

UNIVERZITA KARLOVA

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA FARMACEUTICKÉ BOTANIKY A EKOLOGIE

---



DIPLOMOVÁ PRÁCE

BIOLOGICKÁ AKTIVITA OBSAHOVÝCH LÁTEK ROSTLIN XXXIV. ALKALOIDY NATI *GLAUCIUM*  
*FLAVUM CRANTZ* A JEJICH VLIV NA LIDSKÉ CHOLINESTERASY

Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Anna Hošťálková, Ph.D.

Vedoucí katedry: Ing. Lucie Cahlíková, Ph.D.

Hradec Králové, květen 2017

Jana Puzyrevská

## **Poděkování**

Děkuji PharmDr. Anně Hošťálkové, Ph.D., za veškerou pomoc, materiály a cenné rady poskytnuté během vypracování diplomové práce. Dále bych ráda poděkovala prof. RNDr. Lubomíru Opletalovi, CSc. za pomoc při izolaci alkaloidů a za změření jejich biologických aktivit, doc. PharmDr. Jiřímu Kunešovi, Ph.D. za provedení hmotnostní analýzy a za změření a interpretaci NMR spekter a celému kolektivu Katedry farmaceutické botaniky a ekologie za příjemné pracovní prostředí.

## Prohlášení

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

Tato práce byla zpracována za podpory Specifického vysokoškolského výzkumu SVV 260 412.

V Hradci Králové, květen 2017

.....

Jana Puzyrevská

## Obsah

1. Úvod .....	8
2. Cíl práce.....	9
3. Teoretická část .....	10
3.1. Demence.....	10
3.1.1. Vaskulární demence .....	10
3.1.2. Demence s Lewyho tělísky .....	10
3.1.3. Frontotemporální demence .....	11
3.1.4. Sekundární demence.....	11
3.1.5. Alzheimerova choroba .....	11
3.2. Čeleď Papaveraceae .....	18
3.2.1. Obecná charakteristika.....	18
3.2.2. <i>Glaucium flavum</i> Crantz .....	18
4. Experimentální část.....	28
4.1. Použitý materiál.....	28
4.1.1. Chemikálie .....	28
4.1.2. Rozpouštědla .....	28
4.1.3. Vyvíjecí soustavy .....	29
4.1.4. Chromatografické adsorbenty .....	29
4.1.5. Pomocný materiál .....	29
4.1.6. Detekční činidla .....	29
4.1.7. Přístroje .....	30
4.2. Všeobecné postupy .....	30
4.2.1. Příprava rozpouštědel .....	30
4.2.2. Příprava litých desek .....	31
4.2.3. Preparativní TLC .....	31

4.2.4.	Eluce alkaloidů.....	31
4.2.5.	Odpařování.....	31
4.2.6.	Sušení .....	31
4.2.7.	Hmotnostní spektrometrie s elektronovou ionizací .....	31
4.2.8.	NMR analýza.....	32
4.2.9.	Stanovení optické otáčivosti .....	33
4.2.10.	Stanovení inhibiční aktivity alkaloidů vůči lidské AChE a BuChE.....	33
4.3.	Izolace alkaloidů .....	33
4.3.1.	Extrakce drogy.....	33
4.3.2.	Izolace alkaloidů .....	34
5.	Výsledky .....	37
5.1.	Strukturní analýza alkaloidů .....	37
5.1.1.	Strukturní analýza (+)-katalinu .....	37
5.1.2.	Strukturní analýza (+)- <i>N</i> -methyllaurotetaninu.....	38
5.1.3.	Strukturní analýza (-)-norchelidoninu .....	39
5.1.4.	Strukturní analýza protopinu .....	40
5.2.	Výsledky stanovení biologické aktivity .....	41
6.	Diskuse .....	42
8.	Abstrakt.....	44
9.	Abstract.....	45
7.	Literatura.....	47

## Seznam použitých zkratek

ACh	Acetylcholin
AChE	Acetylcholinesterasa
AICD/AID	Intracelulární doména amyloidového prekurzorového proteinu/amyloidová intracelulární doména
APP	Amyloidový prokurzorový protein
ATP	Adenosintrifosfát
A $\beta$	$\beta$ -Amyloid
Bcl-2	Člen rodiny proteinů regulujících apoptózu
BDNF	Mozkový neurotrofní faktor
BuChE	Butyrylcholinesterasa
CNS	Centrální nervový systém
CoA	Koenzym A
COX-2	Cyklooxygenasa-2
CTF	Fragment s koncovým uhlíkem
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
GABA	Kyselina $\gamma$ -aminomáselná
HDL	Lipoprotein s vysokou hustotou
HMGCR	3-Hydroxy-3-methyl-glutaryl-koenzym A reduktasa
HSF1	Faktor tepelného šoku 1
ChAT	Cholin acetyltransferasa
IC <sub>50</sub>	Koncentrace způsobující 50% inhibici enzymu
IL	Interleukin
LDL	Lipoprotein s nízkou hustotou
MAPK	Mitogenem aktivovaná proteinkinasa
MS (EI)	Hmotnostní spektrometrie s elektronovou ionizací
NFTs	Neurofibrilární klubka
NF- $\kappa$ B	Jaderný faktor $\kappa$ -B
NMDA	<i>N</i> -Methyl- <i>D</i> -aspartátový
NMR	Nukleární magnetické rezonance
PI3K/Akt	Vnitrobuněčná signální dráha pro apoptózu

PPAR	Receptory aktivované proliferátory peroxizomů
RAGE	Receptory pro konečné produkty glykace
ROS	Reaktivní kyslíkové částice
sAPP $\alpha/\beta$	Extracelulární proteiny uvolněné po štěpení amyloidového prekurzorového proteinu $\alpha/\beta$ -sekretásou
sp. (spp.)	Druh (druhy)
TLC	Tenkvrstvá chromatografie
TNF- $\alpha$	Tumor nekrotizující faktor $\alpha$
VACHT	Vesikulární acetylcholinový transportér
VEGFA	Vaskulární endoteliální faktor

## 1. Úvod

Léčba bylinami je tak stará, jako lidstvo samo. V dávných dobách, kdy lidé neznali podstatu nemocí ani účinků rostlin, byl jejich výběr založen pouze na pokusech a omylech, později na zkušenostech starších. Postupem času přibývaly znalosti o chorobách i možnostech jejich terapie, léčitelé začali rostliny kombinovat a upravovat do nejrůznějších lékových forem. První velké změny přinesl v 16. století Paracelsus, který začal používat jednoduché anorganické sloučeniny, skutečný přelom lékařství však nastal až v 19. století. Nové laboratorní metody umožnily izolaci čistých účinných látek, proběhly první pokusy s obměňováním jejich struktury a ve stejné době se značně rozšířila i výroba zcela syntetických organických molekul [1]. Navzdory obrovským možnostem chemické syntézy léčiv zůstává příroda nejvýznamnějším zdrojem nových molekul, 61 % nových aktivních látek, uvedených na trh v 90. letech 20. století a na počátku století 21., pocházelo z rostlin, hub nebo bakterií, nebo bylo alespoň jejich metabolity inspirováno. Přestože probíhá intenzivní výzkum, většina druhů rostlin zůstává fytochemicky neprozkoumána, údaje o biologické aktivitě jejich metabolitů taktéž chybí, dá se tedy předpokládat, celá řada účinných molekul na své objevení teprve čeká [2].

Při hledání nových léčiv se vědci často zaměřují na rostliny, které jsou využívány v tradičních medicínách, což svědčí o obsahu aktivních látek. Mezi takové rostliny patří i rohatec žlutý (*Glaucium flavum* Crantz), jehož prášková semena se používají jako laxativum, odvar z nati slouží coby antitusikum, latex odstraňuje bradavice, má antiseptické účinky a podporuje hojení drobných ran [3]. U některých alkaloidů, které byly z rohatce dříve izolovány, již bylo zjištěno působení proti Alzheimerově chorobě, například u koptisinu [4,5], chelerytrinu [6] a chelidoninu [7]. Předběžné testy ukázaly, že alkaloidní extrakt vykazuje aktivitu vůči cholinesterasám ( $IC_{50} = 6,81 \pm 0,51 \mu\text{g/ml}$  vůči AChE,  $IC_{50} = 13,18 \pm 1,11 \mu\text{g/ml}$  vůči BuChE), a proto byl tento druh vybrán k dalšímu zkoumání.



## 2. Cíl práce

Cílem této práce bylo:

- Izolovat jednotlivé alkaloidy nati *Glaucium flavum* Crantz.
- Určit strukturu alkaloidů.
- Stanovit optickou otáčivost alkaloidů s chirálním centrem.
- Vyhodnotit biologickou aktivitu alkaloidů.

### 3. Teoretická část

#### 3.1. Demence

Pojmem demence označujeme soubor symptomů, které narušují schopnost pacienta žít normálním životem, a které zahrnují částečnou až úplnou ztrátu paměti a schopnosti uvažování [8], poruchy osobnosti, změny nálad, potíže s vyjadřováním a porozuměním a také neschopnost vykonávat běžné úkony [9]. Výskyt demence úzce souvisí s věkem, trpí jí 3-7 % osob starších 65 let, 15 % starších 75 let a 20-40 % osob nad 80 let. Podle příčiny rozlišujeme celkem 7 druhů demence, a to Alzheimerovu chorobu, vaskulární demence, demence smíšené, demence s Lewyho tělísky, demence spojené s Parkinsonovou chorobou, frontotemporální demence a demence sekundární [10].

##### 3.1.1. Vaskulární demence

Vaskulární demence vzniká v důsledku poškození cév, které následně nejsou schopny zásobovat mozkovou tkáň dostatečným množstvím kyslíku. Dochází ke zvýšenému odumírání mozkových buněk až k velmi malým infarktům, které se samy o sobě nemusí projevit žádnými symptomy, mají ale kumulativní efekt. Pokles kognitivních funkcí má velmi rychlý nástup a bývá doprovázen silnou depresí, změnami nálady a epilepsií [9]. Vaskulární demence se objevuje u 15-30 % pacientů postižených demencí [10].

##### 3.1.2. Demence s Lewyho tělísky

Tento typ demence je spojen s výskytem mikroskopických ložisek proteinu  $\alpha$ -synukleinu - Lewyho tělísek - v mozkové kůře. Dále jsou patrné nižší hladiny acetylcholinu a dopaminu, úbytek spojení mezi neurony a jejich odumírání. Souvislost těchto jevů s výskytem Lewyho tělísek však nebyla dosud objasněna. U pacientů jsou pozorovány symptomy Alzheimerovy i Parkinsonovy choroby (která je také spojena s výskytem Lewyho tělísek, v tomto případě jsou však koncentrována do *substantia nigra*), objevují se také zrakové a sluchové halucinace, pohybové obtíže, problémy se spánkem, ztráta čichu a další. Tento druh demence postihuje 10-15 % nemocných [11].

### **3.1.3. Frontotemporální demence**

Příčiny frontotemporální demence neboli Pickovy choroby jsou obdobné jako u Alzheimerovy choroby, onemocnění ale propuká dříve, obvykle mezi 40. a 60. rokem života, a postižení je více lokalizované. Pacienti netrpí tak častými výpadky paměti, ale jen obtížně přizpůsobují svou náladu okolnostem, pročež působí sobecky a necitlivě [9]. Vyskytuje se u 3-5 % případů [10].

### **3.1.4. Sekundární demence**

Tyto demence jsou způsobeny například nadužíváním ethanolu, léky, hypofunkcí štítné žlázy, infekcemi centrálního nervového systému nebo poškozením mozku při úrazech. Při včasné a správné diagnóze je v některých případech možné onemocnění zcela zvrátit. Do této kategorie spadá 5-10 % demencí [10].

### **3.1.5. Alzheimerova choroba**

Alzheimerova choroba je progresivní neurodegenerativní onemocnění, spojené s postupným zhoršováním kognitivních funkcí. Jedním z prvních příznaků bývá zhoršení krátkodobé paměti, později se přidává také ztráta paměti dlouhodobé, zmatenost, poruchy řeči a spánku a změny nálady [12]. Ačkoliv pravá příčina onemocnění dosud nebyla objasněna, byla popsána celá řada patologických procesů, které onemocnění doprovázejí, například nadměrná tvorba A $\beta$ , jeho agregace a vznik senilních plaků, vytvoření neurofibrilárních klubek z hyperfosforylovaného proteinu  $\tau$ , glykace proteinů, tvorba volných radikálů, mitochondriální dysfunkce, zánět neuronů, porucha metabolismu acetylcholinu, nedostatek neurotrofních faktorů a poruchy přenosu na NMDA receptorech [13]. Alzheimerova choroba je příčinou více než 50 % případů demence [10].

#### **3.1.5.1. Etiopatogeneze**

##### **Cholinergní hypotéza**

Neurotransmitterem cholinergních buněk je ACh, a to na periférii i v CNS, kde se nachází zejména v předním mozku, hippokampu, thalamu a mozkové kůře. Cholinergní systém reguluje uvolňování celé řady neurotransmiterů, například glutamátu, GABA, dopaminu

nebo serotoninu a díky tomu ovlivňuje pozornost, schopnost učení, paměť, spánek a vědomí, odpověď na stres, smyslové vnímání a neurogenezi [12].

Syntéza ACh probíhá v cytoplasmě cholinergních neuronů. Enzym ChAT syntetizuje ACh z cholinu (jehož hlavním zdrojem je potrava) a acetyl-CoA (vytvořeného v mitochondriích). Následně je ACh transportován VACHT z cytosolu do synaptických vezikul. Po depolarizaci cholinergního neuronu dojde k uvolnění ACh z vezikul do synaptické štěrby, kde ACh aktivuje muskarinové nebo nikotinové receptory. Poté je inaktivován AChE, uvolňuje se cholin a acetát. Cholin je aktivními transportními systémy přenesen zpět do presynaptického neuronu, kde je použit k syntéze nového ACh. Reuptake cholinu je většinou limitujícím krokem syntézy ACh [12].

Poškození cholinergní transmise je jedním z prvních patologických procesů, který se u Alzheimerovy choroby objevuje. Dochází k omezení vstupu prekurzorů pro syntézu ACh do neuronů, snížení syntézy i uvolňování ACh do synapsí, na periférii amyloidních plaků se zvyšuje aktivita AChE, navíc se do odbourávání ACh zapojuje také BuChE [13]. Deficit v cholinergním systému způsobuje poruchy paměti, pozornosti, schopnosti rozhodování a učení a mohou být příčinou deprese a apatie, které Alzheimerovu chorobu běžně doprovázejí [12].

### **Amyloidní hypotéza**

$\beta$ -Amyloid vzniká štěpením APP, transmembránového glykoproteinu, který se ve vysoké míře vyskytuje v lidských nervových tkáních, kde se podílí na jejich vývoji a na odpovědi na stres či zranění CNS. Štěpení APP může probíhat dvěma cestami, neamyloidní a amyloidní [8].

Při neamyloidní cestě enzym  $\alpha$ -sekretasa štěpí APP na mimobuněčný rozpustný fragment sAPP $\alpha$ , důležitý pro neurogenezi, plasticitu synapsí a paměť, a na CTF83, který je dále štěpen  $\gamma$ -sekretasou za vzniku nitrobuněčného peptidu AICD/AID a malého peptidu p3. AICD/AID se podílí na transkripci některých genů, ovlivňuje intracelulární homeostázu  $\text{Ca}^{2+}$  a ATP, kontroluje neuronální síť, stabilizaci mikrotubulů, buněčnou smrt a transkripci  $\text{A}\beta$ -degradačního enzymu neprilysinu [8].

