutitého zásaditého a 20 g kyseliny vínnej v 80 ml vody. **Roztok B** vzniká rozpustením 16 g jodidu draselného v 40 ml vody.

- Mayerovo činidlo – používa sa na zistenie prítomnosti alkaloidov v organickom rozpúšťadle. Činidlo vzniká rozpustením 1,36 g chloridu ortuťnatého a 5 g jodidu draselného v 100 ml vody. Po dôkladnom rozpustení zlúčenín a ich zmiešaní vzniká tetrajodortuťnatan draselný, ktorý reaguje s alkaloidmi.

4.1.4 Chromatografické adsorbenty

- Oxid hlinitý (Al_2O_3) desaktivovaný 6 % H_2O, veľkosť zŕn 50 – 200 µm, (ACROSS)
- Kieselgel SiO_2 60 F254, fa Merck, 20 × 20 cm, hliníkové fólie s vrstvou silikagélu pre TLC s hĺbkou vrstvy 0,2 mm (Merck)

4.1.5 Prístrojové vybavenie

- Vákuová odparka Büchi Rotavapor R-114 (Büchi, Flawil, Switzerland)
- Plynový chromatograf s hmotnostným detektorom Agilent Technologies 7890 A GC 5975 inert MSD (Agilent Technologies Santa Clara, California, USA)
- NMR Varian Iniova 500 (Varian, USA)
- Polarimeter P3000 (A. Krüss Optronic, Germany)
- Büchi Melting Point B-540 (Büchi, Flawil, Switzerland)

4.1.6 Sústavy na vyvíjanie

- C_6H_{12} + Et_2NH (9:1)
- LB + Et_2NH (97,5:2,5)

4.2 Všeobecné postupy práce

4.2.1 Príprava a čistenie rozpúšťadiel

Všetky rozpúšťadlá boli pred použitím prečistené destiláciou podľa laboratórnych zvyklostí a skladované v hnedých sklenených stojatkách za účelom ochrany pred svetlom.

4.2.2 Odparovanie extraktov a frakcií

Frakcie, ktoré sme získali pri stĺpcovej alebo preparatívnej chromatografii, sme odparovali pri 40°C vo vodnom kúpeli vo vákuovej odparke.

4.2.3 Sušenie a skladovanie frakcií a izolovaných čistých látok

Odparené frakcie a izolované chemicky čisté látky, ktoré sme získali, boli umiestnené do exsikátoru na minimálne 24 hodín, a tak boli uchovávané v chladničke pri 2 - 8°C.

4.2.4 Príprava dosiek pre preparatívnu tenkovrstevnú chromatografiu

Sklenené dosky s rozmermi 15 × 15 cm boli odmastené a očistené od nečistôt ethanolom a chloroformom. Na dosky sa naliala suspenzia silikagélu (6,5 g) a vody (22 ml). Dosky sa sušili po dobu minimálne 24 hodín pred ich použitím.

4.2.5 Chromatografické metódy

4.2.5.1 Stĺpcová chromatografia

Stĺpcová chromatografia prebiehala skokovou elúciou. Stĺpcovú chromatografiu sme pripravili naplnením kolóny adsorbentom (neutrálny oxid hlinitý - Al_2O_3 desaktivovaný 6 % H_2O, veľkosť zŕn 50 – 200 µm). Do pripravenej kolóny sme naniesli vzorku vo forme rozteru.

4.2.5.2 Tenkovrstevná chromatografia

Tenkovrstevná chromatografia nie je len na analýzu overenia prítomnosti určitej zlúčeniny alebo jej čistoty, ale pre separáciu sa používa aj preparatívna tenkovrstevná chromatografia. Vyvíjanie prebieha v rôzne veľkých komorách, ktoré sú nasýtené parami mobilnej fázy. Doba sýtenia komôr závisí na veľkosti komôr a na polarite používanej mobilnej fázy. Po skončení vyvíjania sledujeme škvrny pod UV lampou pri vlnovej dĺžke 254 nm a 366 nm. Na dôkaz prítomnosti alkaloidov sa použilo Dragendorffovo činidlo, ktoré v prítomnosti alkaloidov zafarbilo škvrny na oranžovú farbu.

4.2.6 Štruktúrna analýza

4.2.6.1 GC-MS analýza

Hmotnostné spektrá boli merané na plynovom chromatografe s hmotnostným detektorom Agilent Technologies 7890 A GC 5975 inert MSD v režime EI pri 70 eV. Separácia prebiehala na kolóne DP-5 MS (30 m × 0,25 mm × 0,25 µ, výrobca Agilent Technologies Santa Clara, CA, USA). Teplotný gradient bol nastavený od 100 °C rýchlosťou 15 °C/min do teploty 180 °C, ktorá bola udržiavaná 1 minútu. Ďalej teplota stúpala rýchlosťou 5 °C/min do teploty 300 °C a udržiavaná bola počas 40 minút. Teplota injektoru bola 280 °C, teplota detektoru 200 °C, rýchlosť prietoku nosného plynu hélia bola nastavená na 0,8 ml/min. Detekčné rozmedzie m/z 35 – 600. Injekcia prebehla v ,,split mode´´ v pomere 1:10 a bol nastrieknutý 1 µl alkaloidného roztoku (1 mg/ml). Jednotlivé alkaloidy boli identifikované na základe porovnávania ich MS spektier v NIST knihovni, v literatúre a so spektrami látok, ktoré boli izolované už skôr na Katedre farmaceutickej botaniky a ekológie FaF UK.

4.2.6.2 NMR analýza

NMR spektrá boli merané na spektrometre Varian Iniova 500. Pracovná frekvencia jadier bola ^{1}H 499,9 MHz, ^{13}C 125,7 MHz. Pre meranie spektra ^{13}C NMR bola

použitá 5 mm SW širokopásmová sonda. ^{1}H NMR spektrum bolo merané v inverznej 5 mm ID PFG sonde za použitia štandardných pulzných frekvencií. Hodnoty ^{1}H spektier sú vzťahujúce sa k inertnému štandardu hexamethyldisilanu (0,04 ppm) a hodnoty ^{13}C spektier sú vzťahujúce sa k signálu rozpúšťadla (76,99 ppm). Meranie sa realizovalo v deuterochloroforme pri teplote 25 °C.

4.2.6.3 Optická otáčavosť

Meranie optickej otáčavosti prebehlo zariadením Polarimeter P3000 (A. Krüss, Optronic, Germany) pri 25 °C v prostredí chloroformu.

4.2.6.4 Teplota topenia

Teplota topenia bola meraná v bodotávku Büchi Melting Point B-450. Na začiatok sa nastavila rýchlosť stúpania teploty 15 °C/min až do hodnoty o 10 °C nižšej než bola predpokladaná hodnota teploty topenia danej látky. Potom sa rast teploty spomalil na 0,5 °C/min až do teploty, ktorá bola o 10 °C vyššia než bola predpokladaná teplota topenia látky.

4.3 Izolácia alkaloidov

4.3.1 Pôvod rastlinného materiálu

Počas júna 2015 Dr. Jakubom Chlebkom bolo na poli pri Hradeckej univerzite nazbieraných celkovo 155 kg čerstvej vňate s nezrelými tobolkami. Verifikáciu previedol prof. L. Opletal. Sušenie vňatí prebiehalo pri teplote 40 °C. Sušením sa získalo 31,5 kg suchej drogy, ktorú následne Dr. Siatka rozdrobil na guľovom mlyne.

4.3.2 Príprava alkaloidného extraktu

Sušená vňať (31,5 kg) bola postupne extrahovaná po 350 g vriaceho 96 % ethanolu (2× 3 L) po 30 minútach. Spojené ethanolové extrakty boli prefiltrované cez vlizelín a odparené do 50 °C na vákuovej poloprevádzkovej odparke na objem 3 L. K celkovému objemu bola pridaná horúca voda (3 L) a odparil sa úplne ethanol. Suspenzia bola zahriatá na 70 °C, a potom bola pridaná 2 % HCl (1 L; pH~ 1.5). Vzniknutá suspenzia bola po ochladení na cca 30 °C nariedená pridaním 3 L vody a prefiltrovaná cez vlizelín. Filtrát bol následne premytý 1,5 L 0,1 % HCl a 2 L vody a získaný extrakt bol doplnený vodou na objem 15 L. Filtrát sa alkalizoval 10 % Na_2CO_3 (2,2 L; pH 9-10) a postupne sa vytrepal 5× 4 L $CHCl_3$. Po odparení spojených organických vrstiev sa získalo 45 g tmavohnedého viskózneho alkaloidného extraktu. Alkaloidný koncentrát bol rozpustený pridaním 2 % HCl (400 mL), objem bol vodou doplnený na 1 L a vzniknutá suspenzia bola prefiltrovaná cez vrstvu čistenej kremeliny. Vzniknutý filtrát bol alkalizovaný 10 % Na_2CO_3 (pH 9-10) a 5× vytrepaný 300 mL $CHCl_3$. Skúška s Meyerovým činidlom bola negatívna, ďalej sa nepokračovalo s vytrepávaním vodnej fázy. Tento proces prečisťovania extraktu bol ešte jedenkrát zopakovaný, celkovo sa získalo 17,9 kg tmavého čiernofialového alkaloidného extraktu.

