

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



DIPLOMOVÁ PRÁCE

**Alkaloidy *Papaver rhoeas* L. (Papaveraceae) a jejich biologická aktivita  
vztahovaná k Alzheimerově chorobě I.**

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

Autor: Leontina Bulvová  
Vedoucí katedry: doc. Ing. Lucie Cahlíková, Ph.D.  
Vedoucí diplomové práce: PharmDr Jakub Chlebek, Ph.D.

HRADEC KRÁLOVÉ  
2017

**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 jsou řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.

V Hradci Králové, 2017

.....

podpis

### **Poděkování:**

Na tomto místě bych chtěla poděkovat především vedoucímu práce PharmDr. Jakubovi Chlebkovi, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a trpělivost. Dále doc. PharmDr. Jiřímu Kunešovi, Ph.D. za změřeni a interpretaci NMR spekter a identifikaci jednotlivých alkaloidů, prof. RNDr. Lubomíru Opletalovi, CSc. za stanovení jejich biologické aktivity a v neposlední řadě také ostatním kolegům katedry farmaceutické botaniky a ekologie za příjemnou pracovní atmosféru a občasnou výpomoc/radu během mé experimentální práce v laboratoři (zejména PharmDr. Anně Hošťálkové, Ph.D.).

# Obsah

Seznam použitých zkratk.....	8
Přehled obrázků.....	10
Přehled tabulek.....	11
1 Úvod.....	12
2 Cíl diplomové práce .....	13
3 Teoretická část .....	14
3.1 Alzheimerova choroba .....	14
3.1.1 Epidemiologie .....	14
3.1.2 Rizikové faktory.....	14
3.1.3 Prevence .....	15
3.1.4 Klinický obraz.....	15
3.1.5 Neuropatologie AD .....	16
3.1.5.1 Senilní plaky .....	16
3.1.5.2 Neurofibrilární klubka.....	17
3.1.5.3 Apolipoprotein E.....	17
3.1.5.4 Volné kyslíkové radikály .....	18
3.1.5.5 Zánět.....	19
3.1.5.6 Aktivita prolyloligopeptidasy.....	19
3.1.6 Diagnostika a diferenciální diagnostika .....	19
3.1.7 Léčba AD .....	20
3.1.7.1 Funkce acetylcholinu .....	20
3.1.7.2 Cholinesterasy .....	21
3.1.7.3 Inhibitory acetylcholinesteras .....	21
3.1.7.4 Inhibitory NMDA receptorů .....	23
3.1.7.5 Další možnosti terapie.....	24
3.2 <i>Papaver rhoeas</i> L. (Papaveraceae) .....	26

3.2.1	Taxonomické zařazení .....	26
3.2.2	Charakteristika čeledi Papaveraceae .....	26
3.2.3	Morfologický popis <i>Papaver rhoeas</i> L. ....	27
3.2.4	Použití v lidovém léčitelství.....	27
3.2.5	Obsahové látky.....	27
3.2.5.1	Protoberberinové alkaloidy .....	29
3.2.5.2	Proaporfínové alkaloidy .....	30
3.2.5.3	Aporfínové alkaloidy .....	31
3.2.5.4	Protopinové alkaloidy .....	33
3.2.5.5	Rhoeadinové alkaloidy.....	34
3.2.5.6	Další obsahové látky .....	35
4	Experimentální část.....	36
4.1	Materiál a vybavení.....	36
4.1.1	Rozpouštědla a chemikálie.....	36
4.1.2	Pomocné látky .....	36
4.1.3	Vyvíjející soustavy pro tenkovrstvou chromatografii (TLC).....	36
4.1.4	Chromatografické adsorbenty .....	37
4.1.5	Přístrojové vybavení .....	37
4.1.6	Detekční činidla .....	37
4.1.7	Rostlinný materiál .....	37
4.2	Obecné postupy.....	39
4.2.1	Příprava a uchování rozpouštědel.....	39
4.2.2	Odpařování extraktů a frakcí.....	39
4.2.3	Sušení a skladování frakcí izolovaných látek .....	39
4.2.4	Chromatografické metody.....	39
4.2.4.1	Sloupcová chromatografie .....	39
4.2.4.2	Tenkovrstvá chromatografie .....	39

4.3	Strukturní analýza .....	40
4.3.1	GC-MS analýza .....	40
4.3.2	NMR analýza .....	40
4.3.3	Teplota tání.....	40
4.3.4	Optická otáčivost.....	40
4.4	Izolace alkaloidů .....	41
4.4.1	Příprava alkaloidního extraktu .....	41
4.4.2	Sloupcová chromatografie alkaloidního extraktu .....	41
4.4.3	Separace alkaloidů z frakce 75 – 97 (2,68 g) .....	43
4.4.3.1	Izolace alkaloidů z frakce 75 – 97, podfrakce 1 (230 mg).....	44
4.4.3.2	Izolace alkaloidů z frakce 75 – 97, podfrakce 2 (320 mg).....	44
4.5	Příprava chloridů alkaloidů .....	45
4.5.1	Příprava chlorovodíku v bezvodém diethyletheru .....	45
4.5.2	Příprava rozpustných chloridů .....	45
4.6	Stanovení biologické aktivity alkaloidů a alkaloidního extraktu.....	46
4.6.1	Chemikálie, pufrý a materiál.....	46
4.6.2	Přístrojové vybavení .....	46
4.6.3	Podmínky měření .....	47
4.6.4	Postup získání erytrocytárních cholinesteras .....	47
4.6.5	Stanovení inhibice cholinesteras .....	47
4.6.6	Stanovení inhibice prolyloligopeptidasy.....	48
5	Výsledky .....	50
5.1	Strukturní analýza .....	50
5.1.1	(+)-rhoeagenin (LB-1).....	50
5.1.1.1	NMR analýza .....	50
5.1.1.2	MS analýza.....	53
5.1.1.3	Optická otáčivost.....	53

5.1.1.4 Teplota tání.....	53
5.1.2 LB-2 .....	54
5.1.2.1 NMR analýza .....	54
5.1.2.2 MS analýza.....	56
5.1.2.3 Optická otáčivost.....	56
5.1.2.4 Teplota tání.....	56
5.2 Biologická aktivita izolovaných alkaloidů.....	57
6 Diskuze.....	58
7 Závěr .....	60
8 Abstrakt.....	61
9 Abstract .....	62
10 Použitá literatura .....	63

## Seznam použitých zkratek

A $\beta$	$\beta$ -amyloid
Acetyl-CoA	acetylkoenzym A
ACh	acetylcholin
AChE	acetylcholinesterasa
AD	Alzheimerova choroba
AMK	aminokyselina
AMPA	$\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-4-propionát
ApoE	apolipoprotein E
APP	amyloidní prekurzorový protein
BuChE	butyrylcholinesterasa
COX	cyklooxygenasa
COX-2	cyklooxygenasa 2
CT	počítačová tomografie
DMSO	dimethylsulfoxid
DTNB	5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina
EBM	evidence based medicine, medicína založená na důkazech
EtOH	ethanol
HDL	lipoprotein s vysokou denzitou
HupA	huperzin A
IL1	interleukin 1
IL2	interleukin 2
LB	lékařský benzín
MAP	s mikrotubuly asociovaný protein



MK	mastná kyselina
MRI	nukleární magnetická rezonance
NK	nukleová kyselina
NMDA	<i>N</i> -methyl- <i>D</i> -aspartát
POP	prolyloligopeptidasa
ROS	volné kyslíkové radikály
TNF $\alpha$	tumor nekrotizující faktor $\alpha$
VLDL	lipoprotein s velmi nízkou denzitou