Během amyloidní cesty dochází k štěpení APP  $\beta$ -sekretasou za tvorby rozpustného extracelulárního fragmentu sAPP $\beta$ , důležitého pro adhezi buněk, růst axonů a diferenciaci neuronů, a CTF99, který je dále štěpen  $\gamma$ -sekretasou na AICD/AID a A $\beta$  [8].

$\beta$ -Amyloid se vytváří v endoplasmatickém retikulu, Golgiho aparátu nebo endosomálně-lysosomálních systémech a následně je exocytózou transportován do extracelulárního prostoru. Obvykle se skládá z 39-43 aminokyselin, nejběžnější je A $\beta_{40}$ , který má jen malou tendenci k agregaci, naopak méně zastoupený A $\beta_{42}$  je velmi náchylný k tvorbě oligomerů, protofibril, fibril a následně plaků. I u zdravých jedinců se A $\beta$  vyskytuje v mozku již od narození, a to jak ve formě rozpustných monomerů, tak i v různých stupních agregace. Jeho nízké koncentrace příznivě ovlivňují aktivitu synapsí a paměť, přičemž různé formy jsou schopné vazby na různé typy receptorů. Množství A $\beta$  je řízeno aktivitou neuronů a synapsí [8].

Podle starší amyloidní teorie začíná Alzheimerova choroba poruchou metabolismu APP. Dochází ke zvýšení množství A $\beta$ , jeho agregaci na neurotoxické oligomery až polymery, ze kterých se formují senilní plaky. Důsledkem je oxidační stres, poškození homeostázy Ca<sup>2+</sup> a hyperfosforylace proteinu  $\tau$ , nezbytného pro správnou funkci cytoskeletu. Takto poškozený protein  $\tau$  se uvnitř buněk skládá do neurofibrilárních klubek. Důsledkem je změna struktury tubulinu a narušení cytoskeletu, které vede k apoptóze. Kromě toho v mikrogliových buňkách na okraji amyloidních plaků probíhá zánět, dochází k uvolňování ROS, úbytku ATP a nakonec také k apoptóze [13]. Narušena je i funkce synapsí. Všechny tyto změny společně vedou ke vzniku demence. Objevuje se však řada důkazů, že tato teorie není zcela přesná, například výskyt plaků i u osob s normálními kognitivními funkcemi, dále skutečnost, že nebyla objevena souvislost mezi množstvím plaků A $\beta$  a závažností onemocnění, zatímco úbytek synapsí, množství NFTs a aktivace mikroglíí s úbytkem kognitivních funkcí korelují; kromě toho se tyto znaky neurodegenerace objevují nezávisle na výskytu plaků. Podezření vyvolává i neúspěšnost dosavadních klinických pokusů s látkami, které snižují hladinu A $\beta$  [14].

Podle novější teorie je kumulace A $\beta$  pouze výsledkem kompenzačních mechanismů. Pokud A $\beta$  nemůže vykonávat své fyziologické funkce, například kvůli rezistenci receptorů, pomocí

negativní zpětné vazby dojde ke zvýšení jeho tvorby. Pokud však tento stav trvá dlouhodobě, dochází k vyčerpání buněk. Nicméně k ověření této teorie je potřeba provést další studie [8].

### **3.1.5.2. Farmakologická léčba**

#### **Kognitiva**

Lehké až středně těžké formy onemocnění jsou léčeny inhibitory AChE a BuChE. Tato léčiva jsou považována za bezpečná a dobře snášená, z nežádoucích účinků se jen vzácně objevuje zvracení, průjem a nauzea. Kontraindikovány jsou u aktivní vředové choroby a těžšího postižení převodního srdečního systému, opatrnosti je třeba též u sinusové bradykardie. Pro úspěšnou terapii je důležité zahájit podávání těchto léčiv co nejdříve. V České republice se využívá donepezil, rivastigmin a galanthamin [9].

Donepezil je téměř čistý inhibitor AChE s dlouhým biologickým poločasem. Podává se obvykle jedenkrát denně v dávce 5 mg první měsíc, poté 10 mg. Donepezil je pacienty dobře tolerován, mírné nežádoucí účinky se objevují zejména při podávání vyšších dávek. Jeho podávání je přínosné také pro pacienty v těžších stádiích nemoci [9].

Další látkou z této skupiny je rivastigmin, inhibitor obou enzymů. Podává se ve dvou denních dávkách, které je třeba navyšovat postupně, maximum činí 12 mg denně [9]. Vysoké dávky léčiva sice vedou ke zlepšení kognitivních funkcí, jsou však spojeny s vyšším výskytem nežádoucích účinků, zejména nauzeou, průjemem, zvracením a závratěmi. Protože jsou tyto nežádoucí účinky způsobeny zejména výkyvy v hladině ACh, byly vyvinuty transdermální náplasti, které rivastigmin uvolňují postupně po dobu 24 hodin. Tato léková forma vykazuje srovnatelnou efektivitu s perorálním podáváním, výskyt nežádoucích účinků poklesl až o dvě třetiny [15]. Právě díky nižším nežádoucím účinkům a jednoduché aplikaci náplastí se zlepšila compliance pacientů, jejich ošetřovatelé i lékaři proto začali tuto lékovou formu upřednostňovat [9].

V terapii je dále využíván galanthamin, inhibitor AChE a zároveň agonista nikotinových receptorů. Užívá se nejvýše 24 mg denně, rozdělených do dvou dávek [9]. Vzhledem ke stejným nežádoucím účinkům, jaké doprovází terapii rivastigminem, je v současné době vyvíjena také transdermální náplast s galanthaminem [15].

## **Antagonisté NMDA receptorů**

Memantin, v současnosti jediný lék s tímto mechanismem účinku, se využívá pro terapii středně těžkých až těžkých forem demence. Podává se jedenkrát denně, maximálně 10 mg [10]. Memantin bývá velmi dobře snášen, výskyt nežádoucích účinků, zejména závratí, bolestí hlavy a zmatenosti, je srovnatelný s placebem [9].

### **3.1.5.3. Rostliny a jejich metabolity potenciálně využitelné v terapii Alzheimerovy choroby**

Rostliny, houby, řasy i mořské organismy jsou v současné době velmi intenzivně zkoumány ve snaze nalézt účinné látky, které by mohly sloužit přímo pro terapii Alzheimerovy choroby, nebo jako vzorové struktury pro vývoj částečně či zcela syntetických léčiv. Největší pozornost je věnována látkám, které inhibují AChE, opomíjeni však nejsou ani antagonisté NMDA receptorů, ani metabolity s jinými mechanismy účinku. Mnohé studie poskytují velmi slibné výsledky, většina experimentů je však prováděna *in vitro*, pro zjištění skutečné účinnosti je tedy třeba provést další pokusy [13].

#### **Plavuně**

*Huperzia serrata* je původním zdrojem (-)-huperzinu A, velmi dobře tolerovaného selektivního inhibitoru AChE, který významně zlepšuje kognitivní funkce. V Číně se již huperzin v terapii používá, v Evropě a v USA probíhá 2. fáze klinického testování. Jeho získávání z přírodních zdrojů je komplikované, v současnosti se proto vyrábí méně účinná syntetická racemická směs, zároveň se studuje možnost biotechnologické výroby pomocí houby *Shiraia* sp. SIF14 [13].

#### **Nahosemenné rostliny**

*Ginkgo biloba* ovlivňuje průběh Alzheimerovy choroby celou řadou mechanismů. Její extrakt zlepšuje paměť díky inhibici NMDA receptorů, zvyšuje počet ChAT-pozitivních neuronů, působí antioxidantně a podporuje činnost  $\alpha$ -sekretas. Terpen ginkgolid A inhibuje hyperfosforylaci proteinu  $\tau$ , zatímco ginkgolid B chrání neurony před apoptózou zvýšením produkce BDNF, který působí proti tvorbě volných radikálů [13]. Je prokázáno, že používání standardizovaného extraktu EGb 761® významně zlepšuje kognitivní funkce pacientů i jejich

schopnost vykonávat běžné činnosti, nežádoucí účinky se přitom neliší od placeba [16]. Podávání *G. biloby* je prospěšné i pro pacienty, kteří jsou léčeni inhibitory AChE [13].

### **Krytosemenné rostliny – jednoděložné**

*Allium sativum* obsahuje diallyl disulfid a S-allylcystein, které zesílením činnosti  $\alpha$ -sekretas snižují tvorbu A $\beta$ , dále snižují jeho toxicitu a brání jeho agregaci; součástí účinku je pravděpodobně také antioxidační efekt [13].

*Curcuma longa* se používá zejména jako koření, nicméně její neuroprotektivní účinek je také dobře známý. Kurkuminoidy v závislosti na dávce brání agregaci A $\beta$ , snižují toxicitu již vytvořeného A $\beta$ , působí antioxidačně, zvyšují aktivitu ChAT a brání zánětu příznivým ovlivněním hladin IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  a NO a snížením exprese COX-2 a NF- $\kappa$ B [13].

Některé isochinolinové alkaloidy z *Hippeastrum* spp., například montanin, silně inhibují AChE [17].

### **Krytosemenné rostliny – dvouděložné**

*Angelica sinensis* brání hyperfosforylaci proteinu  $\tau$  a působí protizánětlivě [13].

*Camellia sinensis* patří mezi rostliny s nejvýznamějším účinkem proti poškození mozku stárnutím a degenerativními procesy. Obsažené flavanoly a polyfenoly snižují tvorbu A $\beta$ , chelatují kationty, vykazují protizánětlivý i antioxidační efekt a brání glykaci proteinů [13].

*Cocculus pendulus* obsahuje alkaloidy, které významně inhibují AChE a BuChE [13].

*Coptis chinensis* má také pozitivní vliv na neurodegenerativní onemocnění. Obsahuje katechiny s antioxidačními účinky [13] a isochinolinové alkaloidy, z nichž nejdůležitější je berberin, který inhibuje AChE, brání apoptóze nervových buněk, zlepšuje mikrocirkulaci v mozku, má neuroprotektivní účinky [18] a vykazuje inhibiční aktivitu vůči  $\beta$ -sekretase [13].

Isochinolinové alkaloidy z hlíz *Corydalis cava*, například (+)-kanadalin nebo (+)-kanadin, inhibují AChE i BuChE [19].

Rostliny rodu *Cryptocarya* obsahují alkaloidy, které inhibují zejména BuChE; nejvýznamnější z nich je 2-methoxyaterosperminin 8 [20].



*Glycine max* působí díky obsahu isoflavonoidů proti glykaci proteinů, zatímco její fytoestrogeny zvyšují aktivitu ChAT. Známy je také její antioxidační účinek [13].

*Glycyrrhiza glabra* je zdrojem flavonoidu isolikviricigeninu, který chrání před A $\beta$  neurotoxicitou, působí proti apoptóze, brání tvorbě ROS, podporuje růst neuronů a antagonizuje NMDA receptory [13].

*Chelidonium majus* tvoří isochinolinové alkaloidy, které inhibují AChE i BuChE. Nejvýznamnější aktivita byla naměřena u chelidoninu [7].

*Olea europea* obsahuje glykosid oleuropein, který brání agregaci A $\beta$ , zejména na jejím počátku [13].

Fenolické sloučeniny obsažené v *Paeonia suffruticosa* brání agregaci A $\beta$ , zlepšují paměť, působí protizánětlivě, vasodilatačně a neuroprotektivně [13].

*Panax ginseng* chrání neurony před toxicitou A $\beta$  a glutamátu, snižuje peroxidaci lipidů, má antioxidační, protizánětlivé a antiapoptotické účinky, inhibuje NMDA receptory, působí jako agonista PPAR $\gamma$  transkripčního faktoru, antagonizuje RAGE a tím ovlivňuje hyperpermeabilitu podocytů a snižuje také aktivaci mikroglií [13].

*Salsola oppositifolia*, *S. soda* a *S. tragus* obsahují tetrahydroisochinolinové alkaloidy. Jejich extrakty působí antioxidačně a inhibují BuChE, *S. oppositifolia* ovlivňuje také AChE [21].

Rod *Salvia* také obsahuje látky se slibnou aktivitou. *Salvia miltiorhizza* ovlivňuje činnost  $\alpha$ -sekretas, což vede ke snížení tvorby A $\beta$  a zlepšení paměti a stejně jako *S. officinalis* chrání neurony před toxickým působením A $\beta$ . Další zástupce, *S. candelabrum*, inhibuje AChE a BuChE [13].

*Scutellaria baicalensis* tvoří protizánětlivé flavonoidy wogonin a baikalein, který navíc působí proti agregaci A $\beta$  [13].

Extrakt z kořene *Stephania rotunda*, který obsahuje 8 alkaloidů, významně inhibuje AChE [22].

## 3.2. Čeleď Papaveraceae

### 3.2.1. Obecná charakteristika

Do čeledi makovité řadíme celkem 44 rodů a 760 druhů rostlin, z nichž většina se vyskytuje na severní polokouli. Obvykle jsou to jednoleté až vytrvalé byliny, ale patří sem také dřevnaté keře a nízké tropické stromy. Jejich oboupohlavní květy bývají velké, pravidelné, miskovitého tvaru, s jediným vyšším pestíkem a mnoha tyčinkami. Skládají se ze dvou až tří oddělených listů kališních a čtyř až dvanácti lístků okvětních. Jejich plody, kulaté až podlouhlé tobolky, obsahují mnoho drobných kulatých semen, která jsou při pohybu rostliny ve větru uvolňována do okolí z otvorů na vrcholku tobolek. Listy mohou být jednoduché, dělené i zpeřené. Některé rody mají také trny. Stonky s mléčnicemi obsahují často barevný latex s isochinolinovými alkaloidy. Tyto rostliny jsou využívány v potravinářství, ve farmacii i pro okrasné účely [23]. Z hlediska obsahu biologicky aktivních látek jsou nejdůležitější zástupci *Papaver somniferum* L., *Papaver rhoeas*, *Chelidonium majus* L. a *Sanguinaria canadensis* L. [2].

### 3.2.2. *Glaucium flavum* Crantz



Obr. 1 *Glaucium flavum* Crantz [24]

Název tohoto rodu, *Glaucium*, je odvozen z řeckého slova „*glaucos*“ – sivý, podle šedozeleňého ojínění listů [26].

#### **3.2.2.1. Synonyma**

Latinská jména: *Chelidonium glaucium* L., *Glaucium luteum* Scop., *Glaucium fulvum* Sm.

Česká jména: rohatec žlutý, mák růžkovatý, růžkovatec žlutý [25]

#### **3.2.2.2. Rozšíření**

*Glaucium flavum* Crantz se přirozeně vyskytuje na slunných sušších místech, jako jsou kamenité stráně a meze v jižní a západní Evropě a střední Asii. Tento druh se rozšířil také do Severní Ameriky a dalších míst. Vzácně se pěstuje jako okrasná rostlina [25].