4.3.3 Stĺpcová chromatografia alkaloidného extraktu

a) **Príprava rozteru**: 17,9 g alkaloidného extraktu sa rozpustilo v $CHCl_3$ a zmiešalo sa so 72 g neutrálneho Al_2O_3 (50 – 200 µm, Across), a vo vodnom kúpeli za stáleho miešania bol $CHCl_3$ odparený do sucha.

b) **Parametre kolóny**

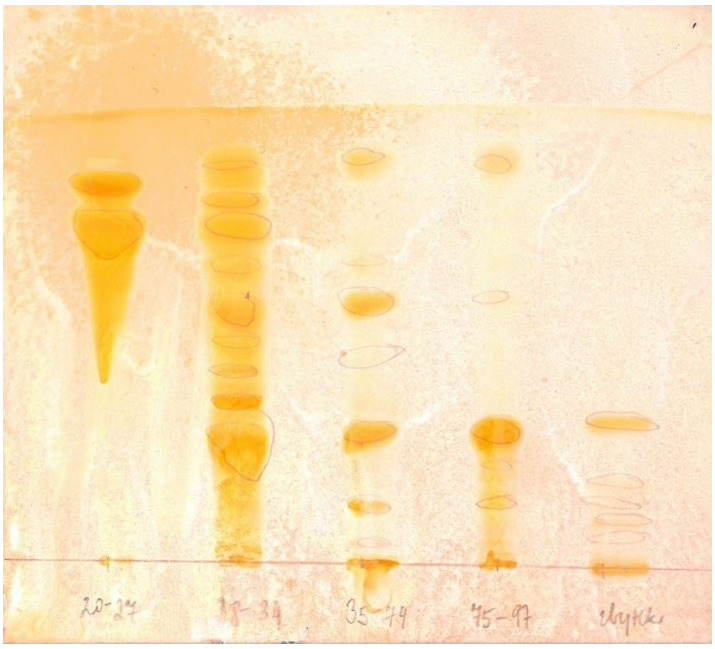
Tabuľka č. 1 Parametre kolóny

Adsorbent	neutrálny Al_2O_3 (1140 g; 50 – 200 µm, Across) deaktivovaný prídavkom 6 % vody
Vrstva s extraktom	66 cm
Vrstva bez rozteru	61 cm
Priemer kolóny	4,7 cm
Mŕtvy objem	810 ml
Objem frakcie	250 ml
Doba toku	12,5 ml/min
Kontrolná TLC	SiO_2 60 F 254 Merck, sústavy: chex + Et_2NH 9:1, To + Et_2NH 9:1

Separácia alkaloidov prebiehala stupňovitou elúciou zvyšovaním polarity mobilnej fázy s lekárskym benzínom (LB) a chloroformom (1:1, 2:3, 3:7, 3:17), chloroformom (100 %), chloroformom a ethanolom (1:1), nakoniec 95 % ethanolom. Jednotlivé frakcie boli zbierané po 250 ml, celkovo sa získalo 98 frakcií, ktoré boli monitorované TLC a spojené do 5 frakcií (tab. 2 a obr. 8).

Tabuľka č. 2 Spojené frakcie alkaloidného extraktu

FRAKCIA	ROZMEDZIE FRAKCIE	MOBILNÁ FÁZA	HMOTNOSŤ ODPARKU (g)
1	20-27	LB + $CHCl_3$ (1:1, 2:3)	0,44
2	28-34	LB + $CHCl_3$ (2:3)	0,94
3	35-74	LB + $CHCl_3$ (2:3, 3:7)	9,69
4	75-97	$CHCl_3$, $CHCl_3$ + EtOH (1:1)	2,68
5	98	EtOH	1,99



Obr. 8 Hromadné TLC spojených frakcií alkaloidného extraktu

4.3.4 Separácia a čistenie alkaloidov z frakcie č. 1 (20-27; 440 mg)

Obr. 9 TLC frakcia 20-27 alkaloidného extraktu

Bola použitá preparatívna TLC na 24 nalievaných doskách 15 × 15 cm (adsorbent SiO_2 60 GF 254, Merck, počet vyvíjaní 4×, dráha 12,5 cm, komora nasýtená) a používala sa mobilná fáza LB + DEA (97,5:2,5). Frakcia č. 1 bola separovaná do dvoch zón s Rf 0,52 a 0,38. Následnou elúciou zlúčenín $CHCl_3$ + EtOH (1:1) z adsorbentu boli získané podfrakcia 1 (48,2 mg) a podfrakcia 2 (190 mg). Kryštalizáciou podfrakcií s EtOH boli získané kryštalické zlúčeniny **MC-1** (31 mg; svetložlté kryštály; GC-MS analýza - stylopin) a **MC-2** (biele, drobné kryštály; GC-MS analýza - rhoeadin).

4.4 Stanovenie biologickej aktivity

4.4.1 Stanovenie cholínesterázovej aktivity

4.4.1.1 Chemikálie

- acetylthiocholin jodid (Sigma-Adrich) (použitý 10mM roztok)
- butyrylthiocholin jodid (Sigma-Adrich) (použitý 10mM roztok)
- dimethylsulfoxid p. a. (Sigma-Adrich)
- 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina ≥ 98% (Sigma-Aldrich) (použitý 5mM roztok)
- galanthamin hydrobromid (Changsha Organic Haerb Inc., China)
- huperzin A (TAZHONGHUI – Tai´an zhonghui Plant Biochemical Co., Ltd., China)

4.4.1.2 Pufre

- 5mM fosfátový pufer s pH 7,4

  Zásobný roztok A

  10mM roztok NaH_2PO_4 (1 liter roztoku obsahuje 1,20 g NaH_2PO_4 alebo 1,38 g $NaH_2PO_4.H_2O$, alebo 1,56 g $NaH_2PO_4.2\ H_2O$).

Zásobný roztok B

10mM roztok Na_2HPO_4 (1 liter roztoku obsahuje 1,42 g Na_2HPO_4 alebo 1,78 g $Na_2HPO_4.2\ H_2O$, alebo 3,58 g $Na_2HPO_4.12\ H_2O$).

Zmieša sa 57 ml roztoku A a 283 ml roztoku B a 300 ml vody.

- 5mM fosfátový pufer s pH 7,4 obsahujúci 150 mM chloridu sodného

  8,766 g chloridu sodného p. a. sa rozpustí v 5mM fosfátového pufru s pH 7,4 a doplní sa ním do 1000 ml.

- 100mM fosfátový pufer, pH 7,4

  Zásobný roztok A

  200mM roztok NaH_2PO_4 (1 liter roztoku obsahuje 24,0 g NaH_2PO_4 alebo 27,6 g $NaH_2PO_4.H_2O$, alebo 31,2 g NaH_2PO_4 . 2 H_2O).

  Zásobný roztok B

  200mM roztok Na_2HPO_4 (1 liter roztoku obsahuje 28,4 g Na_2HPO_4 alebo 35,6 g $Na_2HPO_4.2\ H_2O$, alebo 71,63 g $Na_2HPO_4.12\ H_2O$).

  Zmieša sa 57 ml roztoku A a 243 ml roztoku B a 300 ml vody.

4.4.1.3 Biologický materiál

- Zdroj acetylcholínesterázy (AChE) - použitý hemolyzát ľudských erytrocytov
- Zdrojom butyrylcholínesterázy (BuChE) – použitá ľudská plazma

4.4.1.4 Získanie erytrocytárnej AChE a BuChE z plazmy

Erytrocyty sa získavajú z čerstvej odobranej citrátovanej krvi zdravých dobrovoľníkov. Okamžite po odbere sa krv rozdelí rovnomerne po 5 ml do šrubovacích skúmaviek a vykoná sa centrifugácia pri rýchlosti 4000 rpm pri 4 °C po dobu 10 minút. Po prvej centrifugácii sa plazma odsaje tak, aby v nej neboli erytrocyty, a uchováva sa

do doby stanovenia aktivity BuChE v chladničke pri 4 °C (najdlhšie 6 hodín). Zbytok plazmy z erytrocytárneho sedimentu sa opatrne odsaje bezpopolovým filtračným papierikom s hladeným povrchom, ktorého špička je zostrihnutá (pri naklonení skúmavkou). Odčíta sa objem erytrocytárnej masy, a tento sediment sa zriedi takým množstvom 5 mM fosfátového pufru s pH 7,4 obsahujúcim 150 mM chloridu sodného, a suspenzia sa rozdelí do skúmavok s objemom 13 ml, dobre sa premieša a vykoná sa centrifugácia rovnakým spôsobom, ako je uvedené vyššie pri oddeľovaní plazmy. Premývanie týmto spôsobom sa vykoná celkom 3× a premývacia kvapalina sa dokonale odstráni. Po tomto premývaní sa pridá také množstvo 5 mM fosfátového pufru s pH 7,4 bez obsahu chloridu sodného, aby bol objemový pomer erytrocyty : pufor 1:9, zmes sa opäť homogenizuje, preleje do Erlenmayerovej banky a erytrocyty sa nechajú spontánne hemolyzovať miešaním pomocou teflónového miešadla pri 300 rpm. Ihneď po skončení riadenej hemolýzy sa u suspenzie stanoví aktivita, prípadne sa 5 mM fosfátovým pufrom upraví absorbancia (hodnota absorbancie musí byť 0,08 - 0,15) a nariedený hemolyzát sa uchováva do doby použitia pri -22 °C.