## Přehled obrázků

Obr. 1 <i>Papaver rhoeas</i> L.....	26
Obr. 2 Protoberberinové alkaloidy.....	30
Obr. 3 Proaporfinové alkaloidy.....	31
Obr. 4 Aporfinové alkaloidy .....	32
Obr. 5 Protopinové alkaloidy .....	34
Obr. 6 Rhoeadinové alkaloidy .....	34
Obr. 7 Souhrnné TLC spojených frakcí sumárního alkaloidního výtřepku .....	43
Obr. 8 (+)-rhoeagenin .....	50
Obr. 9 <sup>1</sup> H NMR spektrum (+)-rhoeageninu.HCl.....	51
Obr. 10 <sup>13</sup> C NMR spektrum (+)-rhoeageninu.HCl .....	52
Obr. 11 EI spektrum (+)-rhoeageninu .....	53
Obr. 12 LB-2 .....	54
Obr. 13 <sup>1</sup> H NMR spektrum LB-2.....	55
Obr. 14 <sup>13</sup> C NMR spektrum LB-2.....	56
Obr. 15 EI spektrum LB-2 .....	56

## Přehled tabulek

Tab. 1 Alkaloidy iráckých druhů rodu <i>Papaver</i> .....	28
Tab. 2 Isochinolinové alkaloidy obsažené u <i>Papaver rhoeas</i> L. ....	29
Tab. 3 Přehled parametrů použité kolony .....	42
Tab. 4 Spojené frakce sumárního alkaloidního výtřepku.....	42
Tab. 5 Výsledky preparativní TLC frakce 75 – 97 .....	44
Tab. 6 Přehled hodnot $IC_{50}$ izolovaných alkaloidů a referenčních látek.....	57

# 1 Úvod

Zdravotnická péče je v současné době dostupnější a kvalitnější než kdy jindy a opírá se o nové technologie a objevy v oblasti medicíny. Vědeckotechnický pokrok s sebou, kromě úspěšné léčby nejrůznějších onemocnění, přináší zároveň prodloužení průměrné délky života. Naděje na dožití je dnes u mužů 75 let, u žen dokonce o 6 let více. S přibývajícím roky života ovšem ekvivalentně vzrůstá také morbidita obyvatelstva.<sup>1</sup>

Vedle somatických onemocnění trpí starší pacienti stále více psychickými poruchami, nejčastěji demencí, která je charakterizovaná globálním úbytkem intelektových schopností, poruchou osobnosti, chování, společenského začlenění a pracovních aktivit.<sup>2</sup> Na pozadí demence mohou stát dvě základní příčiny. Symptomatické demence vznikají jako důsledek nějaké choroby, která sekundárně působí mozkové léze. Druhým typem jsou atroficko-degenerativní demence, mezi které se řadí Alzheimerova choroba jako jejich nejčastější příčina. Právě toto onemocnění, z počátku nenápadné a pomalu se rozvíjející, má na svědomí více než 60 % případů všech demencí.<sup>3</sup>

Jelikož se dosud nepodařilo najít lék, který by řešil právě příčinu vzniku Alzheimerovy choroby, zůstává tak její kauzální léčba předmětem mnoha výzkumů. V současnosti je dostupná pouze léčba symptomatická, která vychází převážně z cholinergní hypotézy o snížené hladině acetylcholinu v mozku, a tedy snížené cholinergní transmisi.<sup>4</sup> Tuto léčbu představuje trojice látek, jimiž jsou donepezil, rivastigmin a galanthamin, které inhibují především acetylcholinesterasu.<sup>5</sup>

Na principu blokády vstupu kalciových iontů do neuronu funguje memantin, který je účinný jak v monoterapii, tak v kombinaci s rivastigminem. V doplňkové terapii se dále používá například standardizovaný extrakt z *Ginkgo biloba* L. či vitamin E, nicméně jejich účinek v této indikaci prokázán nebyl.<sup>5</sup>

Na výzkumu Alzheimerovy choroby se podílí i Univerzita Karlova. V rámci primárního screeningu se ukázalo, že některé extrakty z rostlin čeledi Papaveraceae vykazují slibnou inhibiční aktivitu vůči cholinesterasám a jsou vhodné pro další testování. Ve své diplomové práci se zabývám alkaloidy rostliny *Papaver rhoeas* L. a jejich inhibičním účinkem na acetylcholinesterasu, butyrylcholinesterasu a prolyloligopeptidasu.

## 2 Cíl diplomové práce

Cíle diplomové práce:

1. izolace alespoň jednoho alkaloidu v čisté formě za použití chromatografických metod z vybrané frakce získané na chromatografickém sloupci ze sumárního alkaloidního extraktu z *Papaver rhoeas* L. (Papaveraceae);
2. identifikace struktury izolovaného alkaloidu spektrálními metodami (příprava vzorků na NMR a GC-MS analýzu), změření optické otáčivosti a teploty tání;
3. příprava vzorků na biologické testy – *in vitro* inhibice lidských cholinesteras a prolyloligopeptidasy.

## 3 Teoretická část

### 3.1 Alzheimerova choroba

Alzheimerova choroba (AD) je primární neurodegenerativní onemocnění, které postihuje zejména starší pacienty a projevuje se jako pozvolna progredující demence. Jeho přesná etiologie je doposud neznámá. Jako první popsal tuto chorobu roku 1907 německý psychiatr a neuropatolog Alois Alzheimer, po němž byla také o několik let později pojmenována.<sup>3,6</sup>

#### 3.1.1 Epidemiologie

Výskyt demence je významně ovlivňován věkem – její pravděpodobnost se od 60. roku života každých pět let zdvojnásobuje. Prevalence AD je u osob starších 60 let zhruba 5–7 %. Z údajů České alzheimerovské společnosti vyplývá, že počet lidí s demencí je v České republice možné odhadnout na 152,7 tisíc.<sup>7</sup>

Propukne-li AD před 65. rokem života, jedná se o tzv. formu s časným začátkem, jinak též „presenilní“. Pokud jsou první příznaky nemoci identifikovány v 65 letech a výše, hovoří se o AD s pozdním počátkem. U dětí a mladistvých se pak vyskytuje zcela vzácně.<sup>3</sup> Průzkumy dále prokázaly, že vedle věku se na výskytu podílí i pohlaví. U žen se AD objevuje třikrát častěji než u mužů, což pravděpodobně způsobuje fakt, že se ženy průměrně dožívají vyššího věku.<sup>8</sup>

#### 3.1.2 Rizikové faktory

AD je multifaktoriální onemocnění, za jehož vznikem stojí různé geneticko-environmentální interakce. Právě genetická predispozice je jeho nejvýznamnějším rizikovým faktorem. Bylo prokázáno, že asi 2–5 % všech případů AD jsou způsobeny autozomálně dominantní mutací na chromozomech 21, 14 a 1, nesoucích geny pro amyloidní prekurzorový protein (APP), presenilin 1 a presenilin 2.<sup>9</sup> Dalším genetickým faktorem, jemuž se přičítá až 20 % případů AD, je přítomnost apolipoproteinu E (ApoE), konkrétně nosičství ApoE4 alely. Ta je zodpovědná za obě formy onemocnění, zejména však za formu s časným počátkem.<sup>10</sup> Mezi další rizikové faktory se řadí kouření, hypertenze, diabetes mellitus a vysoká hladina cholesterolu (obecně přítomnost metabolického syndromu). Svou roli hraje také nižší úroveň vzdělání nebo prodělané mozkové trauma.<sup>11</sup>

### 3.1.3 Prevence

Primární prevence AD zahrnuje klasická doporučení pro zdravý životní styl – snížit příjem nasycených mastných kyselin, zařadit do jídelníčku více ovoce a zeleniny, přijímat dostatek vitamínů (zejména vitamin E a B12) a alespoň třikrát do týdne 40 minut provádět aerobní aktivitu. Z doplňků stravy volit takové, které neobsahují železo a některé studie varují i před obsahem hliníku.<sup>6</sup>

Sekundární prevenci představuje zachycení nemoci v jejím preklinickém stadiu, tzn. dříve, než propuknou charakteristické symptomy. K tomu slouží speciální diagnostické postupy.<sup>6, 10</sup>

Je-li již AD prokázána, cílem terciární prevence je především zvýšit kvalitu života a zpomalit progradaci nemoci. Využívá se kombinace kognitivního tréninku a vhodné medikace.<sup>10</sup>

### 3.1.4 Klinický obraz

Symptomatologie AD je v odborných publikacích popisována triádou „ABC“ (A = Activities of daily living, B = Behavioural changes, C = Cognition), která charakterizuje výskyt příznaků této nemoci a s ní souvisejících potíží v časové souslednosti.<sup>6</sup>