#### **3.2.2.3. Botanický popis**

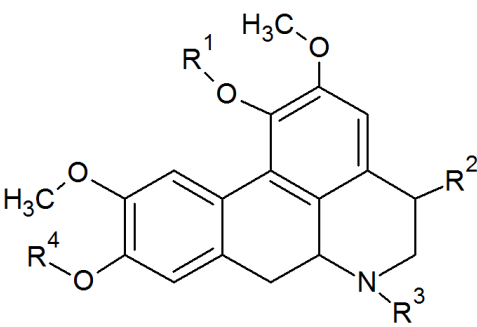
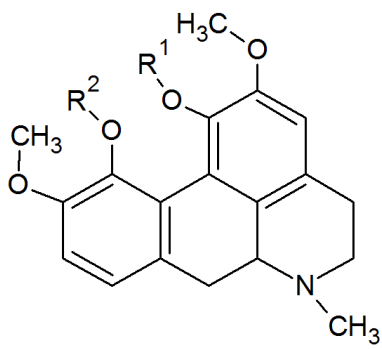
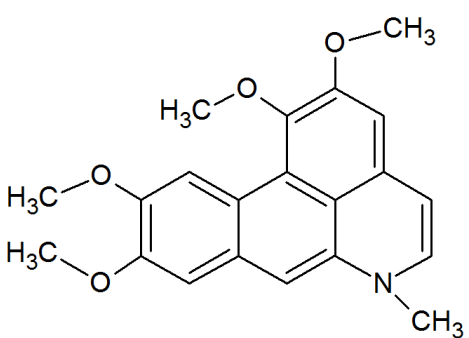
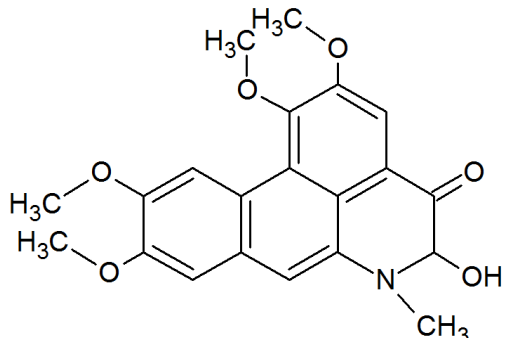
*Glaucium flavum* Crantz je dvouletá až vytrvalá bylina s tuhou, rozvětvenou lodyhou, dorůstající až 50 cm. Má dva druhy listů; bazální, podlouhle obráceně vejčité, lyrovitě laločnaté až lyrovitě střížené, s nepravidelnými ostrými zoubky, a proximální, přisedlé, objímavé, laločnaté až střížené. Květy jsou obvykle žlutě, korunní lístky jsou široce obráceně vejčité, koruna může v průměru dosáhnout až 3,5 cm [25]. Kvete od června do srpna [26]. Jeho plody jsou přímé nebo mírně obloukovitě zakřivené, úzce válcovité, bradavičnaté, lysé tobolky [25].

#### **3.2.2.4. Obsahové látky**

Dosud bylo z rohatce žlutého izolováno 31 alkaloidů isochinolinového typu. Jedná se o aporfinové alkaloidy dehydroglaucin [27], dihydropontevodrin [28], glaucin [27], glauvin [29], isokorydin [27], isoboldin [27], katalin [28], korydin [30], korytuberin [30], magnoflorin [3], *N*-methyllaurotetanin [31], *N*-methyl-sekoglaucin [27], norglaucin [27], oxoglaucin [32], talikmidin [31], benzofenantridinové alkaloidy bocconolin [3], dihydrochelerythrin [28], dihydrochelirubin [28], dihydrosangvinarin [28], chelerytrin [3], chelirubin [30], norsangvinarin [28], sangvinarin [3], benzylochinolinový alkaloid retikulin [31], fenantridinové alkaloidy chelidonin [3] a norchelidonin [30], ftalidisochinolinový alkaloid

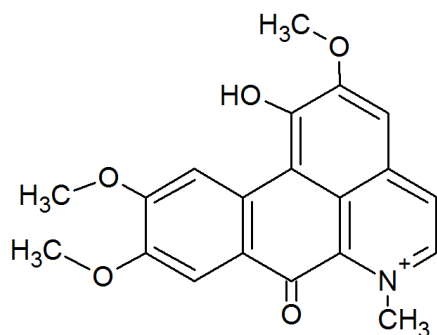
adlumidin [31], morfinanový alkaloid salutaridin [27], protoberberinový alkaloid koptisin [30] a protopinové alkaloidy allokryptopin [27] a protopin [3].

Tab. 1 Strukturní typy alkaloidů izolovaných z rohatce žlutého

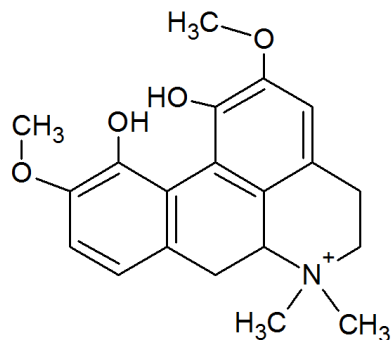
<b>Aporfinový typ</b>					
	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	R <sup>4</sup>	
	Glaucin	-CH <sub>3</sub>	-H <sub>2</sub>	-CH <sub>3</sub>	-CH <sub>3</sub>
	Isoboldin	-H	-H <sub>2</sub>	-CH <sub>3</sub>	-H
	Katalin	-CH <sub>3</sub>	-OH -H	-CH <sub>3</sub>	-CH <sub>3</sub>
	<i>N</i> -Methylaurotetanin	-CH <sub>3</sub>	-H <sub>2</sub>	-CH <sub>3</sub>	-H
	Norglucin	-CH <sub>3</sub>	-H <sub>2</sub>	-H	-CH <sub>3</sub>
	Talikmidin	-H	-H <sub>2</sub>	-CH <sub>3</sub>	-CH <sub>3</sub>
	Isokorydin	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>		
	Korydin	-CH <sub>3</sub>	-OH		
	Korytuberin	-H	-CH <sub>3</sub>		
	Korytuberin	-H	-H		
Dehydroglucin					
					
Dihydropontevedrin					
					

## Aporfinový typ

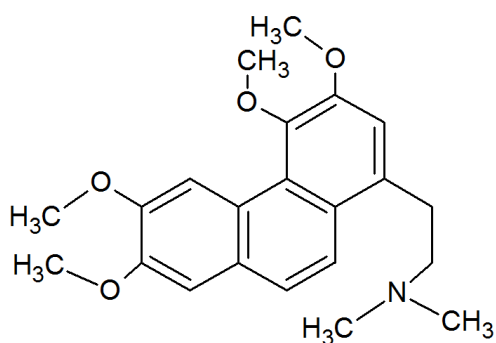
Glauvin



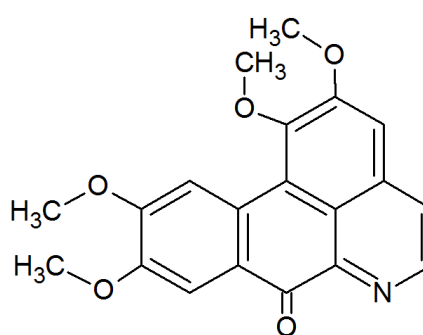
Magnoflorin



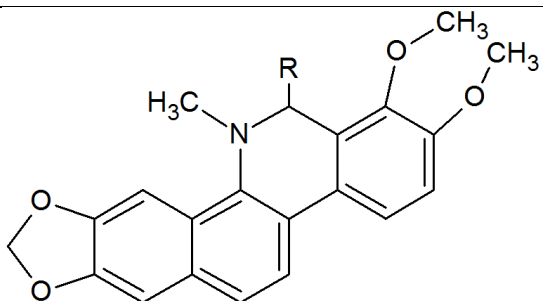
N-Methyl-sekoglaucin



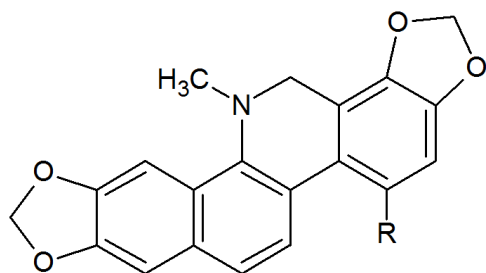
Oxoglaucin



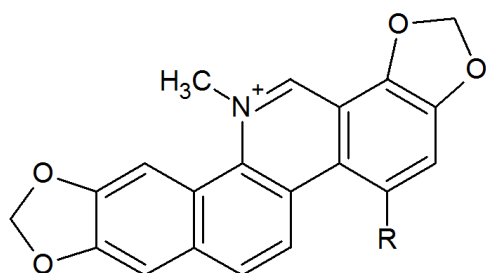
## Benzofenantridinový typ



	R
Bocconolin	-CH <sub>2</sub> OH
Dihydrochelerytrin	-H



	R
Dihydrochelirubin	-OCH <sub>3</sub>
Dihydrosangvinarin	-H



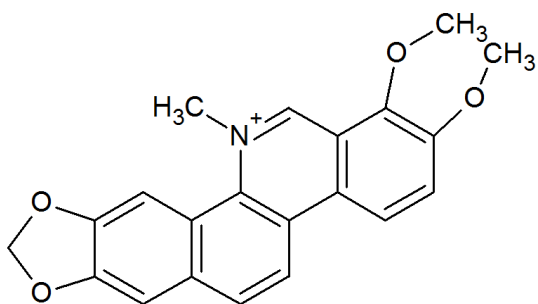
	R
Chelirubin	-OCH <sub>3</sub>
Sangvinarin	-H

---

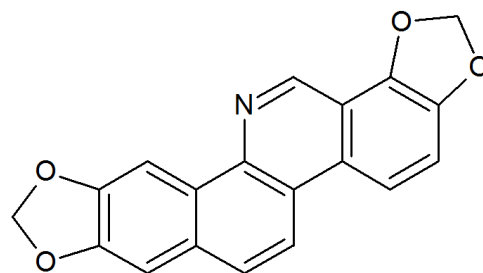
**Benzofenantridinový typ**

---

Chelerytrin



Norsangvinarin

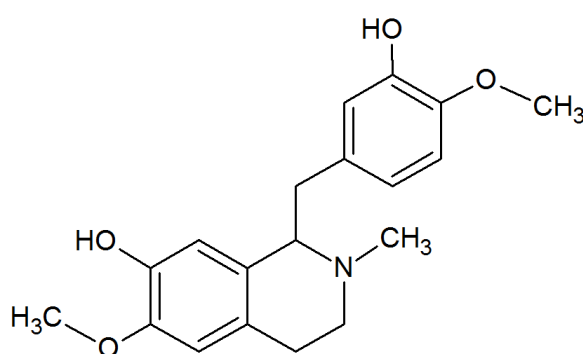


---

**Benzylisochinolinový typ**

---

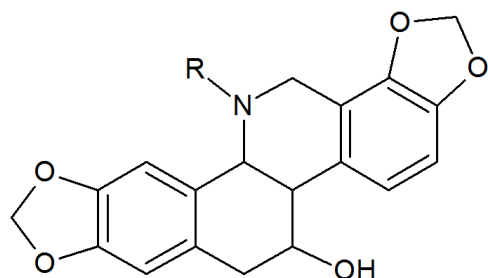
Retikulín



---

**Fenantridinový typ**

---



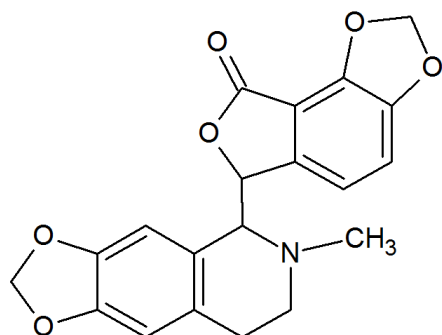
	R
Chelidonin	-CH <sub>3</sub>
Norchelidonin	-H

---

**Ftalidisochinolinový typ**

---

Adlumidin

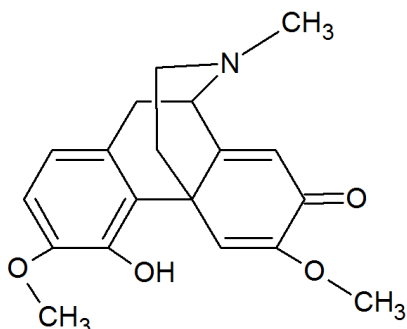


---

### Morfinanový typ

---

Salutaridin

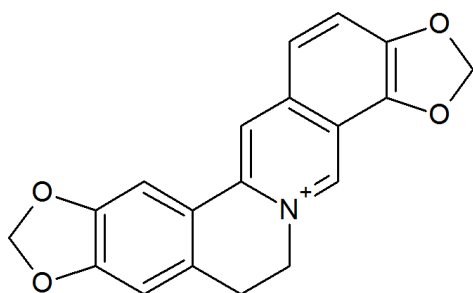


---

### Protoberberinový typ

---

Koptisin

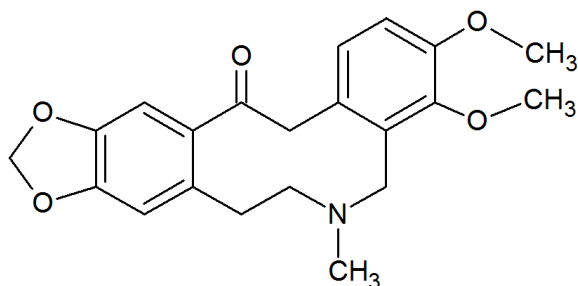


---

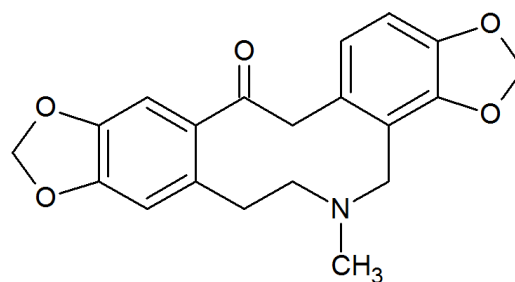
### Protopinový typ

---

Allokryptopin



Protopin



### 3.2.2.5. Biologická aktivita

#### Inhibice AChE a BuChE

U většiny alkaloidů, které již byly z rohatce žlutého izolovány, nebyla dosud inhibice cholinesteras zkoumána, mezi těmi, které byly výzkumu podrobeny, byla značná část látek zcela neaktivní, některé však vykazují velmi zajímavou aktivitu (viz Tab. 2.).

Tab. 2 Aktivita alkaloidů rohatce žlutého vůči AChE a BuChE

Alkaloid	IC <sub>50</sub> [μM]		Literatura
	AChE	BuChE	
Allokryptopin*	250 ± 2,5	530 ± 28,2	[33]
Dihydrosangvinarin*	1000	1000	[34]
Glaucin**	89,0 ± 0,8	-	[38]
Chelerytrin*	1,54 ± 0,007	10,34 ± 0,24	[6]
Chelidonin*	26,84 ± 1,2	31,86 ± 1,4	[7]
Isoboldin	8,4 – 10,0	-	[35]
Isokorydin*	> 1000	657,1	[36]
Koptisin	0,44	0,80	[35]
Korydin*	>100	52 ± 4	[37]
Magnoflorin**	48,6 ± 2,1	-	[38]
Oxoglaucin**	24,5 ± 0,6	-	[38]
Protopin**	10,2 ± 0,3	26,8 ± 3,2	[38]
Retikulin*	509,05 ± 44,25	33,61 ± 3,04	[108]
Salutaridin*	>1000	>1000	[33]

\* humánní AChE a BuChE

\*\* AChE z elektrického úhoře, BuChE z koňského séra

### Další biologická aktivita

**Allokryptopin** má antiarytmické účinky, hlavním mechanismem je blok K<sup>+</sup> kanálů v myokardu [39]. Díky vlivu na α-adrenergní receptory způsobuje také kontrakci svalstva močového měchýře, relaxační účinek na hladké svaly tenkého střeva je důsledkem inhibice fosfodiesteras [40].