Cholínesterázová aktivita plazmy sa stanoví rovnakým spôsobom (hodnota absorbancie musí byť 0,15 - 0,20) a uchováva sa rovnakým spôsobom ako hemolyzát.

4.4.1.5 Stanovenie cholínesterázovej inhibičnej aktivity (IC_{50})

Pre stanovenie hodnoty IC_{50} sa použila Ellmanova spektrofotometrická metóda s použitím 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoovej kyseliny (DTNB)[2]. Ako substráty sa použili estery thiocholínu; pri reakcii vznikol žlto sfarbený produkt, ktorý sa stanovil spektrofotometricky pri λ=436 nm (AChE) alebo λ=412 nm (BuChE).

Sledoval sa nárast absorbancie za 1 minútu. Hodnoty IC_{50} sa vypočítali z nameraných hodnôt poklesu aktivity AChE alebo BuChE nelineárnou regresiou v programe GraphPaD Prism (verzia 3.02 pre Windows; výrobca Graph PaD Software, San Diego, CA, USA). Výsledky sa porovnali s hodnotami IC_{50} známych IChE: galanthamin, huperzin A a rivastigmin.

Percentá inhibície (% I) boli počítané podľa vzorca:

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

kde ΔA_{BL} je nárast absorbancie slepej vzorky za 1 minútu a ΔA_{SA} je nárast absorbancie meranej vzorky.

Do jamiek mikrotitračných dosiek sa v prípade slepej vzorky napipetovalo 8,3 µl plazmy alebo hemolyzátu, pridalo sa 283 µl 5 mM DTNB, 8.3 µl DMSO, po dvojminútovom premiešaní sa zmes inkubovala v komore readeru pri 37 °C po dobu 5 minút, potom sa pridalo 33,3 µl roztoku substrátu (acetylthiocholínjodidu alebo butyrylthiocholínjodidu) a zistila sa pri príslušnej vlnovej dĺžke absorbancia.

U meraných látok (extraktu) sa použili rovnaké objemy činidiel a roztoku substrátu. Namiesto samotného DMSO (používa sa len do jamiek s porovnávacím roztokom) sa pridali roztoky meranej látky o rôznej koncentrácii (40,0; 10,0; 4,0; 1,0; 0,4 mM v DMSO, prípadne ešte v rade nižších koncentrácií), či roztoky extraktov o rôznej koncentrácii (20,0; 10,0; 2,0; 1,0; 0,2 mg/ml, prípadne nižšie koncentrácie). Meranie sa vykonalo pri teplote 37 °C, vlnovej dĺžke 436 nm v kinetickom móde po dobu 1 minúty (7 meraní). Výpočet IC_{50} sa vykonal za použitia programu GraphPad Prism – určila sa 50 % inhibičná koncentrácia ako je uvedené vyššie.

Cholínesterázová inhibičná aktivita sa porovnávala s referenčnými látkami (galanthamin, huperzin A, rivastigmin).

Tabuľka č. 3 Cholínesterázová a antioxidačná aktivita štandardných látok

Látka	AChE (IC_{50})	BuChE (IC_{50})
Galanthamin	1,710 ± 0,065 µM	42,30 ± 1,30 µM
Huperzin A	0,033 ± 0,001 µM	>1000 µM
Rivastigmin	0,037 ± 0,001 µM	0,0033 ± 0,0003 µM

4.4.2 Stanovenie inhibície prolyloligopeptidázy

4.4.2.1 Chemikálie

Testované zlúčeniny použité v tejto štúdii boli izolované z extraktu *Papaver rhoeas* L. Ďalšie chemikálie vrátane prolyloligopeptidáza (POP) a jej substrát (*Z*)-Gly-Pro-*p*-nitroanilid boli zakúpené v Sigma - Aldrich (Praha, Česká republika).

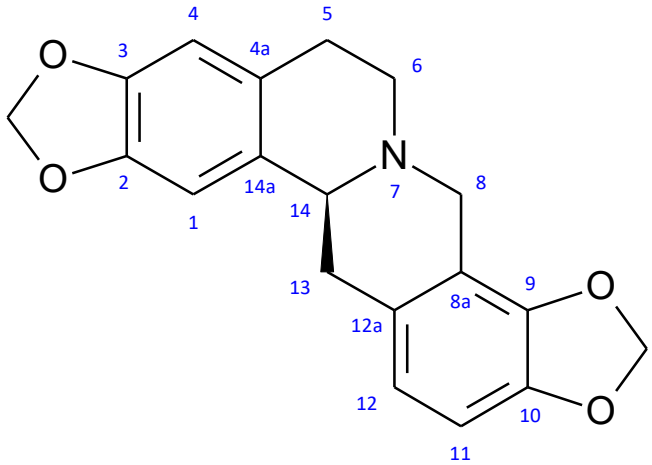
4.4.2.2 Stanovenie POP

POP bola rozpustená vo fosfátovom pufri (pH 7,4; obsahujúci 137 mM NaCl a 2,7 mM KCl). Špecifická aktivita enzýmu bola 0,2 U/ml. K skúške boli použité štandardné polystyrenové 96-jamkové mikrotitračné doštičky s plochým priehľadným dnom. Zásobné roztoky sa pripravili v DMSO (10 mM). Riedenia boli pripravené zriedením zásobných roztokov deionizovanou vodou. Kontrolný roztok mal rovnakú koncentráciu ako DMSO. POP substrát, (*Z*)-Gly-Pro-*p*-nitroanilid sa rozpustili v 50 % 1,4 – dioxane (5 mM). Skúšobné roztoky boli zmiešané s 170 μl pufru, 5 μl testovanej látky a 5 μl roztoku POP. Zmes bola inkubovaná pri 37 °C po dobu 5 minút, a potom sa pridalo 20 μl substrátu, následne bola zmes inkubovaná pri 37 °C ďalších 30 minút. Tvorba *p*-nitroanilidu bola priamo úmerná aktivite POP a bola spektrofotometricky premeraná pri vlnovej dĺžke 405 nm za použitia mikrotitračného detektoru ELISA (Synergy 2-Vermont, USA). Inhibičná účinnosť bola vyjadrená ako hodnota IC_{50}. Software GraphPad Prism bol použitý pre vyhodnotenie dát.

5. Výsledky

5.1 Štruktúrna analýza

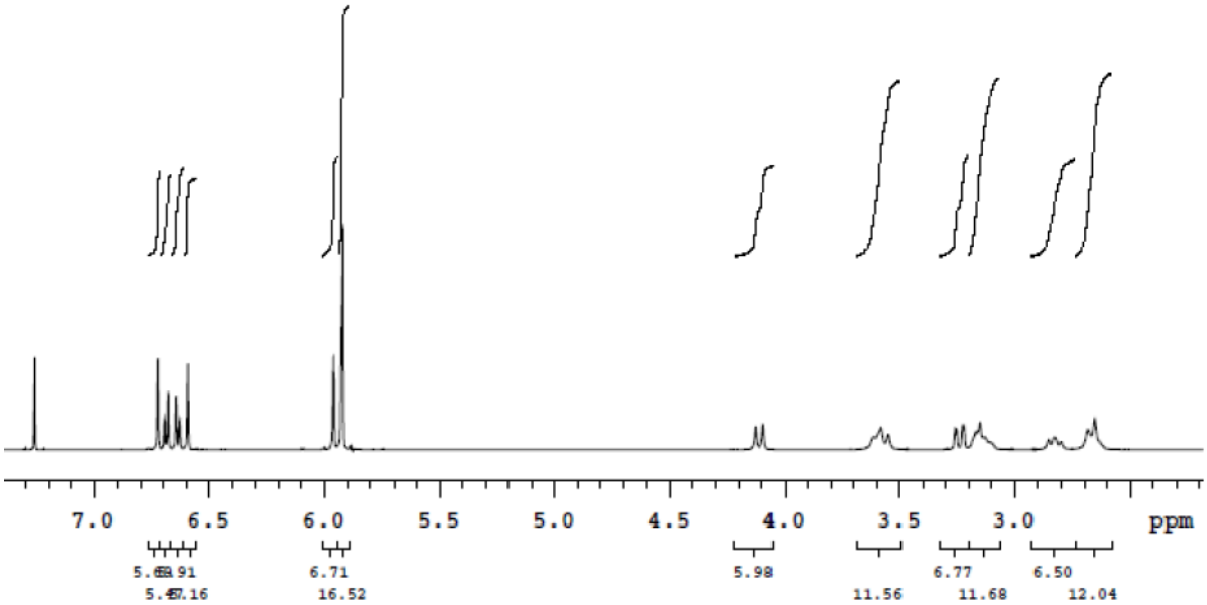
5.1.1 (—)-Stylopin (MC-1)