Jako první se objevují přechodné poruchy nálady a zapomětivost. Kognitivní funkce, jako je například logické uvažování, se postupně zhoršují. Mezi charakteristické projevy dále patří prostorová dezorientace, agresivita a depresivní ladění. Typické je pro pacienty postižené AD nesprávné dodržování léčby či malnutrice. Postupem času se nemoc manifestuje afázií, apraxií, agnozií a velmi častá je i inkontinence. Pozdní stádia onemocnění mohou dále vést až k imobilizačnímu syndromu a tito pacienti se stávají plně odkázáni na pomoc okolí.<sup>2,3</sup> Na základě těchto projevů lze nemoc rozdělit do tří stádií dle závažnosti: lehká, střední a těžká demence.<sup>3</sup>

Od stanovení diagnózy trvá AD průměrně 5–12 let a končí smrtí.<sup>2</sup> Bezprostřední příčinou smrti bývají např. bronchopneumonie nebo úrazy, k nimž však dochází v důsledku základní AD, a proto je tuto nemoc nutno pokládat za primární příčinu smrti.<sup>3</sup>

### 3.1.5 Neuropatologie AD

U pacientů s AD byla pozorována lehká kortikální a subkortikální atrofie. Největší rozsah atrofie byl zjištěn u temporálních rohů postranních komor a hippocampu.<sup>6</sup> Další makroskopické změny představuje depigmentace locus coeruleus a substantia nigra.<sup>12</sup> Nejmarkantnější jsou však změny mikroskopické. Jedná se o ukládání amyloidu  $\beta$  ( $A\beta$ ), který tvoří základ Alzheimerových (amyloidových) plaků. Druhým nejvýznamnějším histologickým nálezem jsou neurofibrilární klubka (tzv. tangles).<sup>3</sup>

Přesná etiologie této choroby známa není. Existuje pro ni několik hypotéz, které jsou podloženy různými vědeckými poznatky. Podle nich má na vznik AD vliv nedostatek acetylcholinu (ACh), genetická predispozice, oxidační stres, probíhající záněť<sup>3</sup> a aktivita prolyloligopeptidasy (POP).<sup>13</sup>

#### 3.1.5.1 Senilní plaky

Na 21. chromozomu se nachází gen kódující APP. Tento transmembránový protein je tvořen 695 aminokyselinami (AMK) a jeho štěpením specifickými enzymy vznikají různě dlouhé fragmenty.<sup>14</sup> Za fyziologických podmínek jej štěpí enzym  $\alpha$ -sekretasa na nejvýše 40-AMK velké peptidy. Tyto štěpné produkty jsou solubilní, tělu vlastní a jejich role v organismu není zcela známá (předpokládána funkce je však neuroprotektivní).<sup>3,15</sup> U pacientů s AD dochází k mutaci 21. chromozomu. Tato mutace zapříčiní, že se na štěpení APP podílí převážně  $\beta$ -sekretasa a  $\gamma$ -sekretasa, které dávají vznik delším peptidovým úsekům o 42 AMK. Tyto peptidy již nejsou solubilní, naopak mají schopnost se koagulovat a polymerovat. Formují se do fibril a dávají vznik  $A\beta$ , jehož depozita se nazývají alzheimerovské, amyloidní nebo také senilní plaky.<sup>3,15</sup> „Jsou to okrouhlé útvary velikosti 10–200  $\mu\text{m}$ , nacházíme je zejména v mozkové kůře, hippocampu, podkorové šedi a mozečku.“<sup>6</sup> Tyto nerozpustné útvary jsou pro AD naprosto charakteristickým mikroskopickým nálezem.<sup>3,6,15</sup>

Kromě mutace genu pro APP se na zvýšené produkci a ukládání  $A\beta$  podílí i mutace genu pro transmembránové proteiny presenilin 1 (PS1) a presenilin 2 (PS2), nacházející se na lidských chromozomech 1 a 14.<sup>15</sup>

V místě vzniklého amyloidního plaku následně dochází k odumírání neuronů. Vytváří se gliový lem a vzniká sterilní záněť. Odezvou organismu je změna



mikrogliových elementů na makrofágy a uvolnění cytokinů a volných kyslíkových radikálů.<sup>15</sup>

V současné době se výzkum ubírá směrem zmíněných sekretas, konkrétně inhibitorů jejich aktivity. Ty působí na principu vazby na jejich specifické podjednotky. Některé  $\beta$ -sekretasové inhibitory se již zkouší v rámci klinických testů.<sup>16</sup>

### **3.1.5.2 Neurofibrilární klubka**

Tvorbu neurofibrilárních tangles, neboli klubek, způsobuje hyperfosforylovaný  $\tau$ -protein.  $\tau$ -Protein je s mikrotubuly asociovaný protein (MAP), který ovlivňuje jejich stabilizaci tím, že interaguje s tubulinem. Byl objeven roku 1975 a později byla určena i jeho struktura. Existuje v šesti isoformách o 352 – 441 AMK, lišících se nejen počtem AMK, ale také počtem vazebných domén na C-konci proteinu. Čím více domén daná isoforma  $\tau$ -proteinu obsahuje, tím lepší je její schopnost stabilizovat neuronální mikrotubuly.<sup>17,18,19</sup> Gen kódující  $\tau$ -protein se nachází na 17. chromozomu a alternativním spojením jednotlivých exonů vznikají konkrétní isoformy.<sup>15</sup>

Prostřednictvím kinas dochází na mnoha místech k fosforylaci  $\tau$ -proteinu. Fosfatasy jej naopak defosforylují a za fyziologických podmínek, tedy u zdravého člověka, jsou oba procesy v rovnováze.<sup>17,18</sup> Pro AD je typická hyperfosforylace tohoto proteinu, způsobená mutací jeho posttranslační modifikace. Takto degenerovaná vlákna se formují do párově helikálních filament. Jejich další agregace vede ke vzniku klubek, tzv. neurofibrilárních tangles (košíčků, uzlíčků).<sup>3,6,20</sup> Při mikroskopickém zobrazení připomínají plamínky či tenisové rakety.<sup>6</sup> Tyto nerozpustné struktury poškozují cytoplazmatické funkce neuronů, narušují normální axonový transport, a tím vedou k jejich zániku.<sup>3,6,19</sup>

Perspektivu v léčbě AD představují léčiva, která by působila jako inhibitory proteinových kinas, napodobovala funkci fosfatas nebo měla schopnost přerušovat  $\tau$  –  $\tau$  interakce a tím zabraňovat jejich agregaci do klubek.<sup>19</sup>

### **3.1.5.3 Apolipoprotein E**

Jak již bylo zmíněno, také ApoE sehrává ve výskytu AD svou roli. ApoE je polymorfní, což znamená, že existuje ve více isoformách: ApoE2, ApoE3 a ApoE4. Všechny tři isoformy mají 299 AMK a mezi sebou se liší pouze v jedné AMK.