U **bocconolinu** byly prokázány antiproliferativní účinky [3].

**Dehydroglaucin** působí antimikrobně [41].



**Dihydrochelerytrin** je cytotoxický – narušuje membránový potenciál mitochondrií a aktivuje kaspasu 3 a 9, což vede k apoptóze [42]. Prokázána je též jeho antifungální [43], antimikrobní [44] a antiparasitická aktivita [45].

**Dihydrosangvinarin** má antifungální [43] a leishmanicidní účinky [46].

Bronchodilatační působení **glaucinu** je způsobeno selektivní inhibicí fosfodiesterasy 4, snížením spontánního i histaminem vyvolaného napětí bronchů a inhibicí  $\text{Ca}^{2+}$  kanálů [47]. Díky snížení exprese NF- $\kappa$ B a inhibici exprese matrixové metalloproteinasy 9 vykazuje protirakovinné účinky [48]. Blokádou  $\alpha_1$ -adrenergních receptorů způsobuje vasorelaxaci [49]. Zaznamenány jsou také protizánětlivé [32] a sedativní účinky [50]. Může též vyvolávat halucinace [50].

**Chelerytrin** ovlivňuje patologické procesy spojené s Alzheimerovou chorobou – kromě již zmíněné inhibice AChE i BuChE brání agregaci A $\beta$  a rozrušuje již vytvořené agregáty [6]. Účinkuje také proti rakovině, a to vazbou na VEGFA, protiapoptotický gen BCL2 a protoonkogen KRAS a snížením jejich transkripce [51], aktivací tumor supresorového genu pro protein p53 [52], snížením exprese cytoprotektivního genu HSF1 [53] a vyvoláním apoptózy prostřednictvím zvýšení tvorby ROS [54] a inhibice  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasy v sarkoendoplasmatickém retikulu, což vede ke ztrátě  $\text{Ca}^{2+}$  homeostázy buňky [55]. Působí také anthelminticky [56], antifungálně [57], antimikrobně [44], antimykobakteriálně [58]. Existují doklady i o jeho analgetickém [59] a protizánětlivém působení [60] a o gastroprotekcii [60]. Díky selektivní modulaci PPAR $\gamma$  receptorů má antidiabetické účinky [61], zároveň poskytuje ochranu proti diabetické kardiomyopatii [62]. Inhibuje proteinkinázu C, což vede k imunosupresi [63]. Dále chrání ledviny před toxickým působením gentamycinu [64].

**Chelidonin** má analgetické, antimikrobiální, protivirové, hepatoprotektivní, choleretické, imunomodulační [65], antiparazitické [66] a antispasmodické a relaxační účinky [67], chrání játra [68] i ledviny před toxickým působením kadmia [69] a snižuje koncentraci dopaminu v CNS [70]. Kromě toho způsobuje apoptózu – inhibuje polymerizaci mikrotubulů, což zastavuje buněčný cyklus ve fázi mitózy – mohl by být využíván v terapii rakoviny [71]. Bohužel také blokuje  $\text{K}^+$  kanály, což může vést ke zpoždění repolarizace srdeční tkáně až k fatální ventrikulární arytmií [72].

**Isoboldin** vykazuje antifungální [73] a antivirové účinky [74].

**Isokorydin** působí antiarytmicky [75], antioxidantně (chelatuje kovy) [76] a antiplasmodiálně [76]. Zastavuje buněčný cyklus ve fázi G2/M, čímž indukuje apoptózu, mohl by tedy ovlivnit také nádorová onemocnění [77].

**Koptisin** by díky svým neuroprotektivním [5] a antioxidantním účinkům a inhibici indoleamin-2,3-dioxygenasy mohl příznivě ovlivňovat průběh Alzheimerovy choroby [4]. Dále působí protizánětlivě – snižuje produkci NO a prozánětlivých cytokinů, brání aktivaci NF-κB, MAPK a PI3K/Akt [78]. Snižuje expresi HMGCoAR a zvyšuje expresi LDL-receptorů, což vede ke snížení hladiny cholesterolu [79], navíc chrání myokard před poškozením ischemií [80]. Má antiproliferativní účinky – zastavuje buněčný cyklus ve fázi G0/G1, snižuje migraci buněk a brání novotvorbě kapilár [81]. Byly zjištěny také účinky antifungální [82] a gastroprotektivní [83].

**Korytuberin** je cytotoxický [84] a má analgetické účinky [84].

**Magnoflorin** působí antifungálně [85]. Díky aktivaci GABA<sub>A</sub> receptorů má anxiolytické [86] a sedativní účinky [86]. Je cytotoxický [87]. Chrání HDL a LDL před oxidací díky inhibici oxidace Cu<sup>2+</sup>, prevenci tvorby kyseliny thiobarbiturátové a ochraně apolipoproteinu B před strukturními modifikacemi [88]. Ochraňuje také erytrocyty před poškozením lysofosfatidylcholinem [89]. Stimuluje sekreci inzulínu, čímž snižuje hladinu glukózy nalačno i po podání glukózového roztoku [90].

**N-Methylaurotetanin** působí antiagregačně, vasodilatačně [91], antivirově [74], inhibuje prolyl oligopeptidasu [92] a snižuje hyperpigmentaci kůže [93].

**Norglaucin** je cytotoxický [94].

**Norsangvinarin** vykazuje antifungální aktivitu [95].

**Oxoglaucin** působí vasorelaxačně [91], protisrážlivě [96] a antivirově [97]. V nízkých dávkách stimuluje imunitní systém, ve vysokých ho tlumí [98].

Nízké dávky **protopinu** působí na nádorové buňky cytotoxicky, zatímco vysoké dávky podporují jejich růst – tento zvláštní jev je patrně zapříčiněn kombinací proapoptotických (zastavení mitózy a spuštění mitochondriemi zprostředkované apoptózy)

a protiapoptotických (ochrana před oxidativním stresem, snížení intracelulárních hladin  $\text{Ca}^{2+}$ , inhibice kaspasy-3) mechanismů [99]. Díky antimigračním [100] a antiinvazním [101] účinkům a schopnosti snížit heterotypickou adhesivitu buněk by mohl najít uplatnění v prevenci tvorby metastáz [3]. Vykazuje také protizánětlivé účinky díky snížení tvorby NO, inhibici exprese COX-2 a snížení tvorby prozánětlivých cytokinů [101]. Prokázána u něj byla také mírná antikonvulzivní aktivita [101]. Díky jeho vasodilatačním [102], protisrážlivým, antioxidačním, antiapoptotickým účinkům a schopnosti snížit hladiny glutamátu a intracelulárního  $\text{Ca}^{2+}$  může protopin chránit mozkovou tkáň před poškozením ischemií [100]. Působí také antibakteriálně [3], antifungálně [100], hepatoprotektivně [3], antihistaminově [100], antidepresivně [101] a analgeticky [100].

**Retikulin** moduluje  $\text{GABA}_A$  receptory [103].

**Salutaridin** inhibuje diferenciaci osteoklastů [104] a působí mírnou vasorelaxací [105].

**Sangvinarin** je zkoumán zejména pro své účinky proti rakovině, které jsou zprostředkovány celou řadou mechanismů – vyvoláním apoptózy, působením proti proliferaci, angiogenezi i proti tvorbě metastáz, interkalací do DNA, inhibicí syntézy ATP v mitochondriích a zastavením aktivity SH-enzymů [106]. Sangvinarin působí také antifungálně, antiparaziticky, pozitivně ionotropně, snižuje krevní tlak a brání srážení krve [107]. V minulosti byl pro své protizánětlivé a antimikrobní účinky a pro schopnost snižovat tvorbu zubního plaku, ale nenarušit přirozenou ústní mikroflóru, přidáván do přípravků na dentální hygienu; jeho užívání však muselo být ukončeno kvůli výskytu leukoplakií. O jeho bezpečnosti panují i další pochybnosti, při *in vitro* testech byla zjištěna hepatotoxicita, kardiotoxicita, genotoxicita, kancerogenita a mutagenita, topické užívání oleje ze semene *Argemone mexicana*, který sangvinarin obsahuje, zvyšuje výskyt nádorů a glaukomu [107].

Pro adlumidin, dihydrochelirubin, dihydropontevodrin, glauvin, chelirubin, katalin, korydin, *N*-methylsekoglaucin, norchelidonin a talikmidin nejsou v literatuře dostupné údaje o biologické aktivitě.

## 4. Experimentální část

### 4.1. Použitý materiál

#### 4.1.1. Chemikálie

- Acetylthiocholin jodid p. a. 10mM roztok (Sigma Aldrich, Praha) (ATChI)
- Butyrylthiocholin jodid p. a. 10 mM roztok (Sigma Aldrich, Praha) (BTChI)
- Diethylamin č. (Ing. Švec – Penta, Praha) (Et<sub>2</sub>NH)
- 5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoová ≥ 98% (Sigma Aldrich, Praha) (DTNB)
- Dusičnan bismutitý zásaditý č. (Lachema, Brno) (Bi(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>)
- Eserin ≥ 98% (N) (Sigma Aldrich, Praha) (Fysostigmin)
- Chlorid rtuťnatý p. a. (Fisher Scientific, Pardubice) (HgCl<sub>2</sub>)
- Jodid draselný č. (Lach-Ner, Neratovice) (KI)
- Kyselina chlorovodíková 35 % p. a. (Ing. Švec – Penta, Praha) (HCl)
- Kyselina vinná p. a. (Balex, Pardubice)
- 5mM fosfátový pufr pH 7,4
- Tetramethylsilan ACS reagent, NMR grade, ≥ 99.9% (Sigma Aldrich, Praha) (TMS)
- Uhličitan sodný bezvodý č. (Ing. Švec – Penta, Praha) (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>)

#### 4.1.2. Rozpouštědla

- Cyklohexan č. (Ing. Švec – Penta, Praha) (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>)
- Diethylether p. a. (Ing. Švec – Penta, Praha) (Et<sub>2</sub>O)
- Ethanol 95 % (Lihovar Chrudim, Chrudim) (EtOH)
- Ethylacetát p. a. (Ing. Švec – Penta, Praha) (EtOAc)
- Chloroform č. (Ing. Švec – Penta, Praha) (CHCl<sub>3</sub>)
- Chloroform deuterovaný pro NMR analýzu chloroform-d 99,8 atom % D (Sigma Aldrich, Praha) (CDCl<sub>3</sub>)
- Methanol deuterovaný pro NMR analýzu c methanol-d<sub>4</sub> 99,8 atom % D (Sigma Aldrich, Praha) (CD<sub>3</sub>OD)
- Methanol HPLC gradient (J. T. Baker, Deventer, Netherlands) (MeOH)
- Toluén p.a. (Ing. Švec – Penta, Praha) (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>CH<sub>3</sub>)

- Trifluoroctová kyselina (Sigma Aldrich, Praha) (TFAA)

#### 4.1.3. Vyvíjecí soustavy

S1: C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>CH<sub>3</sub> + Et<sub>2</sub>NH (96:4)

S2: C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>CH<sub>3</sub> + C<sub>6</sub>H<sub>12</sub> + Et<sub>2</sub>NH (45:45:10)

S3: C<sub>6</sub>H<sub>12</sub> + Et<sub>2</sub>NH (9:1)

S4: CH<sub>3</sub>CN + MeOH + TFAA (40:10:0,1)

S5: C<sub>6</sub>H<sub>12</sub> + EtOAc + Et<sub>2</sub>NH (5:4:1)

S6: C<sub>6</sub>H<sub>12</sub> + EtOAc + Et<sub>2</sub>NH (8:1:1)

#### 4.1.4. Chromatografické adsorbenty

A1: TLC desky Silufol® UV 254 (Kavalier, Votice) 20x20 cm

A2: Silikagel pro přípravu litých vrstev: Silica gel 60 GF<sub>254</sub> (Merck Millipore, Praha)

A3: TLC desky Silikagel Merc UV 254 (Merck Millipore, Praha) 20x20 cm

#### 4.1.5. Pomocný materiál

- Křemelina Celite C 535 John's Manville (Sigma Aldrich, Praha)
- Silikagel sušící perly (Ing. Švec – Penta, Praha)
- Síran sodný bezvodý p. a. (Ing. Švec – Penta, Praha) (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)

#### 4.1.6. Detekční činidla

D1: Pro detekci alkaloidů na chromatografických deskách bylo používáno Dragendorffovo činidlo podle Muniera. Zásobní roztok toho činidla byl připraven smísením roztoku 1,7 g zásaditého Bi(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> a 20,0 g kyseliny vinné v 80,0 ml vody s roztokem 16,0 g KI ve 40 ml vody v poměru 1:1. Zásobní roztok byl uchováván v chladu v tmavé skleněné nádobě. Činidlo pro analýzu bylo připravováno smísením 5,0 ml zásobního roztoku s roztokem 10,0 g kyseliny vinné v 50,0 ml vody [108].

D2: Mayerovo činidlo bylo použito pro ověření přítomnosti alkaloidů během přípravy extraktu vytřepáváním. Do roztoku 5 g KI ve 30 ml vody bylo přidáno 1,35 g práškového  $\text{HgCl}_2$ . Suspenze byla míchána až do rozpuštění sraženiny a vzniku čirého, bezbarvého až světle žlutého roztoku. Činidlo bylo skladováno v chladu [108].

#### 4.1.7. Přístroje

- Knihovna spekter NIST Virtual Library (NIST, Gaithersburg, Maryland, USA)
- Odstředivka Boeco U-32R (Boeco, Hamburg, Germany) s rotorem Hettich 1611 (Hettich, Tuttlingen, Germany)
- pH metr PHM 220 (Radiometer, Copenhagen, Denmark)
- Polarimetr P3000 (A. Krüss Optronic, Hamburg, Germany)
- Reader Synergy™ HT Multi-Detection Microplate Reader (BioTek Instruments, Inc., Winooski, Vermont, USA)
- Spektrometr EI/MS na GC-MS Agilent 7890A GC 5975 inertní MSD; EI mód 70 eV; kolona DP-5 MS (30 x 25 mm x 0,25  $\mu\text{m}$ ) (Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA)
- Spektrometr Varian VNMR S500 (Varian, Palo Alto, California, USA)
- Statistický program GraphPad Prism 5.0 2006 (Graph PaD Software, SanDiego, California, USA)
- Ultrazvuková lázeň Sonorex Super 10P (Bandelin, Berlin, Germany)
- Vakuová odparka Laborota 4000 (Heidolph, Schwabach, Germany)
- Vakuová odparka pro poloprovozní použití Laborota 20 Heidolph (Heidolph, Schwabach, Germany)

## 4.2. Všeobecné postupy

### 4.2.1. Příprava rozpouštědel

Veškerá rozpouštědla byla před použitím přečištěna destilací. Následně byla uchovávána v nádobách z hnědého skla či v plechových kanystrech.

#### **4.2.2. Příprava litých desek**

Desky s litou vrstvou byly připraveny rozprostřením suspenze adsorbentu A2 a vody na skleněné desky. Před použitím byly desky sušeny za pokojové teploty minimálně 24 hodin.