Obr. 10 Štruktúra (—)-stylopinu

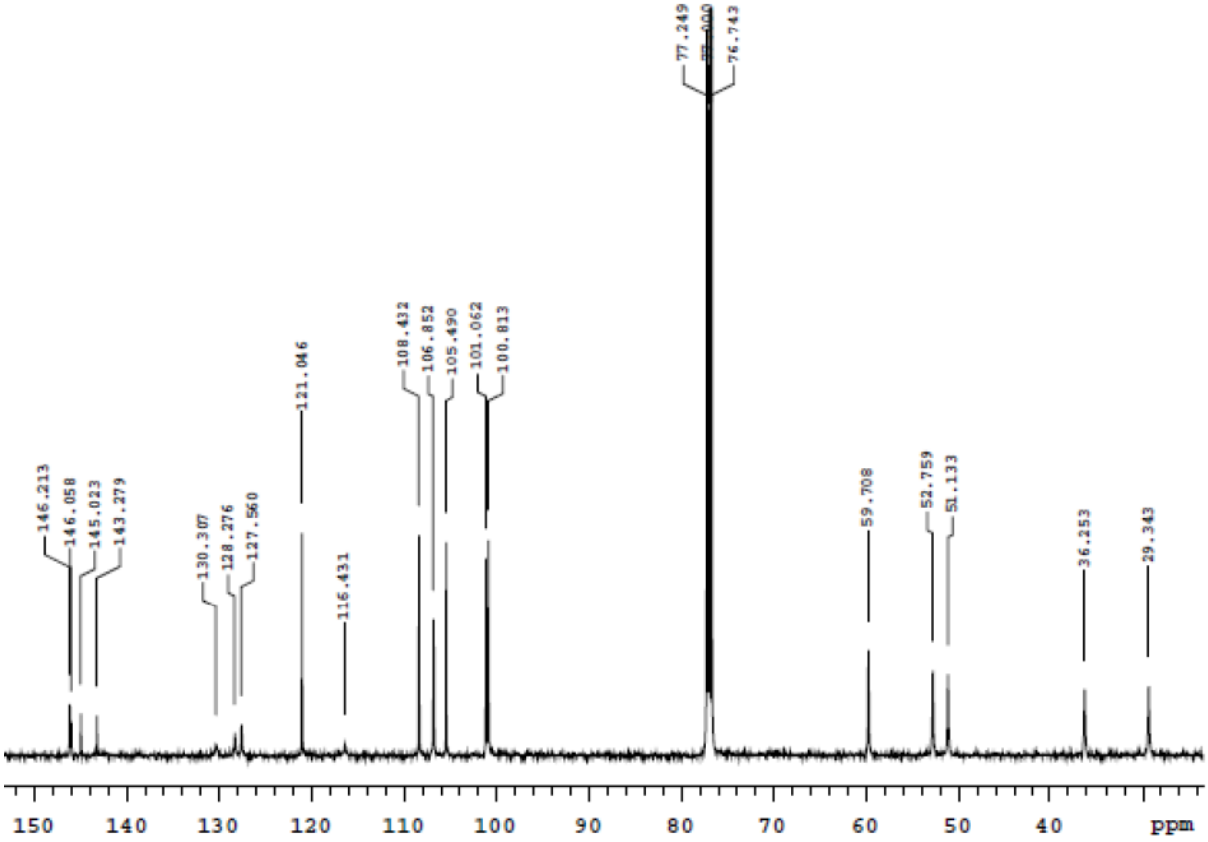
5.1.1.1 NMR analýza

^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$): 6.72 (1H, s, H1), 6.69 (1H, d, *J* = 8.5 Hz, H11), 6.64 (1H, d, *J* = 8.5 Hz, H12), 6.59 (1H, s, H4), 5.96-5.92 (4H, m, 2xOCH_2O), 4.11 (1H, d, *J* = 15.1 Hz, H8), 3.61-3.56 (2H, m, H8, H14), 3.24 (1H, dd, *J* = 16.5, 3.6 Hz, H13), 3.19-3.09 (2H, m, H5, H6), 2.83 (1H, dd, *J* = 16.5, 11.0 Hz, H13), 2.70-2.62 (2H, m, H5, H6).



Obr. 11 ^{1}NMR spektrum (—)-stylopinu

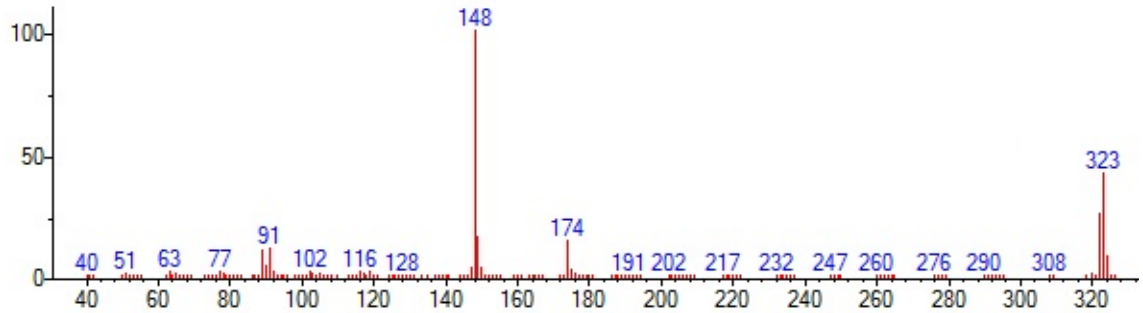
^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$): 146.2 (C3), 146.1 (C2), 145.0 (C10), 143.3 (C9), 130.3 (C14a), 128.3 (C12a), 127.6 (C4a), 121.0 (C12), 116.4 (C8a), 108.4 (C4), 106.9 (C11), 105.5 (C1), 101.1 (C9OCH$_2$OC10), 100.8 (C2OCH$_2$OC3), 59.7 (C14), 52.8 (C8), 51.1 (C6), 36.3 (C13), 29.3 (C5).



Obr. 12 ^{13}C NMR spektrum (—)-stylopinu

5.1.1.2 GC-MS analýza

EI-MS: 323 (42), 322 (28), 174 (16), 148 (100), 91 (12), 89 (11).



Obr. 13 EI spektrum (—)-stylopinu

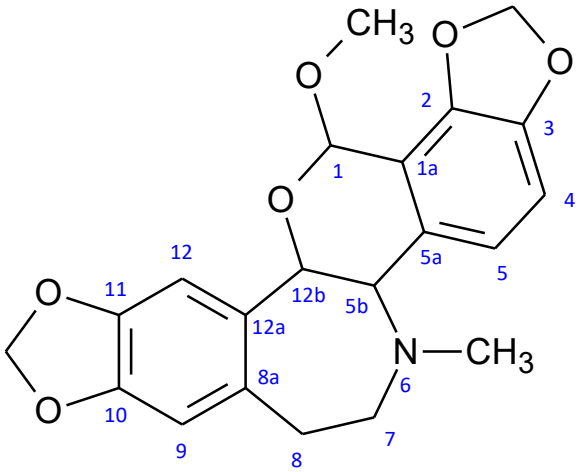
5.1.1.3 Optická otáčavosť

$[\alpha]_D^{25}$ = – 121° (c = 0,024; $CHCl_3$).

5.1.1.4 Teplota topenia

Získala sa svetložltá kryštalická látka, t. t. = 206 – 207 °C.