V periferní tkáni je ApoE produkován především játry, v nervovém systému astrocyty. Podstatou jeho existence je transport lipoproteinů, vitaminů rozpustných v tucích a cholesterolu na specifické ApoE receptory. Tento transport se liší v závislosti na dané isoformě. Zatímco ApoE2 a ApoE3 mají vyšší afinitu k HDL částicím, ApoE4 preferuje větší částice, jako je VLDL.<sup>19,21</sup>

Osoby, u kterých se vyskytuje alela ApoE4, mají vyšší pravděpodobnost vzniku AD. Přítomnost této alely však není pro AD nezbytná. Výzkumy uvádí, že ačkoliv 40–65 % pacientů s AD má minimálně jednu tuto alelu, existují i jedinci, kteří jsou ApoE4 homozygotní a nemoc se u nich neprojevila.<sup>19</sup> Nicméně jak již bylo uvedeno, tomuto genetickému faktoru se přičítá až 20 % všech onemocnění AD. ApoE3 je ve vztahu k AD považována za neutrální, ApoE2 dokonce za protektivní.<sup>19,21</sup> ApoE4 se dále váže na A $\beta$  a přispívá k jeho ukládání v mozku a tvorbě plaků. Toto zjištění dává vědcům námět pro výzkum různě lipidovaných forem ApoE, které by se vázaly na A $\beta$  a byly jej zároveň schopny degradovat.<sup>21</sup>

#### ***3.1.5.4 Volné kyslíkové radikály***

Volné kyslíkové radikály (ROS) zaujímají v těle důležitou funkci signálních molekul. Pokud však nastane nerovnováha mezi jejich vznikem a odbouráváním, tělu výrazně škodí. Tento redoxní stav se nazývá oxidativní stres a pro proces stárnutí je charakteristický.<sup>22</sup>

Existují studie, které považují ROS způsobující oxidační stres za hlavní příčinu vzniku AD. ROS vznikají v celém těle, ale v rámci AD se na jejich zvýšeném generování podílí především mitochondrie, hyperfosforylový  $\tau$ -protein a senilní plaky.<sup>22</sup>

Hlavním producentem ROS a zároveň jejich cílem jsou mitochondrie, které následně produkují méně ATP. Mimo jiné jsou oxidovány důležité biomolekuly jako mastné kyseliny (MK), nukleové kyseliny (NK) a proteiny. Jelikož je mozek mimořádně citlivý, uvedené změny se projeví na jeho funkčnosti a kognitivních schopnostech.<sup>22</sup> Další studie prokázala, že ROS se uvolňují i při spontánní glykaci párově helikálních filament  $\tau$ -proteinu. Vedle vzniku oxidačního stresu tak dochází i ke zvýšené transkripci A $\beta$ .<sup>20</sup> Zvýšené množství ROS vzniká i v okolí senilních plaků, kde dochází k rozsáhlé neurodegeneraci.<sup>3</sup>

### **3.1.5.5 Zánět**

Se vznikem AD přímo souvisí i zánět, k němuž dochází především v okolí senilních plaků v mozku. Akumulace A $\beta$  aktivuje mikroglie a astrocyty a dochází k uvolňování většího množství mediátorů zánětu. Mezi ně patří zejména prozánětlivé cytokiny, například interleukin 1 (IL-1), IL-2 a tumor nekrotizující faktor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). Všechny tyto látky způsobují poškození mozkových neuronů, jehož následkem je apoptóza.<sup>3,23</sup> Dále vzniká cyklooxygenasa 2 (COX-2). Působením tohoto enzymu vznikají prostaglandiny z kyseliny arachidonové, což k zánětu také významně přispívá.<sup>3,24</sup>

### **3.1.5.6 Aktivita prolyloligopeptidasy**

Dle dalších výzkumů se v neuropatologii AD uplatňuje enzym POP. Jedná se o serinovou proteasu, která hydrolyzuje peptidickou vazbu na karboxylovém konci L-prolinu. V mozku tak jejím prostřednictvím dochází k degradaci některých neuropeptidů, jako například vasopresinu, oxytocinu, bradykininu a substance P. Tyto neuropeptidy mají také vliv na kognitivní funkce, zejména učení a paměť. Předpokládá se, že právě POP přispívá procesu neurodegenerace, jež ústí v AD a demenci.<sup>13</sup>

Zvýšené hladiny zmíněných neuropeptidů u testovaných zvířat prokázaly zlepšení kognitivních funkcí. Podávání inhibitorů POP laboratorním krysám přineslo uspokojivé výsledky z hlediska paměťových schopností. Tím se inhibitory POP přesunuly z preklinických do klinických studií, a představují tak další možnou perspektivu v boji proti AD.<sup>13</sup>

## **3.1.6 Diagnostika a diferenciální diagnostika**

AD se vyznačuje pomalým, plíživým vývojem s postupným zhoršováním příznaků. Pro diagnózu demence se využívají běžná screeningová vyšetření jako například test hodin a MMSE (krátká škála mentálního stavu) spolu s komplexním neuropsychologickým vyšetřením. Samotná diagnóza AD se potom stanovuje pouze vyloučením jiných etiologií demence.<sup>2,3,6</sup>

Od ostatních typů demence se AD liší především tím, že při ní nedochází k větším výkyvům příznaků v kratším časovém horizontu a obvykle se nevyskytují halucinace nebo přídatná deliria.<sup>3</sup> Přítomnost mozkového nádoru jako příčiny demence pomohou vyloučit zobrazovací techniky jako nukleární magnetická rezonance (MRI) nebo počítačová tomografie (CT).<sup>3,6</sup>

Diagnóza se proto s nejvyšší přesností stanovuje pouze jako „pravděpodobná“ nebo také „možná“ AD. Jistou AD určí pouze mozková biopsie nebo až patologické vyšetření post mortem.<sup>2,3,6</sup>

### **3.1.7 Léčba AD**

Pro farmakoterapii symptomů AD se používají především dvě skupiny léčiv, jejichž účinek byl prokázán. Sem patří inhibitory acetylcholinesteras a inhibitory NMDA receptorů. Ostatní léčiva jsou pouze doplňkovou terapií a jejich užití není založeno na důkazech (EBM). Celá řada dalších léčiv se v současné době nachází ve fázi preklinických a klinických testů.<sup>3</sup>

Kromě farmakoterapie je důležitá i péče o pacienta stran rodinných příslušníků či specializovaných pečovatелů. Pro pacienty s AD existují speciální rehabilitační programy, kde probíhá reedukace základních aktivit běžného života. Je důležité, aby se pacientům dostával pocit jistoty a podpory. Tím se sníží napětí úzkost pacienta, což může vést ke zvýšení jeho výkonnosti a koncentrace.<sup>6</sup>

#### ***3.1.7.1 Funkce acetylcholinu***

Jednu z hlavních úloh má v patofyziologii AD ACh. Jedná se o neurotransmitter vznikající v retikulární formaci z cholinu a acetylkoenzymu A prostřednictvím enzymu zvaného cholinacetyltransferasa. Během neurotransmise je ACh uvolněn do synaptické štěrbině, kde se na postsynaptické membráně váže na cholinergní receptory (nikotinové a muskarinové). Tímto způsobem se přenáší vzruch a ovlivňuje mimo jiné právě kognitivní funkce. V patofyziologii AD se uplatňují zejména muskarinové receptory, konkrétně typ M1, který se nachází v nervových buňkách. ACh má velmi krátký poločas a enzymy zvané esterasy (hydrolasy) jej nakonec opět rozkládají.<sup>25</sup>

Před více než 30 lety bylo objeveno, že u AD dochází ke ztrátě enzymů syntetizujících ACh a tím k poruše jeho tvorby a jeho následnému nedostatku. To vedlo ke stanovení tzv. cholinergní hypotézy, která říká, že za AD stojí deficit cholinergní transmise v centrální nervové soustavě, především v mozkové kůře, který způsobuje kognitivní dysfunkce.<sup>26</sup>

### 3.1.7.2 Cholinesterasy

Acetylcholinesterasa (AChE) a butyrylcholinesterasa (BuChE) jsou enzymy, které ACh hydrolyticky rozkládají na cholin a kyselinu octovou. Jedná se o reakci, která je nezbytná, aby se neuron mohl po jeho aktivaci znovu vrátit do klidového stavu.<sup>27,28</sup>

AChE je v těle přítomna především v mozkových buňkách, nervosvalové ploténce a erytrocytech, BuChE v gliích a plasmě. Obě se vyskytují v několika asymetrických formách, které mají podobné katalytické vlastnosti, ale liší se svou oligomerní strukturou, tzn. v počtu podjednotek (monomerní G1, dimerní G2 a tetramerní G4).<sup>27</sup>

V posledních letech bylo objeveno, že AChE má kromě vlivu na nervovou transmisi podíl i na dalších dějích v těle. Jedná se například o růst neuronů nebo právě amyloidních fibril, typických pro AD. Přesná funkce BuChE zatím objasněna nebyla.<sup>28</sup>

Rozdíly ve struktuře obou enzymů se odráží na jejich substrátové specifitě. Zatímco AChE má vysokou specifitu k hydrolýze ACh, substrátem BuChE mohou být i jiné látky.<sup>27,28</sup>