#### **4.2.3. Preparativní TLC**

Dělená směs alkaloidů byla rozpuštěna ve směsi  $\text{CHCl}_3$  + EtOH (1:1) a nanesena na chromatografické desky v linii startu 1 cm od obou okrajů. Po odpaření rozpouštědel z nanášené směsi alkaloidů byla provedena chromatografie ve skleněných komorách, které byly alespoň 20 minut syceny mobilní fází. Po odpaření rozpouštědel byly některé chromatogramy opakovaně vyvíjeny. Pro detekci alkaloidů po dělení bylo používáno Dragendorffovo činidlo, případně UV záření. Zóny byly označeny preparativní jehlou a jednotlivě vyškrábány, zóny se stejným retenčním faktorem ze všech desek byly spojeny [108].

#### **4.2.4. Eluce alkaloidů**

Každá zóna alkaloidů, získaná z TLC, byla smíchána se stejným objemovým množstvím křemeliny Celite 535 a ze silikagelu byla uvolněna promytím směsí chloroform – ethanol 1:1 přes vrstvu vaty. Úplnost eluce byla ověřena Dragendorffovým činidlem.

#### **4.2.5. Odpařování**

Odpařování bylo prováděno na vakuových odparkách při teplotě vodní lázně přizpůsobené typu rozpouštědla.

#### **4.2.6. Sušení**

Sušení alkaloidního extraktu a frakcí v různých fázích zpracování bylo prováděno ve vakuovém exsikátoru nad sušícími perlami silikagelu. Usušený extrakt a frakce byly uchovávány v chladničce.

#### **4.2.7. Hmotnostní spektrometrie s elektronovou ionizací**

Pro stanovení MS (EI) spekter byl použit spektrometr Agilent 7890A GC 5975 v režimu 70 eV. Měření bylo uskutečněno na GC koloně DP-5 MS. Získané hodnoty byly porovnány se spektry

z NIST knihovny a s referenčními spektry alkaloidů dříve získaných pracovní skupinou ADINACO [108].

#### 4.2.8. NMR analýza

NMR spektra byla měřena v roztocích  $\text{CDCl}_3$  případně  $\text{CD}_3\text{OD}$  při teplotě  $25^\circ\text{C}$  na spektrometru Varian VNMR S500. Byly použity frekvence 499,87 MHz pro jádra  $^1\text{H}$  a 125,70 MHz pro jádra  $^{13}\text{C}$ . K ozařování a detekci signálu byla použita širokopásmová dvoukanálová gradientní sonda OneNMR. Chemické posuny byly změřeny jako hodnoty  $\delta$  *pars per milion* (ppm) a byly nepřímo vztaženy k TMS jako standardu pomocí zbytkového signálu rozpouštědla. Hodnoty chemického posunu pro atomy  $^1\text{H}$  byly  $\delta = 3,30$  ppm, pro atomy  $^{13}\text{C}$   $\delta = 49,0$  ppm. Data získaná měřením byla prezentována v tomto pořadí: chemický posun ( $\delta$ ), integrovaná intenzita  $^1\text{H}$  NMR spekter, multiplicita (s: singlet, d: dublet, t: triplet, q: kvartet, dd: dublet dubletů, m: multiplet, bs: široký singlet), interakční konstanta (Hz) [108].

Dvoudimenzionální (2D) NMR experimenty (gCOSY, gHSQC, gHMBC, NOESY) byly změřeny pomocí standardních sekvencí, dodaných firmou Varian. Parametry každého měření byly nastaveny dle množství vzorku, jeho čistoty a molekulové hmotnosti. Pro gHSQC experimenty byl směšovací čas optimalizován na  $^1J_{\text{CH}} = 146$  Hz, pro gHMBC pak na  $^3J_{\text{CH}} = 8$  Hz a pro NOESY na 400-600 ms [108].

gCOSY (gradient Correlation Spectroscopy) je 2D NMR technika, při které se crosspeak objevuje mezi protony, které mají přímé spojení proton-proton přes tři vazby,  $^3J_{\text{HH}}$  [108].

NOESY (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy) je 2D NMR technika, při které se crosspeak objevuje mezi protony, které jsou od sebe vzdáleny maximálně 6 Å, intenzita crosspeak se se zvyšující se vzdáleností protonů v prostoru snižuje [108].

gHSQC (gradient Heteronuclear Single Quantum Coherence) je 2D technika, při které jedna osa představuje  $^1\text{H}$  a druhá  $^{13}\text{C}$ . Crosspeaks představují korelaci H s C vzdálených jednu vazbu, diagonála se při tomto experimentu nevytváří [108].



gHMBC (gradient Heteronuclear Multiple Bond Coherence) je 2D NMR technika, při které je možné určit korelaci C či jiného heteroatomu s H vzdáleným 2-4 vazby. Pouze takto vázané atomy poskytují crosspeak [108].

#### **4.2.9. Stanovení optické otáčivosti**

Pro měření optické otáčivosti byl použit polarimetr P3000. Měření proběhlo v roztocích alkaloidů. Specifická otáčivost byla vypočtena dle vzorce  $[\alpha]_D^t = (100 \times a)/(c \times l)$ , kde t značí teplotu měření [°C], D sodíkovou D čáru (589,3 nm),  $\alpha$  naměřenou otáčivost [°], c koncentraci alkaloidu [ $\cdot 100$  g/ml], l délku kyvety [dm] [108].

#### **4.2.10. Stanovení inhibiční aktivity alkaloidů vůči lidské AChE a BuChE**

Pro měření byla použita modifikovaná Ellmannova metoda. V jamce mikrotitrační destičky bylo smícháno 8,3  $\mu$ l roztoku enzymového preparátu o určité koncentraci, 283  $\mu$ l 5 mM roztoku DTNB ve fosfátovém pufru pH 7,4 a 8,3  $\mu$ l sledovaného alkaloidu o určité koncentraci v DMSO. Po protřepání mikrotřepačkou byla směs vložena do readru Synergy<sup>TM</sup> HT Multi-Detection Microplate Reader. Následovala 5 minut dlouhá inkubace při teplotě 37 °C. Poté bylo k slepému vzorku přidáno 33,3  $\mu$ l DMSO, k ostatním vzorkům 33,3  $\mu$ l enzymového substrátu AChE či BuChE. Absorbance byla měřena po dobu 2 minut při  $\lambda = 436$  nm pro AChE a  $\lambda = 412$  nm pro BuChE. Každá koncentrace enzymového preparátu byla měřena šestkrát. Hodnota IC<sub>50</sub> byla vypočtena v programu GraphPad Prism [108].

### **4.3. Izolace alkaloidů**

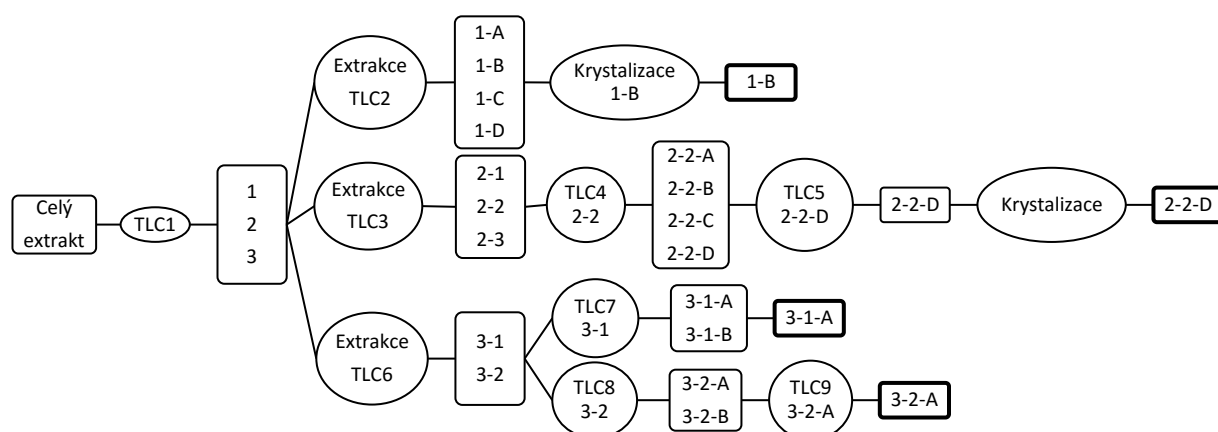
#### **4.3.1. Extrakce drogy**

Příprava extraktu nebyla předmětem této diplomové práce, byla provedena prof. RNDr. Lubomírem Opletalem, CSc. 800 g suché řezané kvetoucí nati AL-536 bylo dvakrát extrahováno šestinásobným množstvím 95% EtOH 15 minut za varu. Po filtraci byly extrakty spojeny a odpařeny. K ohřátému odparu bylo přidáno 80 ml 2% HCl a 420 ml vody, směs byla sonikována a po filtraci přes vliselin doplněna vodou do 550 ml. Tento kyselý roztok byl třikrát extrahován 180 ml Et<sub>2</sub>O, organická fáze nebyla dále zpracovávána. Vodný

roztok alkaloidů byl alkalizován 10% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> a následně čtyřikrát vytřepáván 200 ml Et<sub>2</sub>O. Organická vrstva byla oddělena, vysušena Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a odpařena.

Bylo získáno 2,23 g tmavě hnědého, velmi viskózního odparku, ze kterého se vyloučilo malé množství krystalů.

#### 4.3.2. Izolace alkaloidů



Obr. 2 Schéma izolace alkaloidů

Celý alkaloidní odparek (2,23 g) byl nanesen na 199 desek A1 a 2× vyvinut v soustavě S1 (TLC1). Byly separovány 3 zóny (viz Tab. 3.).

Tab. 3 Výsledky preparativní TLC celého alkaloidního extraktu

Frakce	Hmotnost [mg]	Vzhled
1	434,1	Tmavě hnědý, hrubě krystalický
2	1 086,5	Tmavě hnědý, viskózní
3	233,9	Červenohnědý, pevný

### Frakce 1

Odparek frakce 1 (434,1 mg) byl rozpuštěn ve 3 ml 2% HCl a 15 ml vody. Po filtraci přes křemelinu byl třikrát vytřepáván 15 ml Et<sub>2</sub>O. Vodná fáze byla alkalizována 10% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> a třikrát vytřepávána 20 ml Et<sub>2</sub>O. Organická fáze byla vysušena Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, odpařena a zvážena (291 mg). Po rozpuštění byla nanese na 8 skleněných desek A2 a 1× vyvinuta v soustavě S2 (TLC2). Byly separovány 4 zóny. Odparek zóny B byl krystalizován z EtOH, bylo získáno 128 mg bílých krystalů, látka byla označena 1-B.

### Frakce 2

Odparek frakce 2 (1 086,5 mg) byl rozpuštěn v 6 ml 2% HCl a 35 ml vody. Po filtraci přes křemelinu byl třikrát vytřepáván 20 ml Et<sub>2</sub>O. Vodná fáze byla alkalizována 10% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> a čtyřikrát vytřepávána 25 ml Et<sub>2</sub>O. Organická fáze byla vysušena Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, odpařena a zvážena (978,5 mg). Po rozpuštění byla nanese na 42 desek A1 a 2× vyvíjena v soustavě S1 (TLC3). Byly separovány 3 zóny (viz Tab. 4.).

Tab. 4 Výsledky preparativní TLC frakce 2

Zóna	Hmotnost [mg]	Vzhled
2-1	25,1	Zelenohnědý, velmi viskózní
2-2	125,4	Světle hnědá pěna
2-3	796	Světle fialový, velmi viskózní

Odparek frakce 2-2 (125,4 mg) byl nanesen na 2 desky A3 a 3x vyvinut v soustavě S3 (TLC4). Byly separovány 4 zóny.

Odparek frakce 2-2-D (52 mg) byl nanesen na 2 desky A3 a 1x vyvinut v soustavě S4 (TLC5). Byla separována 1 zóna. Odparek byl krystalizován z EtOH, bylo získáno 31 mg bílých krystalů, látka byla označena 2-2-D.

### Frakce 3

Odparek frakce 3 (233,9 mg) byl rozpuštěn ve 2 ml 2% HCl a 10 ml vody. Po filtraci přes křemelinu byl a třikrát vytřepáván 15 ml Et<sub>2</sub>O. Vodná fáze byla alkalizována 10% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> a třikrát vytřepávána 20 ml Et<sub>2</sub>O. Organická fáze byla vysušena Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a odpařena. Odparek

(168,5 mg) byl nanesen na 10 desek A3 a 1× vyvinut v soustavě S5 (TLC 6). Byly separovány 2 zóny (viz Tab. 5).

Tab. 5 Výsledky preparativní TLC frakce 3

Zóna	Hmotnost [mg]	Vzhled
3-1	96,4	Žlutohnědý, krystalický
3-2	26,2	Rudý, velmi viskózní

Odparek frakce 3-1 (96,4 mg) byl nanesen na 5 desek A3 a 3x vyvinut v soustavě S2 (TLC7). Byly separovány 2 zóny. Bylo získáno 58 mg hnědé amorfnní látky, která byla označena 3-1-A.

Odparek frakce 3-2 (26,2 mg) byl nanesen na 2 desky A3 a 1× vyvinut v soustavě S6 (TLC8). Byla separována 1 zóna. Odparek (23,7 mg) byl nanesen na 1 desku A3 a 1× vyvinut v soustavě S5 (TLC9). Byla separována 1 zóna. Bylo získáno 19 mg béžové amorfnní látky, která byla označena 3-2-A.

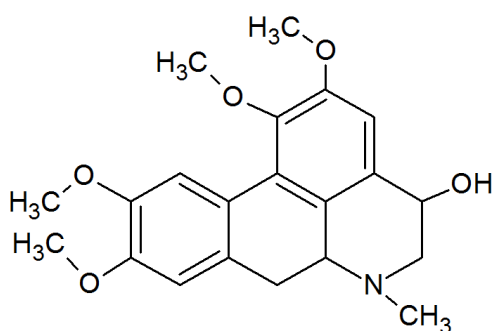
## 5. Výsledky

### 5.1. Strukturní analýza alkaloidů

#### 5.1.1. Strukturní analýza (+)-katalinu

Porovnáním dat získaných ze strukturní analýzy (NMR, EI-MS) s literaturou byla látka získaná z frakce 3-1-A identifikována jako (+)-katalin.

Sumární vzorec:  $C_{21}H_{25}NO_5$



Obr. 3 Strukturní vzorec katalinu

#### GC-MS analýza

MS (EI):  $m/z$  (%) = 371( $M^+$ , 37), 356(16), 351(34), 336(73), 328(100), 269(14), 175(9)

#### NMR analýza

$^1H$  NMR (500MHz,  $CD_2Cl_2$ )  $\delta$ : 8.02 (1H, s, H11), 6.86 (1H, s, H3), 6.79 (1H, s, H8), 4.45-4.43 (1H, m, H4), 3.89 (3H, s, OCH3), 3.87 (3H, s, OCH3), 3.85 (3H, s, OCH3), 3.65 (3H, s, OCH3), 3.06-3.00 (2H, m, H5, H7), 2.95 (1H, dd,  $J=13.5Hz$ ,  $J=4.5Hz$ , H6a), 2.64 (1H, dd,  $J=12.0Hz$ ,  $J=2.0Hz$ , H5), 2.54 (3H, s, NCH3), 2.49 (1H, dd,  $J=13.9Hz$ ,  $J=1.0Hz$ , H7).