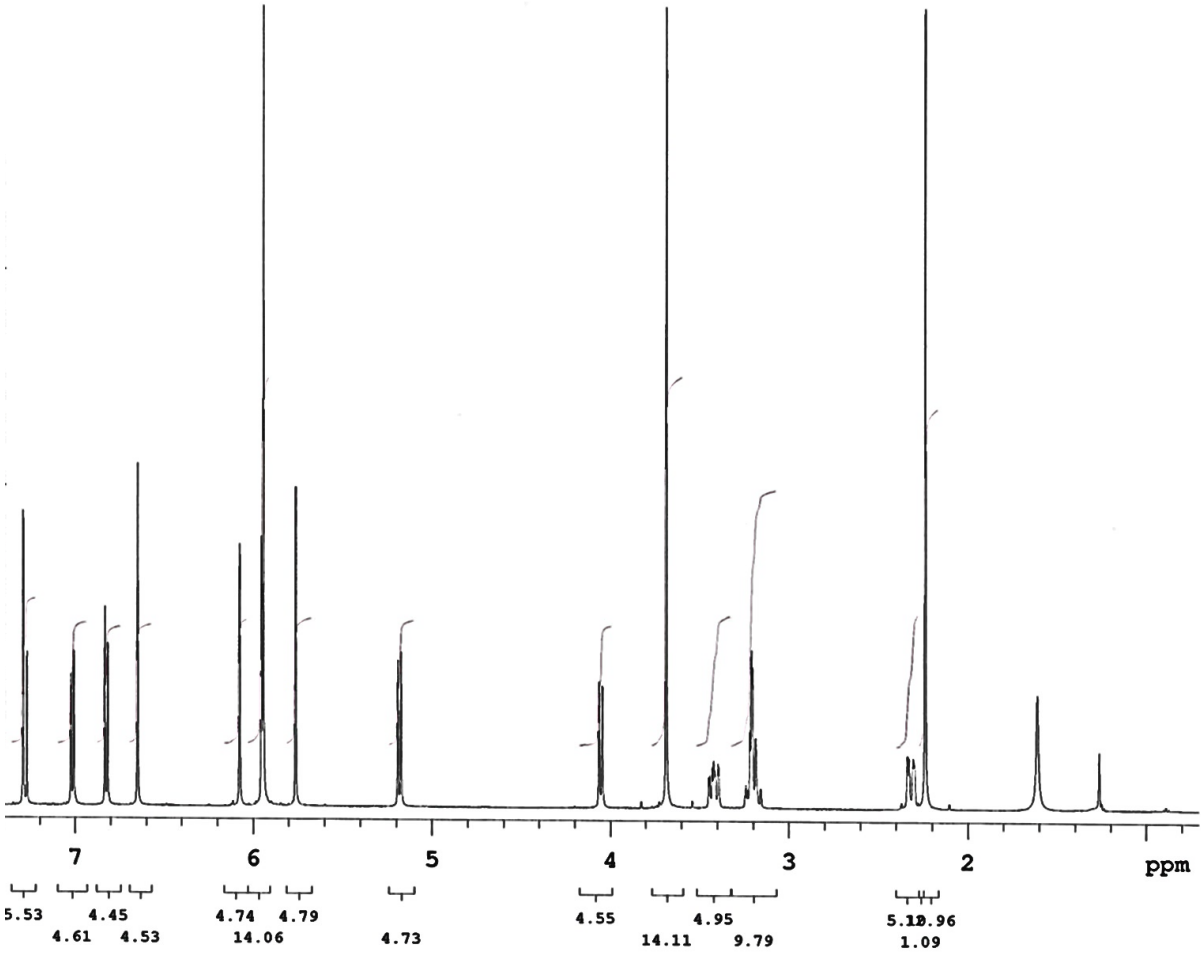
5.1.2 (+)-Rhoeadin (MC-2)



Obr. 14 Štruktúra (+)-rhoeadinu

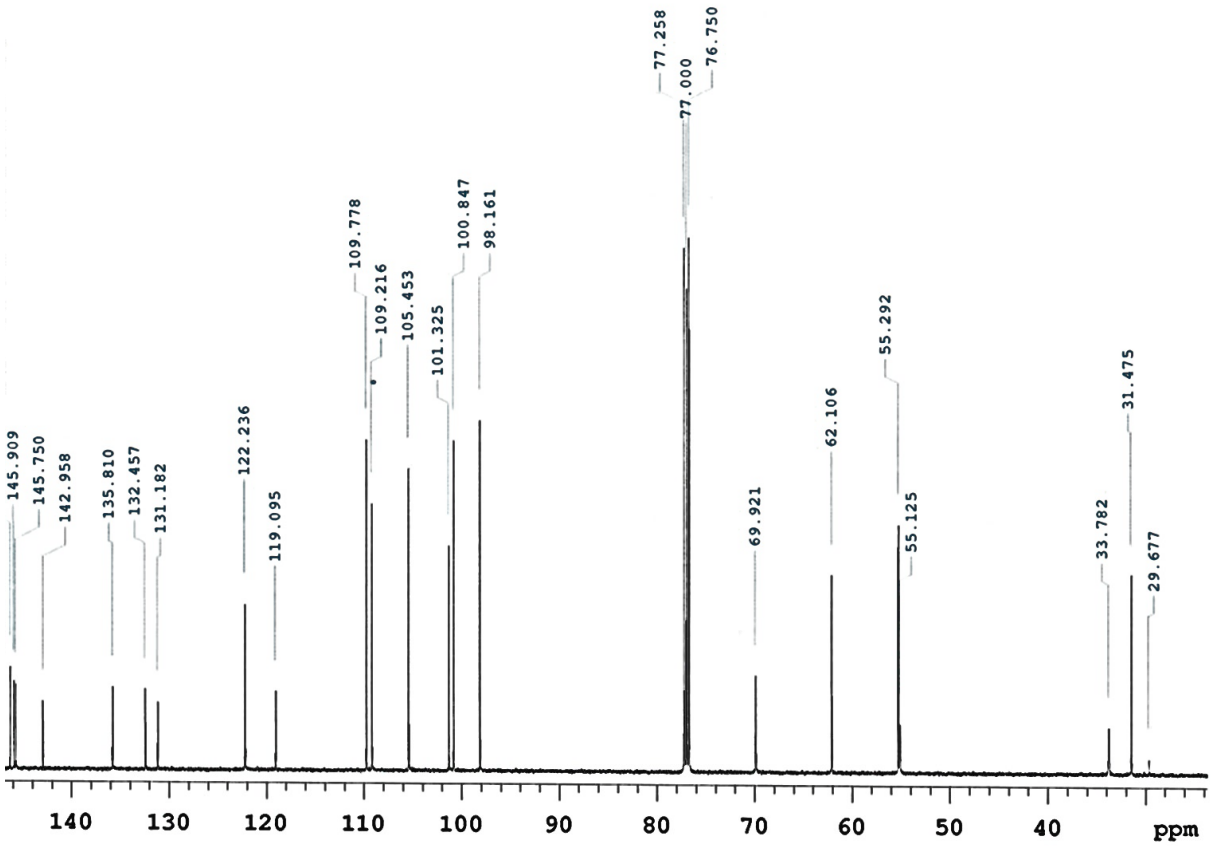
5.1.2.1 NMR analýza

^{1}H NMR (500MHz, $CDCl_3$) δ: 7.28 (1H, s, H12), 7.02 (1H, d, *J*=8.1 Hz, H5), 6.83 (1H, d, *J*=8.1 Hz, H4), 6.64 (1H, s, H9), 6.08 (1H, d, *J*=1.0 Hz, OCH_2O), 5.96 (1H, d, *J*=1.0 Hz, OCH_2O), 5.93 (2H, s, OCH_2O), 5.75 (1H, s, H1), 5.18 (1H, d, *J*=9.2 Hz, H12b), 4.06 (1H, d, *J*=9.2 Hz, H5b), 3.67 (3H, s, OCH_3), 3.45-3.37 (1H, m, H8), 3.25-3.14 (2H, m, H7), 2.34-2.27 (1H, m, H8), 2.23 (3H, s, NCH_3).



Obr. 15 ^{1}NMR spektrum (+)-rhoeadinu

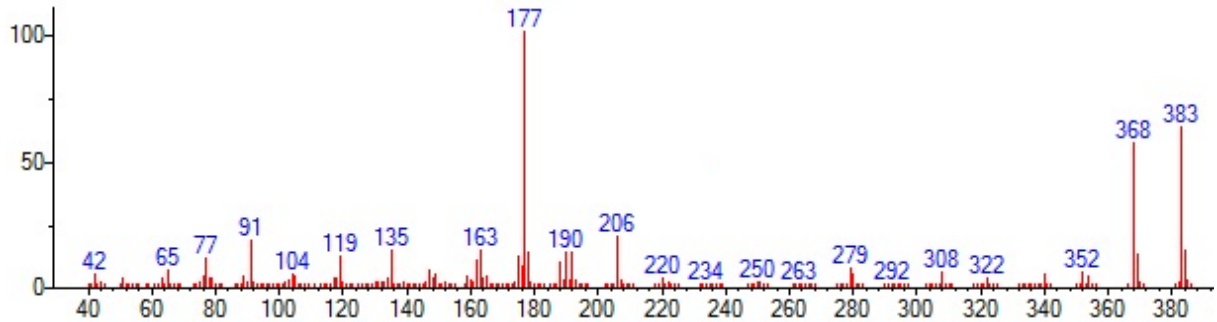
^{13}C NMR (125MHz, $CDCl_3$) δ: 146.3 (C3), 145.9 (C11), 145.8 (C10), 143.0 (C2), 135.8 (C12a), 132.5 (C8a), 131.2 (C5a), 122.2 (C5), 119.1 (C1a), 109.8 (C9), 109.2 (C4), 105.5 (C12), 101.3 (OCH_2O), 100.8 (OCH_2O), 98.2 (C1), 69.9 (C12b), 62.1 (C5b), 55.3 (OCH_3), 55.1 (C7), 33.8 (NCH_3), 31.5 (C8).