### 3.1.7.3 Inhibitory acetylcholinesteras

Inhibice zmíněných cholinesteras vede k prolongaci existence ACh a tím také jeho účinku, čehož se ve farmacii využívá při léčbě nemocí se sníženou hladinou ACh.<sup>28</sup>

Pro farmakoterapii AD se používají reverzibilní inhibitory acetylcholinesteras, které zvyšují hladinu ACh tím, že snižují jeho rozklad. Dojde ke zvýšení cholinergní neurotransmise v mozku a kompenzaci ztráty funkčních mozkových buněk.<sup>29</sup> Nasazují se k léčbě lehké až středně těžké demence, tedy v počátečních stádiích AD.<sup>6</sup> Mezi jejich zástupce patří tři hlavní látky: donepezil, rivastigmin a galanthamin. Dříve používaný takrin byl z trhu stažen z důvodu závažných nežádoucích účinků, zejména hepatotoxicity.<sup>29</sup>

**Donepezil** je piperidinový derivát, který reverzibilně a s vysokou selektivitou inhibuje AChE, BuChE inhibuje méně. Reverzibilní účinek znamená, že blokáda enzymu trvá velmi krátce (v řádech minut) a potom je vazba enzym-léčivo hydrolyzována.<sup>25</sup> Užívá se jedenkrát denně, obvykle před spaním, v dávce 5 mg. Ta se po zhruba jednom měsíci zvýší na 10 mg.<sup>29</sup> Kromě typických cholinergních

vedlejších účinků, jako je nevolnost, bolestivé spazmy trávicího ústrojí či průjem, je snášen relativně dobře.<sup>25</sup>

**Galanthamin** je terciální alkaloid původně izolovaný z rostliny *Galanthus woronowii* Losinsk., Amaryllidaceae. Jeho obsah byl detekován i u dalších zástupců této čeledi. Z ekonomických důvodů se dnes však získává synteticky. Stejně jako v případě donepezilu se jedná o reverzibilní selektivní inhibitor AChE. Kromě inhibice tohoto enzymu se galanthamin zároveň chová jako alosterický modulátor nikotinových receptorů, čímž účinnost acetylcholinu potencuje.<sup>25</sup> Léčba se obvykle zahajuje dávkou 4 mg dvakrát denně a postupně se zvyšuje až na 12 mg dvakrát denně. Z uvedených látek této skupiny bývá snášen nejhůře, nicméně postupná a opatrná titrace podávaného množství může jeho dlouhodobou snášenlivost zlepšit.<sup>29</sup>

**Rivastigmin** je léčivo karbamátového typu, které vykazuje inhibiční aktivitu vůči AChE i BuChE.<sup>25,29</sup> Od obou předchozích se liší i tím, že inhibice je pseudo-ireverzibilní povahy, jelikož trvá téměř deset hodin.<sup>30</sup> I pro něj je typické působení na nikotinových receptorech, jež přispívá ke zlepšení kognitivních funkcí. Počáteční denní dávka je 2× 1,5 mg a postupně se titruje. Každé čtyři týdny se zvýší o 3 mg, až se ustálí na 12 mg denně. Obvykle se užívá perorálně, ale pro minimalizaci nežádoucích účinků je dostupný i ve formě transdermálních náplastí. Nežádoucí účinky jsou podobné jako u ostatních AChE inhibitorů a zahrnují zejména nezávažné gastrointestinální potíže.<sup>29</sup>

**Huperzin A (HupA)** je sloučenina vycházející z tradiční čínské medicíny. Strukturně se jedná o seskviterpenický alkaloid rostliny *Huperzia serrata* Thunb. (Qian Ceng Ta). V Číně byla tato plavuň po staletí využívána k léčbě horečky, zánětů či schizofrenie.<sup>31</sup> HupA se chová jako vysoce specifický, reverzibilní inhibitor AChE, nicméně studie prokázaly, že jeho farmakologický účinek má více aspektů. Kromě „cholinergních“ účinků chrání HupA neurony před oxidativním působením Aβ končícím jejich apoptózou, zabraňuje poškození mitochondrií a jejich následné dysfunkci. Zároveň se chová jako antagonist NMDA (*N*-methyl-*D*-aspartátových) receptorů, čímž snižuje excitotoxicitu vyvolanou glutamátem.<sup>32</sup> Jeho další výhodou je, vedle mnohostranného farmakologického působení, minimální výskyt nežádoucích účinků.<sup>31,32</sup>

Nejnovější výzkumy prokázaly, že HupA snižuje kumulaci železa v mozkové tkáni. Tento objev ještě více potvrzuje domněnku, že by se mohlo jednat o látku významně zpomalující proces neuronální smrti a tím tak progresi demence. V Číně už se HupA v klinické terapii používá, v Evropě jej od uvedení na trh stále dělí mnohé testy.<sup>32</sup>

#### **3.1.7.4 Inhibitory NMDA receptorů**

NMDA receptor je specifický typ ionotropních glutamátových receptorů. Excitační AMK glutamát se váže na receptor AMPA ( $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxalon), vede k vtoku  $\text{Na}^+$  iontů a tím k depolarizaci membrány. To způsobí, že prostřednictvím NMDA receptorů, které byly doposud blokovány ionty  $\text{Mg}^{2+}$ , dojde k influxu  $\text{Ca}^{2+}$  iontů do buňky. Následuje široká škála enzymatických procesů, které se podílí právě na procesu učení a mají vliv na paměť.<sup>33</sup>

Pro AD je charakteristická excesivní aktivita glutamátu, vedoucí k nadměrnému dráždění NMDA receptorů a následně k neurotoxicitě. Vzhledem k tomu, že se jedná o excitační AMK, nazývá se tento stav excitotoxicita. Poškození neuronů způsobuje poruchy jejich funkce a končí neuronální smrtí.<sup>33,34</sup>

**Memantin**, jakožto jediný zástupce této skupiny, je nekompetitivní inhibitor NMDA receptorů a používá se pro léčbu středně těžké až těžké AD. Jeho působení spočívá v navázání na NMDA receptory, blokadě patologické aktivace a nadměrné stimulaci glutamátem. Vrací jim původní synaptickou funkci a chrání tak neurony před poškozením.<sup>34</sup>

Obvyklá denní dávka memantinu představuje jedenkrát denně 40 mg, případně dvakrát denně 20 mg. Vzhledem k tomu, že jeho exkrece je z 80 % renální, snižuje se denní dávka u osob, které mají závažné onemocnění ledvin, na 10 mg. Na plazmatické bílkoviny se váže zcela minimálně, proto při jeho užívání nedochází k žádným klinicky významným interakcím. Podáván je perorálně a jeho tolerance mezi pacienty je vysoká. Z nežádoucích účinků se nejčastěji vyskytují závratě, bolest hlavy či zácpa.<sup>34</sup> Účinný je jak v monoterapii, tak při společném podávání s donepezilem.<sup>5</sup>

### 3.1.7.5 Další možnosti terapie

Terapie následujícími léčivými neodpovídá EBM, tzn. pro její účinnost neexistuje dostatek validních důkazů. Využívá se proto jako terapie doplňková k již zmíněným léčivům.<sup>5</sup>

Extrakt z *Ginkgo biloba* L. (EGb 761) je jedním z nejpobulárnějších rostlinných extraktů. Obsahové látky tvoří především flavonoidy a terpeny (ginkgolidy a bilobalidy), jimž je přičítán antioxidační účinek. Působí jako zhášeče volných radikalů a tím zabraňuje peroxidaci lipidů. Přesný mechanismus účinku na nervový systém zatím nebyl plně objasněn.<sup>35</sup> Aby mohl být EGb 761 zařazen do standardní terapie AD, musí projít řadou klinických studií. Jeho účinek již však byl v rámci mnoha testů ve srovnání s placebem prokázán.<sup>5</sup>