$^{13}C$  NMR (125MHz,  $CD_2Cl_2$ )  $\delta$ : 153.1 (C2), 149.0 (C9), 148.2 (C10), 146.4 (C1), 132.1 (C3a), 129.9 (C7a), 128.0 (C11c), 127.2 (C11b), 124.9 (C11a), 112.6 (C11), 111.9 (C3), 111.8 (C8), 67.3 (C4), 63.3 (C6a), 61.1 (C5), 60.4 (OCH3), 56.5 (OCH3), 56.32 (OCH3), 56.27 (OCH3), 44.1 (NCH3), 34.7 (C7).

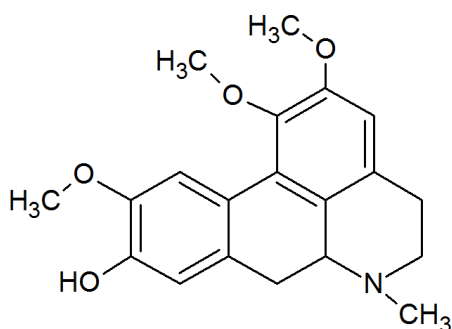
### Stanovení optické otáčivosti

Optická otáčivost  $[\alpha]_D^{25} = +196^\circ$  ( $c = 0,106$ ; EtOH)

### 5.1.2. Strukturní analýza (+)-*N*-methyllaurotetaninu

Porovnáním dat získaných ze strukturní analýzy (NMR, EI-MS) s literaturou byla látka získaná z frakce 3-2-A identifikována jako alkaloid (+)-*N*-methyllaurotetanin.

Sumární vzorec:  $C_{20}H_{23}NO_4$



Obr. 4 Strukturní vzorec *N*-methyllaurotetaninu

### GC-MS analýza

MS (EI):  $m/z$  (%) = 341( $M^+$ , 70), 340(100), 326 (21), 310(17), 294(13), 281(12), 266(10)

### NMR analýza

$^1H$  NMR (500 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  8,05 (1H, s, H11), 6,81 (1H, s, H8), 6,58 (1H, s, H3), 3,89 (3H, s,  $OCH_3$ ), 3,88 (3H, s,  $OCH_3$ ), 3,65 (3H, s,  $OCH_3$ ), 3,27-2,90 (4H, m, H4, H5, H6a, H7), 2,73-2,46 (3H, m, H4, H5, H7), 2,54 (3H, s overlapped,  $NCH_3$ ).

$^{13}C$  NMR (125 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  151,9, 145,3, 144,8, 144,2, 130,0, 128,8, 127,0, 127,0, 123,9, 113,9, 111,2, 110,2, 62,5, 60,1, 56,0, 55,8, 53,3, 43,9, 34,2, 29,1.

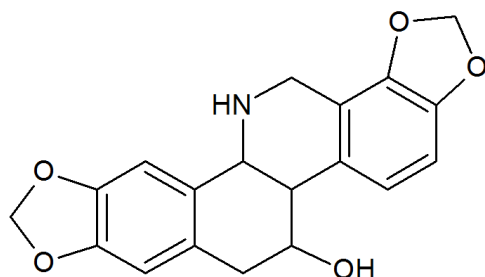
### Stanovení optické otáčivosti

Optická otáčivost  $[\alpha]_D^{25} = +103^\circ$  ( $c = 0,108$ ; EtOH)

### 5.1.3. Strukturní analýza (-)-norchelidoninu

Porovnáním dat získaných ze strukturní analýzy (NMR, EI-MS) s literaturou byla látka získaná z frakce 2-2-D identifikována jako alkaloid (-)-norchelidonin.

Sumární vzorec: C<sub>19</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>5</sub>



Obr. 5 Strukturní vzorec norchelidoninu

#### GC-MS analýza

MS (EI):  $m/z$  (%) = 339(M<sup>+</sup>, <1), 317(100), 259(7), 201(14), 174(7), 158(11), 87(10)

#### NMR analýza

<sup>1</sup>H NMR (500MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 6.88-6.85 (2H, m, H1, H8), 6.78 (1H, d, J=8.3Hz, H2), 6.65 (1H, s, H11), 5.96 (2H, dd, J=14.9Hz, J=1.1Hz, OCH<sub>2</sub>O), 5.93-5.92 (2H, m, OCH<sub>2</sub>O), 4.34-4.31 (1H, m, H13), 4.08 (1H, d, J=15.9Hz, H5), 4.02 (1H, d, J=15.9Hz, H5), 3.95 (1H, d, J=3.9Hz, H7), 3.12 (1H, dd, J=17.1Hz, J=3.3Hz, H12), 3.02 (1H, dd, J=17.1Hz, J=2.2Hz, H12), 2.97-2.94 (1H, m, H14).

<sup>13</sup>C NMR (125MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 149.1 (C10), 147.8 (C9), 146.8 (C3), 144.6 (C4), 132.2 (C14a), 130.5 (C7a), 128.1 (C11a), 122.6 (C1), 119.0 (C4a), 110.4 (C8), 110.0 (C11), 108.2 (C2), 102.5 (OCH<sub>2</sub>O), 102.3 (OCH<sub>2</sub>O), 73.9 (C13), 56.8 (C7), 44.4 (C5), 40.8 (C14), 39.6 (C12).

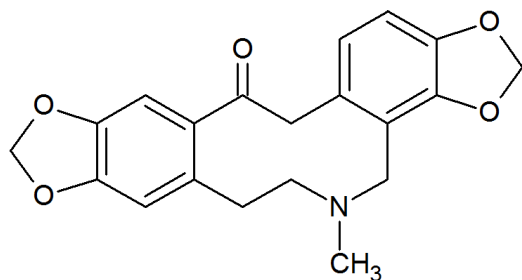
#### Stanovení optické otáčivosti

Optická otáčivost  $[\alpha]_D^{25} = -85^\circ$  (c = 0,136; EtOH)

#### 5.1.4. Strukturní analýza protopinu

Porovnáním dat získaných ze strukturní analýzy (NMR, EI-MS) s literaturou byla látka získaná z frakce 1-B identifikována jako protopin.

Sumární vzorec:  $C_{20}H_{19}NO_5$



Obr. 6 Strukturní vzorec protopinu

#### GC-MS analýza

MS (EI):  $m/z$  (%) = 353( $M^+$ , 3), 334(11), 267(6), 190(10), 163 (21), 148(100), 134(11)

#### NMR analýza

$^1H$  NMR (500 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  1.92 (3H, s, H-7a), 2.40-2.85 (H-5, overlapped, H-6), 3.50-3.65 (H-13, overlapped), 3.75-3.90 (H-8, overlapped), 3.72 (2H, s, H-8), 5.93 (2H, s, H-10a), 5.95 (2H, s, H-2a), 6.65 (1H, s, H-4), 6.66 d ( $3J_{H-12}$ =7.8 Hz, 1H, H-12), 6.69 (1H, d, H-11), 6.90 (1H, s, H-1).

$^{13}C$  NMR (125 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  32.04, C-5; 41.69, C-7a; 46.74, C-13; 51.06, C-8; 58.06, C-6; 101.08, C-10a; 101.42, C-2a; 106.96, C-11; 108.38, C-1; 110.71, C-4; 118.16, C-8a; 125.32, C-12; 129.23, C-12a; 133.03, C-4a; 136.42, C-14a; 146.11, C-3; 146.23, C-10; 146.57, C-9; 148.24, C-2; 195.21, C-14

#### Stanovení optické otáčivosti

Optická otáčivost  $[\alpha]_D^{25} = 0^\circ$  ( $c=0,113$ ;  $CHCl_3$ )



## 5.2. Výsledky stanovení biologické aktivity

Tab. 6 Výsledky stanovení biologické aktivity

Alkaloid	IC <sub>50</sub> [μM]	
	AChE	BuChE
Katalin	> 1 000	> 1 000
<i>N</i> -Methylaurotetanin	898,0 ± 100,5	> 1 000
Norchelidonin	<b>35,1 ± 3,9</b>	132,4 ± 10,8
Protopin	230,0 ± 21,0	208,9 ± 17,7
Fysostigmin	0,063 ± 0,001	0,130 ± 0,004

## 6. Diskuse

*Glaucium flavum* Crantz bylo pro tuto práci vybráno na základě cholinesterasové inhibiční aktivity celého extraktu  $IC_{50} = 6,81 \pm 0,51 \mu\text{g/ml}$  vůči AChE,  $IC_{50} = 13,18 \pm 1,11 \mu\text{g/ml}$  vůči BuChE.

V rámci této práce byly izolovány 4 isochinolinové alkaloidy různých podtypů, a to aporfinové alkaloidy katalin a *N*-methyllaurotetanin, fenantridinový alkaloid norchelidonin a protopinový alkaloid protopin. Všechny tyto látky již byly z rohatce žlutého dříve izolovány.

Aporfinové alkaloidy, mezi které patří katalin a *N*-methyllaurotetanin, jsou jedním z nejběžnějších podtypů isochinolinových alkaloidů – zahrnují více než 500 různých sloučenin. Vyskytují se v rostlinách z řádů Annonales, Laurales, Berberidales, Papaverales a Ranunculales, ojediněle též v řádech Rhamnales a Capparales [109].

Aporfinové alkaloidy se substitucí v poloze 4, jako je katalin, jsou vzácné a velmi málo prozkoumané. Dosud známými zdroji katalinu jsou pouze *Glaucium flavum* Crantz (Papaveraceae) [28] a *Alseodaphne semicarpifolia* (Lauraceae) [110]. Jeho biologická aktivita dosud nebyla testována. Měření inhibiční aktivity katalinu vůči lidským cholinesterasám ukázalo, že v tomto ohledu je neaktivní.

U *N*-methyllaurotetaninu již byla prokázána celá řada biologických účinků, působí antiagregačně, vasodilatačně [91], antivirově [74], inhibuje prolyl oligopeptidasu [92] a snižuje hyperpigmentaci kůže [93]. Strukturně blízké alkaloidy glaucin a isoboldin inhibují AChE i BuChE [38,35]. Měření inhibiční aktivity *N*-methyllaurotetaninu vůči lidským cholinesterasám však ukázalo, že v tomto ohledu je neaktivní.

Fenantridinový alkaloid norchelidonin byl v minulosti izolován nejen z nati, ale také z kořene rohatce žlutého [30]. Jeho vlastní biologická aktivita nebyla dosud zkoumána, ale strukturní podobnost k chelidoninu, u kterého již byla prokázána celá řada biologických účinků, včetně schopnosti inhibovat AChE a BuChE [7], poskytovala naději, že též norchelidonin bude aktivní. Ze všech izolovaných alkaloidů je norchelidonin skutečně nejsilnějším inhibitorem AChE i BuChE, bohužel ani jeho aktivita není dostatečná pro přímé využití - mohl by však sloužit jako předlohová struktura pro přípravu účinnějších analog.

Protopinové alkaloidy se často vyskytují v čeledích Berberidaceae, Papaveraceae a Ranunculaceae [111]. Protopin již byl detekován jak v nati, tak v kořeni rohatce [30]. Jedná se o vysoce aktivní látku, která má významné protirakovinné [3], protizánětlivé [101], antibakteriální [3], antifungální, antihistaminové, antioxidační [100], vasodilatační [102] a další účinky. Ačkoliv protopin v dřívějších testech vykazoval významnou inhibici AChE ( $IC_{50} = 10,2 \pm 0,3$ ) i BuChE ( $IC_{50} = 26,8 \pm 3,2$ ) [38], v rámci této práce nebyla aktivita prokázána. Příčinou rozdílů je pravděpodobně použití různých typů cholinesteras – v dřívějších studiích byla využita AChE z elektrického úhoře a BuChE z koňského séra, zatímco v této práci byly použity lidské enzymy.

Závěrem lze říct, že inhibiční aktivitu sumárního alkaloidního extraktu nelze vysvětlit zjištěnou aktivitou žádného z izolovaných alkaloidů. Aktivní látky tedy buď nebyly izolovány, nebo alkaloidy vykazují synergický účinek. Přestože u získaných látek nebyla zjištěna významná inhibice ani jednoho enzymu, zůstává *Glaucium flavum* Crantz zdrojem celé řady alkaloidů se zajímavou biologickou aktivitou.

## 8. Abstrakt

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické botaniky a ekologie

Kandidát: Jana Puzyrevská

Školitel: PharmDr. Anna Hošťálková, Ph.D.

Název diplomové práce: Biologická aktivita obsahových látek rostlin XXXIV. Alkaloidy nati *Glaucium flavum* CRANTZ a jejich vliv na lidské cholinesterasy.

Klíčová slova: *Glaucium flavum* Crantz, katalin, *N*-methyllaurotetanin, norchelidonin, protopin, AChE, BuChE.

Alzheimerova choroba, nejrozšířenější neurodegenerativní onemocnění, způsobuje pokles kognitivních funkcí a demenci. Nejeftivnější možností léčby je podávání centrálních inhibitorů cholinesteras, které zmírňují cholinergní deficit a tím zlepšují paměť. V současné době probíhá intenzivní výzkum nových aktivních látek, včetně přírodních substancí.

Během předběžného testování vykázal alkaloidní extrakt z nati *Glaucium flavum* Crantz slibnou inhibici lidských cholinesteras, a proto byl vybrán k dalšímu zkoumání.

Primární extrakt byl připraven ze sušené řezané kvetoucí nati extrakcí ethanolem a následnou extrakcí organickou fází při různém pH. Tento extrakt byl dále zpracován pomocí tenkovrstvé chromatografie. Struktura alkaloidů byla určena spektrometrickými metodami (MS, NMR) a byla změřena jejich optická otáčivost. Následně byla testována *in vitro* inhibiční aktivita vůči lidské acetylcholinesterase (AChE) a butyrylcholinesterase (BuChE) každého alkaloidu za použití modifikované Ellmanovy metody.

Byly získány 4 alkaloidy, aporfinové alkaloidy (+)-katalin a (+)-*N*-methyllaurotetanin, fenantridinový alkaloid (-)-norchelidonin a protopinový alkaloid protopin. Jako nejsilnější inhibitor AChE byl vyhodnocen (-)-norchelidonin ( $IC_{50} = 35,1 \pm 3,9 \mu M$ ), nicméně ani jeho aktivita není natolik významná, aby byl podroben dalšímu testování. Ostatní izolované alkaloidy nebyly vůči AChE ani BuChE aktivní ( $IC_{50} > 100 \mu M$ ).

## 9. Abstract

**Charles University**

**Faculty of Pharmacy in Hradec Králové**

**Department of Pharmaceutical Botany and Ecology**

**Candidate: Jana Puzyrevská**

Supervisor: PharmDr. Anna Hošťálková, Ph.D.

Title of Thesis: Biological activity of plant metabolites XXXIV. Alkaloids from the herb of *Glaucium flavum* CRANTZ and their impact on human cholinesterases.

Key words: *Glaucium flavum* Crantz, cataline, *N*-methyllaurotetanine, norchelidonine, protopine, AChE, BuChE.

Alzheimer's disease, the most widespread neurodegenerative disease, causes decrease of cognitive functions and dementia. The most effective therapeutic approach is the application of central cholinesterase inhibitors, which alleviate cholinergic deficit in brain and thus improve memory. Currently, intensive investigation of new active compounds including natural substances is carried on.

Within the preliminary testing, alkaloid extract from *Glaucium flavum* Crantz herb showed promising inhibition of human cholinesterases, so it was selected for further examination.