Obr. 16 ^{13}C spektrum (+)-rhoeadinu

5.1.2.2 GS-MS analýza

EI-MS: 383 (62), 368 (56), 206 (20), 192 (14), 190 (14), 177 (100), 163 (15), 135 (15).



Obr. 17 EI spektrum (+)-rhoeadinu

5.1.2.3 Optická otáčavosť

$[\alpha]_D^{25}$ = + 236° (c = 0,17; $CHCl_3$)

5.1.2.4 Teplota topenia

Získala sa biela kryštalická látka, t. t. = 253 – 254 °C.

5.2 Výsledky inhibičných aktivít izolovaných alkaloidov

Tabuľka č. 4 Výsledky inhibičných aktivít izolovaných alkaloidov

	Inhibičné aktivity (µM)		
ALKALOID	**IC_{50} AChE**	**IC_{50} BuChE**	**IC_{50} POP**
(—)-Stylopin	522 ± 67	>1000	>790
(+)-Rhoeadin	915 ± 64	>1000	>790
Galanthamin	1,71 ± 0,065	42,30 ± 1,30	>1000
Huperzin A	0,033 ± 0,001	>1000	>1000
Rivastigmin	0,037 ± 0,001	0,0033 ± 0,0003	n.d.
Berberin	-	-	142 ± 21
Z-pro-prolinal	-	-	$3,269 \pm 0,02 \times 10^{-3}$

6. Diskusia

Na základe screeningovej štúdie vykonanej na katedre farmaceutickej botaniky a ekológie Univerzity Karlovej vykazoval alkaloidný extrakt z *Papaver rhoeas* L. inhibičnú aktivitu voči ľudskej butyrylcholínesteráze (IC_{50} = 3,94 ± 0,35 µg/ml) a voči ľudskej acetylcholínesteráze bol extrakt neaktívny (IC_{50} > 1000 µg/ml).

Cieľom tejto diplomovej práce bola izolácia alkaloidov z *Papaver rhoeas* L. a určenie ich biologickej aktivity vzťahujúcej sa k Alzheimerovej chorobe. Z frakcie 1 boli izolované alkaloidy za použitia chromatografických metód. Na základe TLC boli vo frakcii preukázané za pomoci UV detekcie dve látky, ktoré po reakcii s Dragendorffovým činidlom dávali pozitívnu reakciu a vykazovali sa ako alkaloidy. Následne boli vyizolované dva alkaloidy v čistej forme.

Na základe NMR a GC-MS analýz, merania teploty a optickej otáčavosti po porovnaní literatúry boli identifikované látky (–)-stylopin (MC-1) a (+)-rhoeadin (MC-2).

Vyizolované látky (–)-stylopin a (+)-rhoeadin boli testované na inhibičnú aktivitu voči ľudským cholínesterázam a prolyloligopeptidáze. Na stanovenie cholínesterázovej inhibičnej aktivity sa použila Ellmanova spektrofotometrická metóda. Inhibičné aktivity boli porovnávané so štandardami (galanthamin, hupezin A a rivastigmin.) Galanthamin vykazuje voči AChE silnú inhibičnú aktivitu (1,710 ± 0,065 µM), ale voči BuChE má stredne silnú inhibičnú aktivitu (42,30 ± 1,30 µM). Huperzin A javí taktiež silnú inhibičnú aktivitu voči AChE (0,033 ± 0,001 µM), ale voči BuChE je neaktívny (>1000 µM). Rivastigmin má silnú inhibičnú aktivitu ako voči AChE (0,037 ± 0,001 µM), tak aj k BuChE (0,0033 ± 0,0003 µM). Vyizolovaný alkaloid (–)-stylopin patrí medzi protoberberínové alkaloidy. Je prítomný v čeľadiach makovité (*Papaveraceae*) a zemedymovité (*Fumariaceae*). (–)-Stylopin vykazuje voči AChE miernu inhibičnú aktivitu (522 ± 67 µM), ale voči BuChE je neaktívny (>1000 µM). (+)-Rhoeadin

vyskytujúci sa v rode *Papaver* bol voči cholínesterázam neaktívny (IC_{50} AChE=915 ± 64 µM; BuChE> 1000 µM).

Látky boli testované na inhibičnú aktivitu POP. Ako štandardy sa použili (Z)-Pro-prolinal ($IC_{50\ POP}$ = 3,269 ± 0,02 nM) a alkaloid berberin ($IC_{50\ POP}$ = 142 ± 21 µM). (–)-Stylopin aj (+)-rhoeadin vykazovali inhibičnú aktivitu >790, čo je veľmi slabá inhibičná aktivita.

Na záver môžeme povedať, že ani jeden z vyizolovaných alkaloidov nevykazuje lepšiu inhibičnú aktivitu voči AChE, BuChE a POP ako vykazujú štandardy. Na základe výsledných hodnôt nejavia perspektívu k ďalšiemu výskumu v terapii Alzheimerovej choroby z hľadiska inhibície týchto vybraných enzýmov.

7. Abstrakt

Čakurdová, M.: Alkaloidy *Papaver rhoeas* L. (Papaveraceae) a jejich biologická aktivita vztažená k Alzheimerovej chorobě II. Diplomová práca, Univerzita Karlova v Prahe, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra farmaceutickej botaniky a ekológie, Hradec Králové, 2017.

Cieľom tejto práce je izolácia alkaloidov z frakcie 20-27, ktorá bola získaná zo sumárneho alkaloidného extraktu *Papaver rhoeas* L. (Papaveraceae). Následne ich identifikácia pomocou štruktúrnej analýzy NMR, GC-MS, optickej otáčavosti a teploty topenia. Pomocou chromatografických metód boli izolované 2 alkaloidy (–)-stylopin a (+)-rhoeadin.

U izolovaných látok bola stanovená ich inhibičná aktivita voči acetylcholínesteráze, butyrylcholínesteráze a prolyloligopeptidáze. Získané hodnoty boli stanovené ako IC_{50}: (–)-stylopin ($IC_{50\ AChE}$ = 522 ± 67 µM, $IC_{50\ BuChE}$ = >1000 µM, $IC_{50\ POP}$ = >790 µM); (+)-rhoeadin ($IC_{50\ AChE}$ = 915 ± 64 µM, $IC_{50\ BuChE}$ = >1000 µM, $IC_{50\ POP}$ = >790 µM). Žiadna z izolovaných látok nevykazovala lepšiu inhibičnú aktivitu voči AChE a BuChE v porovnaní s galanthaminom ($IC_{50\ AChE}$ = 1,71± 0,065 µM, $IC_{50\ BuChE}$ =42,30 ± 1,30 µM), huperzinom A ($IC_{50\ AChE}$ = 0,033 ± 0,001 µM, $IC_{50\ BuChE}$ = >1000 µM) a rivastigminom ($IC_{50\ AChE}$ = 0,037 ± 0,001 µM, $IC_{50\ BuChE}$ = 0,0033 ± 0,0003 µM). Pri testovaní inhibičnej aktivity voči POP žiadna z izolovaných látok, (–)-stylopin $IC_{50\ POP}$ = >790, (+)-rhoeadin $IC_{50\ POP}$ = >790, nevykazovala zaujímavú aktivitu.

Kľúčové slová: Alzheimerova choroba, *Papaver rhoeas* L., acetylcholínesteráza, butyrylcholínesteráza, prolyloligoestedáza

8. Abstract

Čakurdová, M.: Alkaloids of *Papaver rhoeas* L. (Papaveraceae) and their biological activity related to Alzheimer´s disease II. Diploma thesis, Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Department of Pharmaceutical Botany and Ecology, Hradec Králové, 2017.

The aim of this work was focused on isolation of alkaloids from the fraction 1 (joined fractions 20-27), which was obtained from the summary alkaloid extract of *Papaver rhoeas* L. (Papaveraceae). The alkaloids were identified by structural analysis NMR, GC-MS, optical activity and melting point. Two alkaloids were identified as (–)-stylopine and (+)-rhoeadine.

Isolated substances were tested on ability to inhibit the enzymes acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase and prolyloligopeptidase. Obtained data were expressed as IC_{50} values: (–)-stylopine ($IC_{50\ AChE}$ = 522 ± 67 µM, $IC_{50\ BuChE}$ = >1000 µM, $IC_{50\ POP}$ = >790 µM); (+)-rhoeadine ($IC_{50\ AChE}$ = 915 ± 64 µM, $IC_{50\ BuChE}$ = >1000 µM, $IC_{50\ POP}$ = >790 µM). None of the isolated substances showed so potent cholinesterase inhibitory activity as the alkaloids galanthamine ($IC_{50\ AChE}$ = 1.71± 0.065 µM, $IC_{50\ BuChE}$ =42.30 ± 1.30 µM) and huperzine A ($IC_{50\ AChE}$ = 0.033 ± 0.001 µM, $IC_{50\ BuChE}$ = >1000 µM) or rivastigmine ($IC_{50\ AChE}$ = 0.037 ± 0.001 µM, $IC_{50\ BuChE}$ = 3.3 ± 0.3 nM). Similarly, none of the isolated substances demonstrated a promising prolyl oligopeptidase inhibitory activity. IC_{50} values of both alkaloids were >790 µM.