**Nesteroidní antiflogistika** (NSAID) jsou skupinou látek zahrnující salicyláty, fenamáty, fenaky, profeny, oxikamy, koxiby a další.<sup>36</sup> Jejich mechanismus je založen na inhibici cyklooxygenáz (zejména COX-2), enzymů katalyzujících přeměnu kyseliny arachidonové na eikosanoidy. Eikosanoidy jsou dvacetihlíkaté signální molekuly hrající klíčovou roli v etiologii zánětu. Jelikož jedním z hlavních rysů AD je právě zánět, jeví se NSAID jako nadějný prostředek pro její léčbu.<sup>37</sup>

Epidemiologické průzkumy u pacientů s revmatoidní artritidou, kteří byli dlouhodobě léčeni NSAID, vztah mezi touto léčbou a výskytem AD opravdu prokázaly. Tyto výsledky vedou k domněnce, že NSAID mohou snižovat riziko vzniku AD a zpomalovat progresi tohoto onemocnění. Testování NSAID na experimentálních modelech AD přineslo též pozitivní výsledky. Studie klinické však uspokojivé výsledky nepřinesly, proto výzkumy stále pokračují.<sup>37</sup>

**Vitamin E**, neboli  $\alpha$ -tokoferol, patří do skupiny vitaminů rozpustných v tucích a má antioxidační vlastnosti.<sup>38</sup> Rozsáhlá, dvojité zaslepená studie v porovnání s placebem prokázala, že vitamin E snižuje oxidační stres vznikající při AD, a tím vede ke zpomalení její progresi. To bylo zaznamenáno zejména u pacientů, kteří užívali zároveň inhibitory AChE.<sup>39</sup>

Z dalších antioxidantů, které by mohly v budoucnu léčbě AD také sloužit, se testují vitamin C, koenzym Q10, selen a omega-3 MK.<sup>40</sup>



Pro doplňkovou léčbu kognitivních poruch je v některých zemích užíván **piracetam**. Patří do skupiny nootropik a jako jejich prototyp byl v nedávné době testován i na experimentálních modelech AD. Bylo prokázáno, že zlepšuje funkčnost poškozených mitochondrií, čímž zvyšuje produkci ATP a působí neuroprotektivně.<sup>41</sup>

**Cerebrolysin** je parenterálně podávaná směs peptidů, která se získává z mozku vepřů.<sup>42</sup> Léčba cerebrolysinem přinesla pacientům s lehkým až středně těžkým stádiem AD celkové zlepšení projevů nemoci bez viditelných nežádoucích účinků.<sup>43</sup>

Vyšší incidence AD u žen než u mužů vedla k názoru, že k jejímu vzniku u postmenopauzálních žen může přispívat také snížená hladina **estrogenů**. Hypotézu, že by jejich podávání mohlo působit protektivně, však klinické studie vyloučily.<sup>44</sup>

## 3.2 *Papaver rhoeas* L. (Papaveraceae)

### 3.2.1 Taxonomické zařazení

Oddělení: Magnoliophyta

Třída: Magnoliopsida

Podtřída: Ranunculidae

Řád: Papaverales

Čeleď: Papaveraceae

Rod: *Papaver* L.

Druh: *Papaver rhoeas* L. – vlčí mák<sup>45</sup>



Obr. 1 *Papaver rhoeas* L.<sup>46</sup>

### 3.2.2 Charakteristika čeledi Papaveraceae

Zástupci čeledi Papaveraceae, česky makovité, jsou jednoleté, dvouleté či vytrvalé byliny, řidčeji i dřeviny. Charakteristický je pro ně mléčný nebo vodový latex v mléčnicích, které jsou obsaženy ve všech částech těla kromě semen. Listy jsou jednoduché, dělené až zpeřené, bez palistů. Květy vždy oboupohlavné, obvykle

pravidelné nebo souměrné. Počet a vzhled květních částí se druh od druhu liší. Plodem je tobolka, šešule nebo šešulka.<sup>47</sup>

Jedná se o rostliny rozšíření převážně v mírném až subtropickém pásmu severní polokoule, pouze jeden druh je zastoupen i v jižní Africe.<sup>47</sup> Uvádí se, že čeleď Papaveraceae zahrnuje asi 770 druhů v 42 rodech.<sup>48</sup>

### **3.2.3 Morfologický popis *Papaver rhoeas* L.**

*Papaver rhoeas* L. je jednoletá přímá bylina s hustě štětinatou, 20–90 cm vysokou lodyhou. Listy jsou peřenodílné až peřenosečné, spodní řapíkaté a horní přisedlé. Mají ostře zubaté úkrojky, přičemž úkrojky lodyžních listů jsou obvykle větší než úkrojky listů postranních. Květy vyrůstají na stopkách, které mohou být přitiskle či odstále štětinaté. Červené korunní lístky mají na bázi tmavofialovou až černou skvrnu a za květu se vzájemně překrývají. Blizna může být plochá nebo vypouklá a pro pylová zrna je typická šedo zelená barva. Plodem *Papaver rhoeas* L. je tobolka.<sup>45</sup>

### **3.2.4 Použití v lidovém léčitelství**

Před vyvinutím syntetických léčiv představovaly rostlinné extrakty jedny z hlavních prostředků tradiční medicíny. Extrakty z vlčího máku byly podávány při léčbě nejrůznějších onemocnění, například zánětů, průjmů, poruch spánku či kašle. Uvádí se i schopnost potlačovat abstinenční příznaky a způsobit znecitlivění. Mimo jiné se vlčímu máku připisují účinky sedativní, narkotické a emolienční.<sup>49</sup>

### **3.2.5 Obsahové látky**

Mezi nejvýznamnější obsahové látky rodu *Papaver* patří alkaloidy isochinolinového typu. Kvalitativní a kvantitativní rozdíly v jejich obsahu závisí, kromě konkrétního druhu rostliny, také na klimatu, prostředí a složení půdy.<sup>50</sup> Jako příklad kvalitativního a kvantitativního rozdílu v obsahu alkaloidů uvádím v následující tabulce výsledky z výzkumu vybraných taxonů rodu *Papaver* v Iráku, mezi nimi také *Papaver rhoeas* L. Při tomto výzkumu byly izolovány desítky alkaloidů, u 16 z nich se zároveň podařilo identifikovat jejich strukturu. Extrakty byly získány jak z kořenů, tak z nadzemní části rostlin.<sup>51</sup>

Tab. 1 Alkaloidy iráckých druhů rodu *Papaver*

	1	2	3	4	5	6	7	8
mekambrin	-	-	-	-	-	-	+	-
floripavidin	+	-	+	-	-	-	-	-
<i>N</i> -methylassimilobin	+	-	-	-	-	-	-	-
roemerin	-	-	-	-	+	-	+	-
dehydroroemerin	-	-	-	-	+	-	+	-
liriodenin	-	-	-	-	+	-	+	-
alpinigenin	+	-	-	-	-	-	-	-
rhoeagenin	-	+	+	-	+	-	-	-
rhoeadin	+	-	-	-	-	-	-	-
glaukamin	-	-	-	-	+	-	-	+
glaudin	+	-	-	-	-	-	-	+
protopin	-	+	-	+	-	+	+	-
kryptopin	-	-	+	-	-	-	-	-
allokryptopin	-	-	-	+	-	-	-	-
cheilanthifolin	-	-	-	-	-	+	-	-
narkotin	+	-	-	-	-	-	-	-

1 *P. persicum* Lindl., 2 *P. acrochaetum* Bornm., 3 *P. armeniacum* (L.), 4 *P. curviscapum* Nabk., 5 *P. glaucum* Boiss. et Hausskn., 6 *P. macrostomum* Boiss. et Huet, 7 *P. rhoeas* L., 8 *P. hybridum* L.

Další studie, soustředěné pouze na druh *Papaver rhoeas* L., vedly k identifikaci mnoha dalších isochinolinových alkaloidů, které lze pro přehlednost na základě jejich struktury rozdělit do následujících strukturních skupin:

- typ protoberberinový
- typ proaporfinový
- typ aporfinový
- typ ftalidisochinolinový
- typ protopinový
- typ rhoeadinový

Přehled všech doposud izolovaných isochinolinových alkaloidů z *Papaver rhoeas* L. a jejich rozčlenění do strukturních typů uvádí následující tabulka.

Tab. 2 Isochinolinové alkaloidy obsažené u *Papaver rhoeas* L.