The primary alkaloid extract was acquired from dried flowering herb by extraction with ethanol and subsequent liquid extraction at different pH. This extract was treated by preparative thin layer chromatography. The structure of alkaloids was determined by spectrometric methods (MS, NMR) and their optical rotation was ascertained. Subsequently, each alkaloid was tested *in vitro* for their inhibition of human acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BuChE) by modified Ellman's method.

Four alkaloids were obtained, aporphine alkaloids (+)-cataline and (+)-*N*-methyllaurotetatine, phenanthridine alkaloid (-)-norchelidonine and protopine alkaloid protopine. (-)-Norchelidonine was evaluated as the most potent inhibitor of AChE ( $IC_{50} = 35.1 \pm 3.9 \mu M$ ), however, its activity is not significant enough for further investigation.

Other isolated alkaloids were considered inactive against both AChE and BuChE ( $IC_{50} > 100 \mu M$ ).

## 7. Literatura

- [1] Petrovska B. B.: Historical review of medicinal plants' usage. *Pharmacognosy Reviews*, 6/11, 1-5, (2012).
- [2] Jahodář L.: *Farmakobotanika semenné rostliny*. Nakladatelství Karolinum, Praha 2009.
- [3] Bournine L., Bensalem S., Wauters J.N., Iguer-Ouada M., Maiza-Benabdesselam F., Bedjou F., Castronovo V., Bellahcène A., Tits M., Frédérick M.: Identification and Quantification of the Main Active Anticancer Alkaloids from the Root of *Glaucium flavum*. *International Journal of Molecular Sciences*, 14, 23533-23544, (2013).
- [4] Yu D., Tao B.B., Yanq Y.Y., Du L.S., Yanq S.S., He X.J., Zhu Y.W., Yan J.K., Yanq Q.: The IDO inhibitor coptisine ameliorates cognitive impairment in a mouse model of Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimers Disease*, 43/1, 291-302, (2015).
- [5] Friedeman.. T., Schumacher U., Tao Y., Leunq A.K., Schröder S.: Neuroprotective Activity of Coptisine from *Coptis chinensis* (Franch). *Evidence Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015, 827308-827317, (2015).
- [6] Brunhofer G., Fallarero A., Karlsson D., Batista-Gonzalez A., Shinde P., Gopi Mohan C., Vuorela P.: Exploration of natural compounds as sources of new bifunctional scaffolds targeting cholinesterases and beta amyloid aggregation: the case of chelerythrine. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 20/22, 6669-6679, (2012).
- [7] Cahlíková I., Opletal L., Kurfürst M., Macáková K., Kulhánková A., Hošťálková A.: Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory compounds from *Chelidonium majus* (Papaveraceae). *Natural Product Communications*, 5/11, 1751-1754, (2010).
- [8] Puzzo D., Gulisano W., Arancio O., Palmeri A.: Neuroscience forefront review. The keystone of Alzheimer pathogenesis might be soust in A $\beta$  physiology. *Neuroscience*, 307, 26-36, (2015).
- [9] Jiráček R.: Farmakoterapie Alzheimerovy choroby. *Remedia*, 5/19, 342 – 345, (2009).
- [10] Vlček J., Fialová D. (Eds.): *Klinická farmacie I*. Grada, Praha 2010.

- [11] <https://www.alzheimers.org>, staženo 8.1.2017
- [12] Ferreira-Vieira T.H., Guimaraes I.M., Silva F.R., Ribeiro S.F.: Alzheimer's Disease: Targeting the Cholinergic System. *Current Neuropharmacology*, 14, 101-115, (2016).
- [13] Cahlíková L., Macáková K., Benešová N., Chlebek J., Hošťálková A., Opletal L., v knize: *Studies in Natural Products Chemistry* (Atta-ur-Rahman, ed.), sv 42, kap. 6., Elsevier, Amsterdam 2014.
- [14] Morris G.P., Clark I.A., Vissel B.: Inconsistencies and controversies surrounding the amyloid hypothesis of Alzheimer's disease. *Acta Neuropathologica Communications*, 2/135, (2014).
- [15] Woo F.Y., Basri M., Ahmad M.B., Ismail M.: Formulation optimization of galanthamin hydrobromide loaded gel drug reservoirs in transdermal patch for Alzheimer's disease. *International Journal of Nanomedicine*, 5/10, 3879-3886, (2015).
- [16] Gauthier S., Schlaefke S.: Efficacy and tolerability of *Ginkgo biloba* extract EGb 761® in dementia: a systematic review and meta-analysis of randomized placebo-controlled trials. *Clinical interventions in aging*, 9, 2065-2077, (2014).
- [17] Pagliosa L. B., Monteiro S. C., Silva K. B., de Andrade J. P., Dutilh J., Bastida J., Cammarota M., Zuanazzi J. A. S.: Effect of isoquinoline alkaloids from two *Hippeastrum* species on *in vitro* acetylcholinesterase activity. *Phytomedicine*, 17/8-9, 698-701, (2010).
- [18] Ye M., Fu S., Pi R., He F.: Neuropharmacological and pharmacokinetic properties of berberine: a review of recent research. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 61/7, 831-837, (2009).
- [19] Chlebek J., Macakova K., Cahlikova L., Kurfurst M., Kunes J., Opletal L.: Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory compounds from *Corydalis cava* (Fumariaceae). *Natural Product Communications*, 6/5, 607-610, (2011).
- [20] Wan O., Wan N. N., Liew S. Y., Khaw K. Y., Murugaiyah V., Litaudon M., Awang K.: Cholinesterase inhibitory activity of isoquinoline alkaloids from three *Cryptocarya* species (Lauraceae). *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 24/18, 4464-4469, (2016).



- [21] Tundis R., Menichini F., Conforti F., Loizzo M. R., Bonesi M., Statti G., Menichini F.: A potential role of alkaloid extracts from *Salsola* species (Chenopodiaceae) in the treatment of Alzheimer's disease. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 24/3, 818-824, (2009).
- [22] Hung T. M., Nguyen H. D., Kim J. Ch., Jang H., Ryoo S., Lee J. H., Choi J. S., Bae K. H., Min B. S.: Alkaloids from roots of *Stephania rotunda* and their cholinesterase inhibitory activity. *Planta Medica*, 76/15, 1762-1764, (2010); Chemical Abstracts 2010:1467226.
- [23] <https://www.britannica.com/plant/Papaveraceae>, staženo 15.3.2017
- [24] [https://www.eddmaps.org/ipane/icat/jpg/uconn\\_ipane\\_glaucflavu\\_03a.jpg](https://www.eddmaps.org/ipane/icat/jpg/uconn_ipane_glaucflavu_03a.jpg), staženo 7.3.2017
- [25] <http://botany.cz/cs/glaucium-flavum/>, staženo 7.3.2017
- [26] [http://www.botanickafotogalerie.cz/fotogalerie.php?lng=cz&latName=Glaucium%20flavum&title=Glaucium%20flavum%20%7C%20rohatec%20%5BEIut%3BD&showPhoto\\_variant=photo\\_description&show\\_sp\\_descr=true&spec\\_syntax=species&sortby=lat](http://www.botanickafotogalerie.cz/fotogalerie.php?lng=cz&latName=Glaucium%20flavum&title=Glaucium%20flavum%20%7C%20rohatec%20%5BEIut%3BD&showPhoto_variant=photo_description&show_sp_descr=true&spec_syntax=species&sortby=lat), staženo 7.3.2017
- [27] Doncheva T., Doycheva I., Philipov S.: Alkaloid chemotypes of *Glaucium flavum* (Papaveraceae) from Bulgaria. *Biochemical Systematics and Ecology*, 68, 1-5, (2016).
- [28] Daskalova E., Iskrenova E., Kiryakov H., Evstatieva L.: Minor alkaloids of *Glaucium flavum*. *Phytochemistry*, 27/3, 953-955, (1988).
- [29] Yakhontova L.D., Sheichenko V.I., Tolkachev O.N.: A study of the alkaloids of *Glaucium flavum*, the structure of glauvine. *Khimiya Prirodnikh Soedinenii*, 2, 214-218, (1972); Chemical Abstracts 1972:448675.
- [30] Novák V., Slavík J.: Further alkaloids from *Glaucium flavum* Cr. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*, 39, 3352-3356, (1974).
- [31] Denisenko O.N., Eliseeva L.M., Chelombiřko V.A., Israilov I.A.: Alkaloids of *Glaucium flavum*. *Khimiya Prirodnikh Soedinenii*, 5, 769-770, (1993); Chemical Abstracts 1995:821321.

- [32] Remickova M., Dimitrova P., Philipov S., Ivanovska N.: Toll-like receptor-mediated anti-inflammatory action of glaucine and oxoglucine. *Fitoterapia*, 80, 411-414, (2009).
- [33] Chlebek J.: Doktorská disertační práce: Studium biologické aktivity alkaloidů izolovaných z *Corydalis cava* (Fumariaceae). Univerzita Karlova, Praha 2012.
- [34] Matějka J.: Diplomová práce: Biologicky aktivní metabolity rostlin 8. Alkaloidy *Macleaya cordata* a jejich biologická aktivita. Univerzita Karlova, Praha 2012.
- [35] Murray A.P., Faraoni M.B., Castro M.J., Alza N.P., Cavallaro V.: Natural AChE Inhibitors from Plants and their contribution to Alzheimer's Disease Therapy. *Current Neuropharmacology*, 11/4, 288 – 413, (2013).
- [36] Bakyta M.: Diplomová práce: Biologická aktivita obsahových látek rostlin XIX. Alkaloidy *Peumus boldus* MOL. Univerzita Karlova, Praha 2012.
- [37] Adsersen A., Kjølbye A., Dall O., Jäger A.K.: Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory compounds from *Corydalis cava* Schweigg. & Kort. *Journal of Ethnopharmacology*, 113/1, 179-182, (2007), Chemical Abstracts 2007:802519.
- [38] Hung T.M., Thuong P.T., Nhan N.T., Mai N.T.T., Quan T.L., Choi M.H., Woo M.H., Min B.S., Bae K.H.: Cholinesterase Inhibitory Activities of Alkaloids from *Corydalis* Tuber. *Natural Product Sciences*, 17/2, 108-112, (2011).
- [39] Li Y., Wang S., Liu Y., Yang X., Wang H., Wen Y., Chen Y.: Effect of  $\alpha$ -allocryptopine on transient outward potassium current in rabbit ventricular myocytes. *Cardiology*, 111/4, 229-236, (2008).
- [40] Abu-Ghalyun Y., Masalmeh A., al-Khalil S.: Effects of allocryptopine, an alkaloid from *Glaucium arabicum* on rat isolated ileum and urinary bladder. *General Pharmacology*, 29/4, 621-623, (1997).
- [41] Hufford C.D., Funderburk M.J., Morgan J.M., Robertson L.W.: Two antimicrobial alkaloids from heartwood of *Liriodendron tulipifera* L. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 64/5, 789-792, (1975).

- [42] Vrba J., Dolezel P., Vicar J., Modrianský M., Ulrichová J.: Chelerythrine and dihydrochelerythrine induce G1 phase arrest and bimodal cell death in human leukemia HL-60 cells. *Toxicology In Vitro*, 22/4, 1008-1017, (2008).
- [43] Feng G., Zhang J., Liu Y.Q.: Inhibitory activity of dihydrosanguinarine and dihydrochelerythrine against phytopathogenic fungi. *Natural Product Research*, 25/11, 1082-1089, (2011).
- [44] Tavares L.C., Zanon G., Weber A.D., Neto A.T., Mostardeiro C.P., Da Cruz I.B., Oliveira R.M., Ilha V., Dalcol I.I., Morel A.F.: Structure-activity relationship of benzophenanthridine alkaloids from *Zanthoxylum rhoifolium* having antimicrobial activity. *PloS One*, 9/5, (2014).
- [45] Yao J.Y., Zhou Z.M., Li X.L., Yin W.L., Ru H.S., Pan X.Y., Hao G.J., Xu Y., Shen J.Y.: Antiparasitic efficacy of dihydrosanguinarine and dihydrochelerythrine from *Macleaya microcarpa* against *Ichthyophthirius multifiliis* in richadsin (*Squaliobarbus curriculus*). *Veterinary Parasitology*, 183/1-2, 8-13, (2011).
- [46] Fuchino H., Kawano M., Mori-Yasumoto K., Sekita S., Satake M., Ishikawa T., Kiuchi F., Kawahara N.: *In vitro* leishmanicidal activity of benzophenanthridine alkaloids from *Bocconia pearcei* and related compounds. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 58/8, 1047-1050, (2010).
- [47] Cortijo J., Villagrasa V., Pons R., Berto L., Martí-Cabrera M., Martínez-Losa M., Domenech T., Beleta J., Morcillo E.J.: Bronchodilator and anti-inflammatory activities of glaucine: *In vitro* studies in human airway smooth muscle and polymorphonuclear leucocytes. *British Journal of Pharmacology*, 127/7, 1641-1651, (1999).
- [48] Kang H., Jang S.W., Pak J.H., Shim S.: Glaucine inhibits breast cancer cell migration and invasion by inhibiting MMP-9 gene expression through the suppression of NF- $\kappa$ B activation. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 403/1-2, 85-94, (2015).
- [49] Orallo F., Fernández Alzueta A., Campos-Toimil M., Calleja J.M.: Study of the *in vivo* and *in vitro* cardiovascular effect of (+)-glaucine and *N*-carbethosecoglaucine in rats. *British Journal of Pharmacology*, 114/7, 1419-1427, (1995).

- [50] Ujváry I.: Psychoactive natural products: overview of recent developments. *Annali dell Istituto Superiore Di Sanita*, 50/1, 12-27, (2014).
- [51] Jana J., Mondal S., Bhattacharjee P., Sen Gupta P., Roychowdhury T., Saha P., Kundu P., Chatterjee S.: Chelerythrine down regulates expression of VEGFA, BCL2 and KRAS by arresting G-Quadruplex structures at their promoter regions. *Scientific Reports*, 1/19, 40706, (2017).
- [52] Kumar S., Tomar M.S., Acharya A.: Activation of p53-dependent/-independent pathways of apoptotic cell death by chelerythrine in a murine T cell lymphoma. *Leukemia and Lymphoma*, 56/6, 1846-1855, (2015).
- [53] Kumar S., Deepak P., Kumar S., Gautam P.K., Acharya A.: A benzophenanthridine alkaloid, chelerythrine induces apoptosis *in vitro* in a Dalton's lymphoma. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, 9/4, 693-700, (2013).
- [54] Kumar S., Acharya A.: Chelerythrine induces reactive oxygen species-dependent mitochondrial apoptotic pathway in a murine T cell lymphoma. *Tumour Biology*, 35/1, 129-140, (2014).
- [55] Vieira S.M., de Oliveira V.H., Valente R. C., Moreira O.C., Fontes C.F., Miqnaço J.A.: Chelerythrine inhibits the sarco/endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase and results in cell Ca<sup>2+</sup> imbalance. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 3/15, 58-65, (2015); *Chemical Abstracts* 2015594339.
- [56] Li X.L., Yao J.Y., Zhou Z.M., Shen J.Y., Ru H.S., Liu X.L.: Activity of the chelerythrine, a quaternary benzo[c]phenanthridine alkaloid from *Chelidonium majus* L. on *Dactylogyrus intermedius*. *Parasitology Research*, 109/1, 247-252, (2011).
- [57] Chen Z., Li X., Wu X., Wang W., Wang W., Xin M., Shen F., Liu L., Liang J., Li L., Yu L.: Synergistic Activity of Econazole-Nitrate and Chelerythrine against Clinical Isolates of *Candida albicans*. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 13/2, 567-573, (2014); *Chemical Abstracts* 2014:1254130.