Keywords: Alzheimer´s disease, *Papaver rhoeas* L., acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase, prolyl oligopeptidase

9. Použitá literatúra

[1] Klímová, E., Magurová, D., Fertaľová, T., Ondriová, I., Majerníková, Ľ., Mikuľáková, W., Lengyelová, A., Cmorejová, V.: *Teória a prax v starostlivosti o chorého s Alzheimerovou chorobou*. Grafotlač Prešov, Prešov 2013. ISBN 978-80-555-0936-5.

[2] Povová, J., Tomášková, H., Šerý, O., Ambroz, P., Vařechová, K., Janout, V.: *Alzheimerova choroba a její rizika pro další generace*. Hygiena 2013, *58*(3), 117-120.

[3] Jirák, R.: *Gerontopsychiatrie*. Galén, Praha 2013. ISBN 978-80-7262-873-5.

[4] Holmerová, I., Jarolímová, E., Nováková, H.: *Alzheimerova choroba v rodině*. Pfizer, Praha 2004.

[5] Holmerová, I., Jarolímová, E., Suchá, J.: *Péče o pacienty s kognitivní poruchou*. EV public relations, Praha 2007. Vážka. ISBN 978-80-254-0177-4.

[6] Jirák, R., Koukolík, F. *Demence: neurobiologie, klinický obraz, terapie*. 1. vyd. Galén, Praha 2004. ISBN 80-7262-268-4.

[7] Koukolík, F., Jirák R.: *Alzheimerova nemoc a další demence*. Grada, Praha 1998. ISBN 80-7169-615-3.

[8] Alzheimer's Association.: 2015 Alzheimer's Disease Facts and Figures. *Alzheimers Dement*. 2015, *11*(3)332-384.

[9] http://lundbeck.com/sk/poruchy-mozgu/alzheimerova-choroba, 2013, stiahnuté 13.9.2016.

[10] Mallat, J., Marieb, E.N.: *Anatomie lidského těla*. Computer Press, Praha 2005.

[11] Lane, R. M., Potkin, S. G., Enz, A.: Targeting acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in dementia. *International Journal of Neuropsychopharmacology.* 2006, *9*(01), 101-124.

[12] Boyd, M. R.: *Alzheimer's disease diagnosis and treatments*. Hauppauge, NY: Nova Science, c2010. Neurology--laboratory and clinical research development series.

[13] Fišar, Z., Jirák R.: *Vybrané kapitoly z biologické psychiatrie*. Grada, Praha 2001. ISBN 80-247-0061-1.

[14] Murphy, M. P., LeVine, H., III: Alzheimer´s Disease and the β-amyloid Peptide. *Journal of Alzheimer's disease.* 2010, *19*(1), 311.

[15] http://www.wikiwand.com/de/Beta-Amyloid, 13.9.2016.

[16] Mandelkow, E.-M., Mandelkow, E.: Biochemistry and Cell Biology of Tau Protein in Neurofibrillary Degeneration. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 2012, *2*(7), a006247-a006247. ISSN 2157-1422.

[17] Kuwano, R., Miyashita, A., Arai, H., Asada, T., Imagawa, M., Shoji, M., Higuchi, S., Urakami, K., Kakita, A., Takahashi, H., Tsukie, T., Toyabe, S., Akazawa, K., Kanazawa, I., Ihara, Y.: Dynamin-binding protein gene on chromosome 10q is associated with late-onset Alzheimer´s disease. *Human Molecular Genetics*. 2006, *15*(13), 2170-2182.

[18] Hatters, D. M., Peters-Libeu, C. A., Weisgraber K. H.: Apolipoprotein E structure: insights into function. *Trends in biochemical sciences*. 2006, *31*(8), 445-454.

[19] Koukolík, F., Jirák, R.: *Diagnostika a léčení syndromu demence*. Grada, Praha 1999. ISBN 80-7169-716-8.

[20] Chmátalová, Z., Skoumalová, A.: Oxidační stres u Alzheimerovy choroby a jeho důsledky. *Klinická biochemia a metabolismus*. 2014, *22*(43), No. 4, 189–195.

[21] Höschl, C., Libiger, J., Švestka, J. *Psychiatrie*. TIGIS, Praha 2004. ISBN 80-900130-7-4.

[22] Sheardová, K., Hort, J., Rusina, R., Bartoš, A., Línek, V., Ressner, P., Rektorová, I. Doporučené postupy pro léčbu Alzheimerovy nemoci a dalších onemocnění spojených s demencí. *Neurologie pro praxi. N* 2007, 70/103(5):589-594.

[23] Jirák, R. Terapie Alzheimerovy choroby a příbuzných neurodegenerativních demencí: Treating Alzheimer's disease and related neurodegenerative dementias. *Neurologie pro praxi*. SOLEN, Bratislava 2009, *10*(6), 370-372. ISSN 1335-9592.

[24] Jirák, R. Současné trendy v kognitivní farmakoterapii Alzheimerovy choroby. *Neurologie pro praxi*. 2002, *1*(2), 106-110. ISSN 1335-9592.

[25] Pidrman, V., Bouček, J., Látalová, K. Léčba demence inhibitory cholinesteráz - bezpečnost a snášenlivost v praxi. *Neurologie pro praxi*. SOLEN, Bratislava 2003, *4*(5), 254-257. ISSN 1335-9592.

[26] Wang, R., Yan, H., Tang, X. Progress in studies of huperzine A, a natural cholinesterase inhibitor from Chinese herbal medicine1. *Acta pharmacologica Sinica*. 2006, 27(1), 1-26.

[27] Jirák, R.: Současné trendy v biologické terapii Alzheimerovy choroby. *Psychiatrie pro praxi*. SOLEN, Praha 2006, 1, 8-11.

[28] Sýkora, J., Jančovičová, A.: Fytofarmaká a látky rastlinného pôvodu používané na liečbu porúch periférneho a cerebrálneho prekrvenia. *Ambulantná terapia*. SOLEN, Bratislava 2008, *6*(1), 42-47.

[29] Shi, CH., Liu, J., Wu, F., YEW, D. T.: Ginkgo biloba Extract in Alzheimer's Disease: From Action Mechanisms to Medical Practice. *International Journal of Molecular Sciences.* 2010, *11*(1), 107-123.

[30] Riederer, P., Gsell, W., Frölich, L., Götz, M.: S-26-1 Free radical scavengers in neuroprotection. *European Neuropsychopharmacology*. 1995, *5*(3), 232.

[31] Bas, A. In´T Veld, Ruitenberg, A., Hofman, A., Launer, L. J., van Duijn, C. M., Stijnen, T., Breteler, M. M. B., Stricker, B. H. C.: Nonsteroidal antiinflammatory drugs and the risk of Alzheimer´s disease. *The New England journal of medicine*. 2001, 345, 21.

[32] Vališ, M., Kalnická, D.: Novinky ve farmakoterapii demencí: New in pharmacotherapy of dementia. *Neurologie pro praxi*. Bratislava: SOLEN, 2011, *12*(1), 33-35. ISSN 1335-9592.

[33] Morgan, D., Diamond D. M., Gottschall, P. E., et al.: A beta peptide vaccination prevents memory loss in an animal model. *Nature*. 2000, *408*(6815), 982-985. ISSN 00280836.

[34] Biran, Y., Masters, C. L., Barnham, K. J., Bush, A. I., Adlard P. A.: Pharmacotherapeutic targets in Alzheimer's disease. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2009, *13*(1), 61-86, ISSN 15821838.

[35] Kontseková, E.: Imunoterapia Alzheimerovej choroby: amyloid versus tau. *Neuroimunologický ústav SAV*. Bratislava, 2014.

[36] Garciá-Horsman, J. A., Männistö, P. T., Venäläinen, J. I.: On the role of prolyl oligopeptidase in health and disease. *Neuropeptides*. 2007, *41*(1), 1-24, ISSN 01434179.

[37] Polgar, L., Szeltner, Z.: Structure, Function and Biological Relevance of Prolyl Oligopeptidase. *Current Protein & Peptide Science*. 2008, *9*(1), 96-107. ISSN 13892037.

[38] Männistö, P. T., Venäläinen, J. I, Jalkanen, A., Garciá-Horsman, J. A.: Prolyl oligopeptidase: A potential target for the treatment of cognitive disorders. *Drug News Perspect*. 2007, *20*(5), 293, ISSN 0214-0934.

[39] Laitinen, K. S. M., van Groen, T., Tanila, H., Venäläinen, J., Männisto, P. T., Alafuzoff, I.: Brain prolyl oligopeptidase activity is associated with neuronal damage rather than β-amyloid accumulation. Clinical Neuroscience And Neuropathology. 2001, *12*(15), 3309-3312.