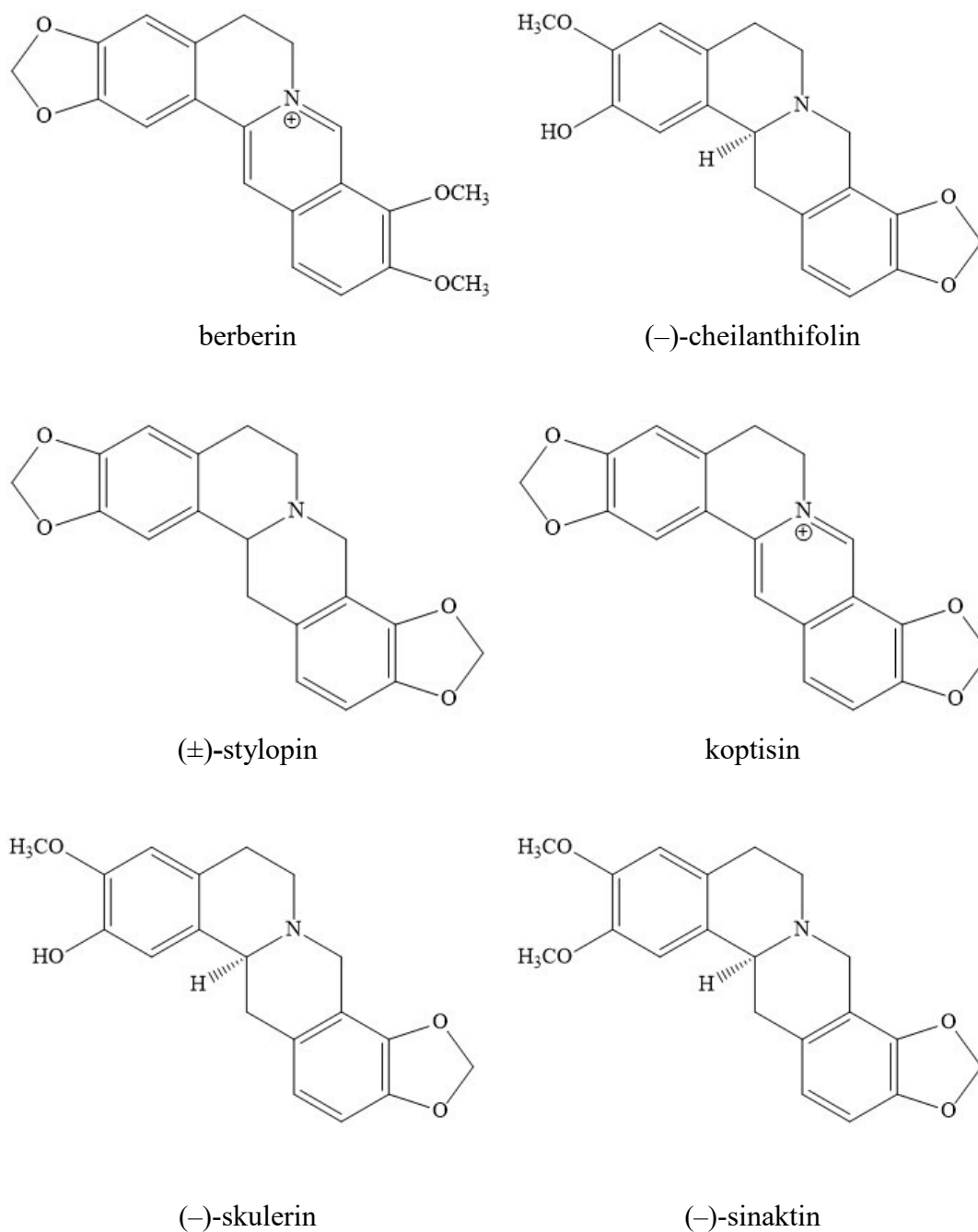
<b>Strukturní typy alkaloidu</b>	<b>Zástupci</b>
<b>protoberberinový</b>	(-)-cheilanthifolin, koptisin, (-)-skulerin, (-)-sinaktin, berberin, (±)-stylopin,
<b>proaporfinový</b>	(-)-mekambrin
<b>aporfinový</b>	(+)-isokorydin, (+)-korytuberin, (-)- <i>N</i> -methylnasimilobin, liriodenin, (+)-isoboldin, (+)-roemerin, (+)-magnoflorin, dehydroroemerin
<b>protopinový</b>	protopin, allokryptopin, kryptopin, kulteropin
<b>rhoeadinový</b>	(+)-rhoeadin, isorhoeadin, (+)-rhoeagenin, papaverrubin A, C, D, E (norrhoeadin)

### 3.2.5.1 Protoberberinové alkaloidy

Protoberberinové alkaloidy jsou hojně zastoupeny u čeledí Papaveraceae, Berberidaceae, Ranunculaceae a Fumariaceae. Jejich prekurzorem je L-tyrosin.<sup>50</sup> Z druhu *Papaver rhoeas* L. byl izolován berberin, (±)-stylopin, (-)-cheilanthifolin, koptisin, (-)-skulerin a (-)-sinaktin.

Tato skupina alkaloidů působí toxicky na bakterie, houby či hmyz. Uplatňuje se při tom v širokém spektru farmakologických procesů, jako je například inhibice syntézy DNA, biosyntézy proteinů nebo membránové permeability. Blokování reverzní transkriptasy má inhibiční vlivy na viry.<sup>50</sup>

Nejvýznamnější látkou z této skupiny je kvarterní alkaloid berberin, který, kromě již zmíněných účinků, vykazuje také aktivitu protizánětlivou, působí antimalaricky, antiarytmicky a stimuluje sekreci insulinu.<sup>50</sup> Berberin i koptisin inhibují cholinesterasy a zhasíjí ROS.<sup>52</sup>

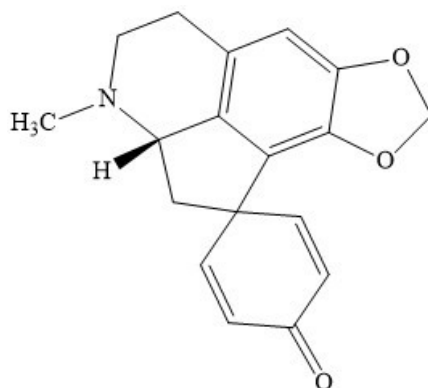


Obr. 2 Protoberberinové alkaloidy

### 3.2.5.2 Proaporfínové alkaloidy

Se zástupci této strukturní skupiny isochinolinových alkaloidů se setkáváme u čeledí Euphorbiaceae, Lauraceae, Menispermaceae a Papaveraceae. Prvními izolovanými a identifikovanými alkaloidy tohoto typu byly (+)-pronuciferin a (+)-krotonosin. Z farmakologického hlediska se jedná o potenciální lokální anestetika a antidepresiva.<sup>53</sup>

Jediným známým proaporfínovým alkaloidem izolovaným z *Papaver rhoeas* L. je (-)-mekambrin.