- [58] Lianq J., Zeng F., Guo A., Liu L., Guo N., Li L., Jin J., Wu X., Liu M., Zhao D., Li Y., Jin Q., Yu L.: Microarray analysis of the chelerythrine-induced transcriptome of *Mycobacterium tuberculosis*. *Current Microbiology*, 62/4, 1200-1208, (2011).
- [59] Jursky F., Baliova M.: Differential effect of the benzophenanthridine alkaloids sanguinarine and chelerythrine on glycine transporters. *Neurochemistry International*, 58/6, 641-647, (2011).
- [60] Li W.F., Hao D.J., Huang H.M., Yao H., Niu X.F.: Protective effect of chelerythrine against ethanol-induced gastric ulcer in mice. *Chemico-Biological Interactions*, 208, 18-27, (2014).
- [61] Zheng W., Qui L., Wang R., Feng X., Han Y., Zhu Y., Chen D., Liu Y., Jin L., Li Y.: Selective targeting of PPAR $\gamma$  by the natural product chelerythrine with a unique binding mode and improved antidiabetic potency. *Scientific Reports*, 7/17, 12222, (2015).
- [62] Zhang W.B., Wang M., Zhou B.Q., Zhu J.H., Fu G.S.: The effect of chelerythrine on the hypertrophy of cardiac myocytes of neonatal rats induced by different glucose levels and its mechanism. *Yao Xue Xue Bao*, 44/2, 115-120, (2009), *Chemical Abstracts* 2009:427841.
- [63] Zhang Q., Tian Y., Duan J., Wu J., Yas S., Chen H., Menq X., Owusu-Ansah K.G., Zhenq S.: Chelerythrine ameliorates acute cardiac allograft rejection in mice. *Transplant Immunology*, 9/38, 78-83, (2016).
- [64] Parlakpınar H., Tasdemir S., Polat A., Bay-Karabulut A., Vardi N., Ucar M., Yanilmaz M., Kavaklı A., Acet A.: Protective effect of chelerythrine on gentamicin-induced nephrotoxicity. *Cell Biochemistry and Function*, 24/1, 41-48, (2006).
- [65] Paul A., Bishayee K., Mukherjee A., Sikdar S., Chakraborty D., Boujedaini N., Khuda-Bukhsh A.R.: Chelidonine isolated from ethanolic extract of *Chelidonium majus* promotes apoptosis in HeLa cells through p38-p53 and PI3K/AKT signalling pathways. *Journal of Chinese Integrative Medicine*, 10/9, 1025-1038, (2012).
- [66] Yao J.Y., Zhou Z.M., Pan X.Y., Hao G.J., Li X.L., Xu Y., Shen J.Y., Ru H.S., Yin W.L.: *In vivo* anthelmintic activity of chelidonine from *Chelidonium majus* L. against *Dactylogyrus intermedius* in *Carassius auratus*. *Parasitology Research*, 109/5, 1465-1469, (2011).

- [67] Hiller K.O., Ghorbani M., Schilcher H.: Antispasmodic and relaxant activity of chelidonine, protopine, coptisine, and *Chelidonium majus* extracts on isolated guinea-pig ileum. *Planta Medica*, 64/8, 758-760, (1998).
- [68] Paul A., Das J., Das S., Samadder A., Khuda-Bukhsh A.R.: Poly (lactide-co.glycolide) nano-encapsulation of chelidonine, an active bioingredient of greater celandine (*Chelidonium majus*), enhances its ameliorative potential against cadmium induced oxidative stress and hepatic injury in mice. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 36/3, 937-947, (2013).
- [69] Koriem K.M., Arbid M.S., Asaad G.F.: *Chelidonium majus* leaves methanol extract and its chelidonine alkaloid ingredient reduce cadmium-induced nephrotoxicity in rats. *Journal of Natural Medicines*, 67/1, 159-167, (2013).
- [70] Kleinrok Z., Szponar J., Matuszek B., Jaquillo-Wójtowicz E.: Studies on the participation of the dopaminergic system in the central effects of chelidonin. *Polish Journal of Pharmacology and Pharmacy*, 42/5, 417-424, (1990).
- [71] Qu Z., Zou X., Zhang X., Sheng J., Wanq Y., Wanq C., Ji Y.: Chelidonine induces mitotic slippage and apoptotic-like death in SGC-7901 human gastric carcinoma cells. *Molecular Medicine Reports*, 13/2, 1336-1344, (2016).
- [72] Orvos P., Virág L., Tálosi L., Hajdú Z., Csupor D., Jedlinszki N., Szél T., Varró A., Hohmann J.: Effects of *Chelidonium majus* extracts and major alkaloids on hERG potassium channels and on dog cardiac action potential – a safety approach. *Fitoterapia*, 1/100, 156-165, (2015); Chemical Abstracts 2014:2093804.
- [73] Paulo M.Q., Barbosa-Filho J.M., Lima E.O., Maia R.F., Barbosa R.C., Kaplan M.A.: Antimicrobial activity of benzylisoquinoline alkaloids from *Annona salzmanii* D.C. *Journal of Ethnopharmacology*, 36/1, 39-41, (1992), Chemical Abstracts 1992:231947.
- [74] Boustie J., Stigliani J.L., Montanha J., Amoros M., Payard M., Girre L.: Antipoliiovirus structure-activity relationships of some aporphine alkaloids. *Journal of Natural Products*, 61/4, 480-484, (1998).

- [75] Zhao Y.Q., Li G.R., Zhang D.Z., Zhao G.S.: Effects of isocorydine on action potentials in isolated canine Purkinje fibers and ventricular muscles. *Acta Pharmacologica Sinica*, 12/4, 324-327, (1991).
- [76] Zahari A., Ablat A., Omer N., Nafiah M.A., Sivasothy Y., Mohamad J., Khan M.N., Awang K.: Ultraviolet-visible study on acid-base equilibria of aporphine alkaloids with antiplasmodial and antioxidant activities from *Alseodaphne corneri* and *Dehaasia longipedicellata*. *Scientific Reports*, 6, 21517, (2016).
- [77] Sun H., Hou H., Lu P., Zhang L., Zhao F., Ge C., Wang T., Yao M., Li J.: Isocorydine inhibits cell proliferation in hepatocellular carcinoma cell lines by inducing G2/M cell cycle arrest and apoptosis. *Plos One*, 7/5, e36808, (2012).
- [78] Wu J., Zhang H., Hu B., Yanq L., Wang P., Wang F., Meng X.: Coptisine from *Coptis chinensis* inhibits production of inflammatory mediators in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 murinemacrophage cells. *European Journal of Pharmacology*, 780, 106-114, (2016).
- [79] He K., Ye X., Wu H., Wanq Y., Zou Z., Ninq Z., Hu Y., Chen B., Fanq X., Li X.: The safety and anti-hypercholesterolemic effect of coptisine in Syrian golden hamsters. *Lipids*, 50/2, 185-194, (2015).
- [80] Guo J., Wang S.B., Yuan T.Y., Wu Y.J., Yan Y., Li L., Xu X.N., Gonq L.L., Qin H.L., Fanq L.H., Du G.H.: Coptisine protects rat heart against myocardial ischemia/reperfusion injury by suppressing myocardial apoptosis and inflammation. *Atherosclerosis*, 231/2, 384-391, (2013).
- [81] 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 mechanism. *Toxicology Letters*, 226/3, 328-336, (2014), *Chemical Abstracts* 2014:655141.
- [82] Konq W.J., Zhao Y.L., Xiao X.H., Li Z.L., Jin C., Li H.B.: Investigation of the antifungal activity of coptisine on *Candida albicans* growth by microcalorimetry combined with principal component analysis. *Journal of Applied Microbiology*, 107/4, 1072-1080, (2009).

- [83] Hirano H., Osawa E., Yamaoka Y., Yokoi T.: Gastric-mucous membrane protection activity of coptisine derivatives. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 24/11, 1277-1281, (2001).
- [84] Sun R., Jiang H., Zhang W., Yang K., Wang C., Fan L., He Q., Feng J., Du S., Deng Z., Geng Z.: Cytotoxicity of Aporphine, Protoberberine, and Protopine alkaloids from *Dicranostigma leptopodum* (Maxim.) Fedde. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 580483, (2014).
- [85] Chen J.H., Du Z.Z., Shen Y.M., Yang Y.P.: Aporphine alkaloids from *Clematis parviloba* and their antifungal activity. *Archives of Pharmaceutical Research*, 32/1, 3-5, (2009), Chemical Abstracts 2009:110292.
- [86] Peña J.B., Lee H.L., Yoon S.Y., Kim G.H., Lee Y.S., Cheong J.H.: The involvement of magnoflorine in the sedative and anxiolytic effects of *Sinomeni Caulis et Rhizoma* in mice. *Journal of Natural Medicines*, 67/4, 814-821, (2013).
- [87] Mohamed S.M., Hassan E.M., Ibrahim N.A.: Cytotoxic and antiviral activities of aporphine alkaloids of *Magnolia grandiflora* L. *Natural Product Research*, 24/15, 1395-1402, (2010).
- [88] Hung T.M., Na M., Zhang X., Lee I., Ngoc T.M., Thuong P.T., Sok D.E., Bae K.: Protective effect of magnoflorine isolated from *Coptidis Rhizoma* on Cu<sup>2+</sup>-induced oxidation of human low density lipoprotein. *Planta Medica*, 73/12, 1281-1284, (2007), Chemical Abstracts 2007:1301559.
- [89] Sakumoto H., Yokota Y., Ishibashi G., Maeda S., Hoshi C., Takano H., Kobayashi M., Ijiri S., Sakakibara I., Hara A.: Sinomenine and magnoflorine, major constituents of *Sinomeni Caulis et Rhizoma*, show potent protective effects against membrane damage induced by lysophosphatidylcholine in rat erythrocytes. *Journal of Natural Medicines*, 69/3, 441-448, (2015).
- [90] Patel M.B., Mishra S.: Hypoglycemic activity of alkaloidal fraction of *Tinospora cordifolia*. *Phytomedicine*, 18/12, 1045-1052, (2011).



- [91] Chen K.S., Ko F.N., Teng C.M., Wu Y.C.: Antiplatelet and vasorelaxing actions of some aporphinoids. *Planta Medica*, 62/2, 133-136, (1996).
- [92] Cahlíková L., Hulová L., Hrabínová M., Chlebek J., Hošťálková A., Adamcová M., Šafratová M., Jun D., Opletal L., Ločárek M., Macáková K.: Isoquinoline alkaloids as prolyl oligopeptidase inhibitors. *Fitoterapie*, 103, 192-196, (2015).
- [93] Fong P., Tong H.H.: *In silico* prediction of the cosmetic whitening effects of naturally occurring lead compounds. *Natural Product Communications*, 7/10, 1287-1294, (2012).
- [94] Menezes L.R., Costa C.O., Rodriyues A.C., Santo F.R., Nepel A., Dutra L.M., Silva F.M., Soares M.B., Barison A., Costa E.V., Bezerra D.P.: Cytotoxic Alkaloids from the Stem of *Xylopiia laevigata*. *Molecules*, 21/7, (2016).
- [95] Singh S., Jain L., Pandey M.B., Singh U.P., Pandey V.B.: Antifungal activity of the alkaloids from *Eschscholzia californica*. *Folia Microbiologica*, 54/3, 204-206, (2009); Chemical Abstracts 2009530005.
- [96] Chang F.R., Wei J.L., Teng C.M., Wu Y.C.: Antiplatelet aggregation constituents from *Annona purpurea*. *Journal of Natural Products*, 61/12, 1457-1461, (1998).
- [97] Arita M., Philipov S., Galabov A.S.: Phosphatidylinositol 4-kinase III beta is the target of oxoglucine and pachypodol (Ro 09-0179) for their anti-poliovirus activities, and is located at upstream of the target step of brefeldin A. *Microbiology and Immunology*, 59/6, 338-347, (2015).
- [98] Ivanovska N., Philipov S., Georgieva P.: Immunopharmacological activity of aporphinoid alkaloid oxoglucine. *Pharmacological Research*, 35/4, 267-272, (1997).
- [99] Prokopenko Y., Tsyvunin V., Shtrygol' S., Georqiyants V.: In Vivo Anticonvulsant Activity of Extracts and Protopine from the *Fumaria schleicheri* Herb. *Scientia Pharmaceutica*, 84/3, 547-554, (2015).
- [100] Kai H., Jian-Li G.: Protopine Inhibits Heterotypic Cell Adhesion in MDA-MB-231 Cells Through Down-Regulation of Multi-Adhesive Factors. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 11/2, 415-424, (2014).

- [101] Bae D.S., Kim Y.H., Pan Ch.H., Nho Ch.W., Samdan J., Yansan J., Lee J.K.: Protopine reduces the inflammatory activity of lipopolysaccharida-stimulated murine macrophages. *BMB Reports*, 45/2, 108-113, (2012).
- [102] Xiao X., Liu J., Hu J., Li T., Zhang Y.: Protective effect of protopine on the focal cerebral ischaemic injury in rats. *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*, 101/2, 85-89, (2007).
- [103] Fedurco M., Gregorová J., Šebrlová K., Kantorová J., Peš O., Baur R., Sigel E., Táborská E.: Modulatory Effects of *Eschscholzia californica* Alkaloids on Recombinant GABA<sub>A</sub> Receptors. *Biochemistry Research International*, 617620, (2015).
- [104] Lee J.Y., Kim K.J., Kim J., Choi S.U., Kim S.H., Ryu S.Y.: Anti-osteoclastogenic effects of isoquinoline alkaloids from the rhizome extract of *Sinomenium acutum*. *Archives of Pharmaceutical Research*, 39/5, 713-720, (2016).
- [105] Tsai T.H., Wang G.J., Lin L.C.: Vasorelaxing alkaloids and flavonoids from *Cassythia filiformis*. *Journal of Natural Products*, 71/2, 289-291, (2008).
- [106] Faddeeva M.D., Beliaeva T.N.: Sanguinarine and ellipticine cytotoxic alkaloids isolated from well-known antitumor plants. Intracellular target of their action. *Tsitoloqia*, 39/2-3, 181-208, (1997); *Chemical Abstracts* 1997:765838.
- [107] Gaziano R., Moroni G., Bué C., Miele M.T., Sinibalbi-Vallebona P., Pica F.: Antitumor effects of the benzophenanthridine alkaloid sanguinarine: Evidence and perspectives. *World Journal of Gastrointestinal Oncology*, 8/1, 30-39, (2016).
- [108] Hošťálková A.: *Doktorská disertační práce: Studium obsahových látek vybraných taxonů z řádů laurales a ranunculales s potenciálně neuroprotektivní aktivitou*. Univerzita Karlova, Praha 2015.
- [109] Hošťálková A., Siatka T., Chlebek J., Opletal L., Drašar P., Cahlíková L.: Boldinové alkaloidy a perspektivy jejich využití. *Chemické Listy*, 109, 846 – 855, (2015).
- [110] Southon I.W., Buckingham J.: *Dictionary of alkaloids*. Chapman and Hall Ltd, Cambridge 1989.

[111] Higgins, J.P., Flicker, L.: Lecithin for dementia and cognitive impairment. Cochrane Database Systematic Review, 2., 2000.