[40] Jalkanen, A. J., Puttonen, K. A., Venäläinen, J. I., et al.: Beneficial Effect of Prolyl Oligopeptidase Inhibition on Spatial Memory in Young but Not in Old Scopolamine-Treated Rats. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*. 2006, 100(2), 132-138, ISSN 1742-7835.

[41] Roe, C. M., Fitzpatrick, A. L., Xiong, C. et al.: Cancer linked to Alzheimer disease but not vascular dementia. *Neurology*. 2010, *74*(2), 106-112, ISSN 0028-3878.

[42] Li, J.M., Liu, C., Hu, X., Cai, Y., Ma, C., Luo, X.G., Yan, X.X.: Inverse correlation between Alzheimer's disease and cancer: implication for a strong impact of regenerative propensity on neurodegeneration? *BMC Neurology*. 2014, *14*(1), ISSN 1471-2377.

[43] http://www.kvetenacr.cz/detail.asp?IDdetail=159, 4.10.2016.

[44] http://www.bylinkyprovsechny.cz/byliny-kere-stromy/byliny/114-mak-jako-bylinka-ucinky-na-zdravi-co-leci-pouziti-uzivani, 5.10.2016.

[45] Valíček, P.: *Rostlinné omamné drogy*. 1. vyd. Benešov: Start, 2000. ISBN 80-86231-09-7.

[46] Jahodář, L.: *Farmakobotanika: semenné rostliny*. Karolinum, Praha 2011. ISBN 978-80-246-2015-2.

[47] Novák, J.: *Jedovaté rostliny kolem nás*. Grada, Praha 2007. Svět rostlin. ISBN 978-80-247-1549-0.

[48] Krejča, J., Červenka, M.: *Z našej prírody: rastliny, horniny, minerály, skameneliny*. Príroda, Bratislava 1984.

[49] Rubcov, V. G., Beneš, K.: *Zelená lékárna*. Lidové nakladatelství, Praha 1990. ISBN 80-7022-004-X.

[50] Lhotská, M., Kropáč, Z.: *Kapesní atlas semen, plodů a klíčních rostlin*. Státní pedagogické nakladatelství, Praha 1985.

[51] http://botanika.wendys.cz/index.php/14-herbar-rostlin/129-papaver-rhoeas-mak-vlci, 2015, 5.10.2016.

[52] Randuška, D., Šomšák, L., Háberová, I. *Barevný atlas rostlin*. Obzor, Bratislava 1983.

[53] http://www.pfaf.org/user/Plant.aspx?LatinName=Papaver+rhoeas, 5.10.2016.

[54] Maurizi, A., De Michele, A., Ranfa, A., Ricci, A., Roscini, V., Coli, R., Bodesmo, M., Burini, G.: Bioactive compounds and antioxidant characterization of three edible wild plants traditionally consumed in the Umbria Region (Central Italy): *Bunias erucago* L. (corn rocket), *Lactuca perennis* L. (mountain lettuce) and *Papaver rhoeas* L. (poppy). *Journal of Applied Botany and Food Quality*. 2015, *88*, 109-114.

[55] Kresánek, J.: *Príručný atlas liečivých rastlín*. Osveta, Martin 1985.

[56] Sahraei, H., Fatemi, S. M., Pashaei-Rad, S., Faghih-Monzavi, Z., Salimi, S. H., Kamalinegad, M.: Effects of Papaver rhoeas extract on the acquisition and expression of morphine-induced conditioned place preference in mice. *Journal of Ethnopharmacology*. 2006, *103*(3), 420-424. ISSN 03788741.

[57] Kocak, S., Karabulut, K., Ertekin, B., Nak, H., Cander, B.: Red Poppy (*Papaver Rhoeas*) Poisoning: A Report of Three Cases. *Cyprus Journal of Medical Sciences*. 2016, *1*(1), 11-13. ISSN 21497893.

[58] Kalav, Y., Sariyar, G. Alkaloids from Turkish Papaver rhoeas. *Planta Medica*. 1989, *55*(05), 488-488. ISSN 0032-0943.

[59] Bentley, K. W. *The isoquinoline alkaloids*. Amsterdam: Harwood Academic Publishers, c1998. Chemistry and biochemistry of organic natural products, vol. 1. ISBN 90-5702-229-X.

[60] Tomko, J. a kol.: *Farmakognózia: učebnica pre farmaceutické fakulty*. Osveta, Martin 1999. ISBN 80-8063-014-3.

[61] Brossi, A.: *The alkaloids: chemistry and pharmacology*. Orlando: Academic Press, 1986. ISBN 0124695280.

[62] Dogan, G., Baqci, E.: Essential Oil Composition of *Papaver rhoeas* L. (Corn poppy) (Papaveraceae) from Turkey. *Hacettepe Joutnal of Bioliology and Chemistry*. 2014, *42*(4), 545-549.

[63] Nagy, M., Grančai, D., Mučaji, P. *Farmakognózia: biogenéza prírodných látok : učebnica pre študentov farmaceutickej fakulty*. Osveta, Martin 2011. ISBN 978-80-8063-368-4.

[64] Doucha, M.: Berberin: najde tento jedovatý alkaloid uplatnění v medicíně? 2015. http://toxicology.cz/modules.php?name=News&file=article&sid=752.

[65] Meskheli, M. B., Antelava, N. A., Bakuridze, A. D., Berishvili, E. R., Pachkoriia, K. Z.: Antidiabetic activity of berberin and extract, obtained from the bark of Phellodendron lavalei, introduced in subtropic regions of Georgia, in streptozotocin induced diabetic rats. *Georgian medical news*. 2011, *191*, 53-60.

[66] Wu, J., Zhang, H., Hu, B., Yang, L., Wang, P., Wang, F., Meng, X.: Coptisine from Coptis chinensis inhibits production of inflammatory mediators in lipopolysaccharide-

stimulated RAW 264.7 murine macrophage cells. *European Journal of Pharmacology*. 2016, *780*, 106-114. ISSN 00142999.

[67] Zou, Z.Y., Hu, Y.R., Ma, H. et al.: Coptisine attenuates obesity-related inflammation through LPS/TLR-4-mediated signaling pathway in Syrian golden hamsters. *Fitoterapia*. 2015, *105*, 139-146. ISSN 0367326x.

[68] Yu, D., Fu, S., Cao, Z., Bao, M., Zhang, G., Pan, Y., Liu, W., Zhou, Q.: Unraveling the novel anti-osteosarcoma function of coptisine and its mechanisms. *Toxicology Letters*. 2014, *226*(3), 328-336. ISSN 03784274.

[69] Yan, D., Jin, CH., Xiao, X.H., Dong, X.P. Antimicrobial properties of berberines alkaloids in Coptis chinensis Franch by microcalorimetry. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*. 2008, *70*(6), 845-849. ISSN 0165022x.

[70] Jang, S. II, Kim, B. H., Lee, W.Y., An, S. J., Choi, H. G., Jeon, B. H., Chung H.T., Rho, J.R., Kim, Y.J., Chai, K.Y. Stylopine from *Chelidonium majus* Inhibits LPS – Induced Inflammatory Mediators in RAW 264.7 Cells. *Archives of pharmacal research*. 2004, 27, (9), 923 – 929.

[71] Guinaudeau, H., Shamma, M. The Protopine Alkaloids. *Journal of Natural Products*. 1982, *45*(3), 237-246.

[72] Staněk, J.: *Alkaloidy*. Československá akademie věd, Praha 1957. Studie a prameny.

[73] Rathi, A., Srivastava, A. K., Shirwaikar, A., Singh Rawat, A. K., Mehrotra, S.: Hepatoprotective potential of Fumaria indica Pugsley whole plant extracts, fractions and an isolated alkaloid protopine. *Phytomedicine*. 2008, *15*(6-7), 470-477. ISSN 09447113.

[74] Saeed, S. A., Gilani, A. H., Majoo, R. U., Shah, B. H.: ANTI-THROMBOTIC AND ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITIES OF PROTOPINE. *Pharmacological Research*. 1997, *36*(1), 1-7. ISSN 10436618.

[75] Rektor, I., Rektorová, I., Suchý, V.: How to treat tremor. *Journal of Neurology*. 2004, *251*(5), 525-528. ISSN 0340-5354.

[76] Yc, F., Zhang, Y., Ly, T. Li, N., Chen, X., Zq, C., Zhu, C., Li, Y.: Effects of allocryptopine on outward potassium current and slow delayed rectifier potassium current in rabbit myocardium. *Journal of geriatric cardiology*. 2016, *13*(4), 316-325.

[77] Zhong, M., Liu, Y., Liu, J. et al.: Isocorydine Derivatives and Their Anticancer Activities. *Molecules*. 2014, *19*(8), 12099-12115. ISSN 1420-3049.

[78] Ma, CH., Du, F., Yan, L., et al.: Potent Activities of Roemerine against Candida albicans and the Underlying Mechanisms. *Molecules*. 2015, *20*(10), 17913-17928. ISSN 1420-3049.