(-)-mekambrin

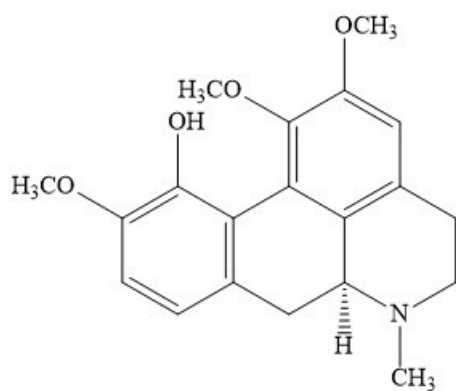
Obr. 3 Proaporfínové alkaloidy

### 3.2.5.3 Aporfínové alkaloidy

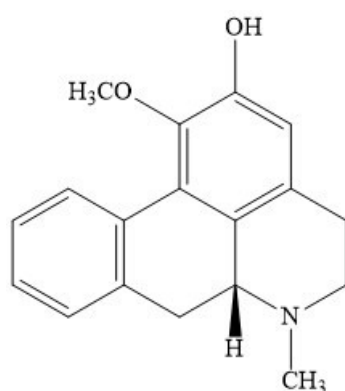
Další alkaloidy, které *Papaver rhoeas* L. obsahuje, jsou aporfínového typu. Jedná se o nejpočetněji zastoupenou strukturní skupinu isochinolinových alkaloidů u tohoto druhu a patří sem (+)-isokorydin, (-)-*N*-methylasimilobin, (+)-magnoflorin, liriodenin, (+)-korytuberin, (+)-isoboldin, (+)-roemerin a dehydroroemerin.<sup>54</sup> Kromě čeledi Papaveraceae se tyto látky dále nacházejí u čeledí Annonaceae, Berberidaceae, Lauraceae, Magnoliaceae, Monimiaceae, Ranunculaceae a Rhamnaceae.<sup>55</sup>

Typické pro aporfínovou strukturu jsou účinky antiagregační, antioxidantní a cytotoxické. (+)-Isokorydin inhibuje buněčnou proliferaci, a působí tak protinádorově.<sup>54</sup> Liriodenin působí navíc ještě antibakteriálně a antifungálně.<sup>56</sup> Anthelmintický<sup>57</sup>, antifungální a antimalarický účinek se potom uvádí u (+)-roemerinu a (-)-*N*-methylasimilobinu.<sup>58</sup>

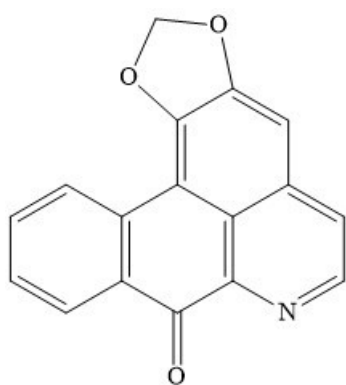
I mezi aporfínovými deriváty se objevují inhibitory cholinesteras. Jimi jsou především (+)-magnoflorin<sup>52</sup> a (-)-*N*-methylasimilobin.<sup>59</sup>



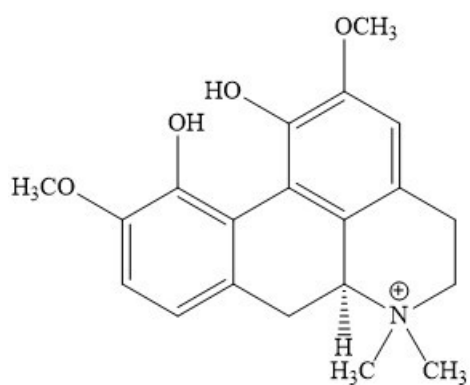
(+)-isokorydin



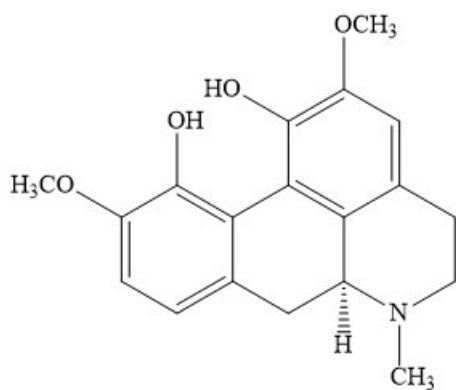
(-)-N-methylasimilobin



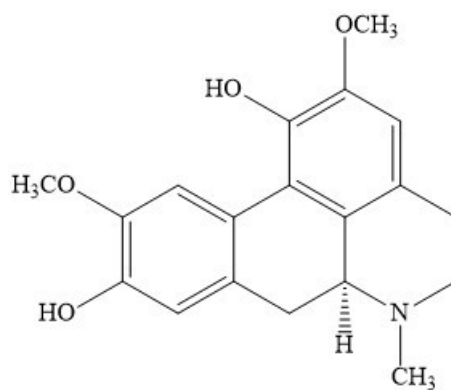
liriodenin



(+)-magnoflorin



(+)-korytuberin

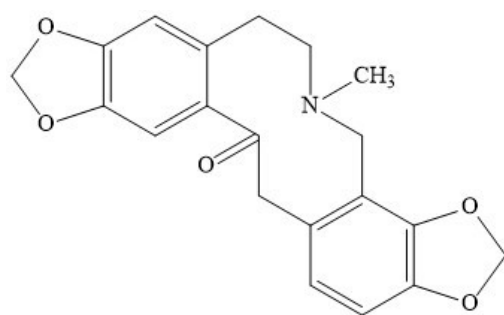


(+)-isoboldin

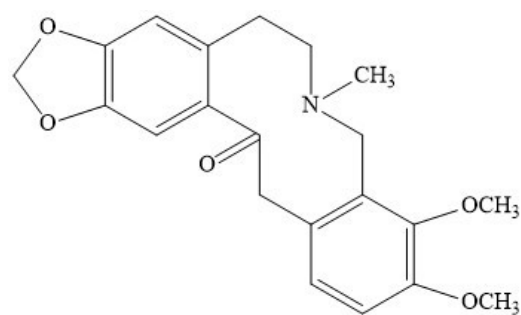
Obr. 4 Aporfinové alkaloidy



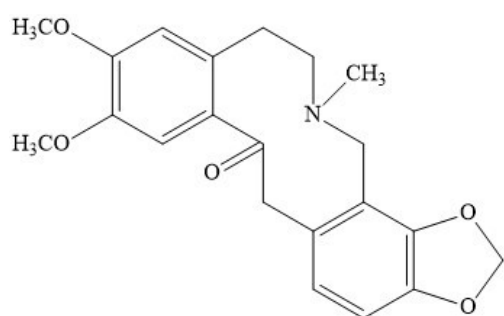




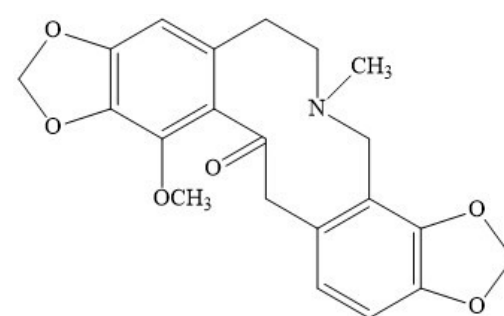
protopin



allokryptopin



kryptopin

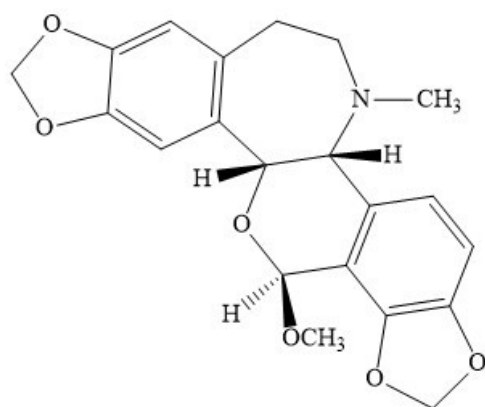


kulteropin

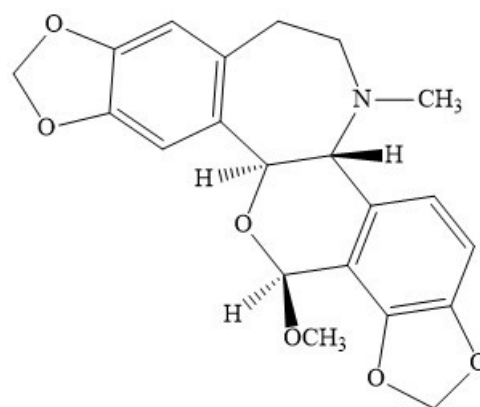
Obr. 5 Protopinové alkaloidy

### 3.2.5.5 Rhoeadinové alkaloidy

Z rhoeadinových alkaloidů se u druhu *Papaver rhoeas* L. vyskytuje (+)-rhoeadin, isorhoeadin, (+)-rhoeagenin a papaverrubin A, C, D, E (norrhoeadin). Před více než sto lety byl jako první izolován (+)-rhoeadin<sup>67</sup>, jehož účinky jsou mírně sedativní a antitusické.<sup>68</sup>

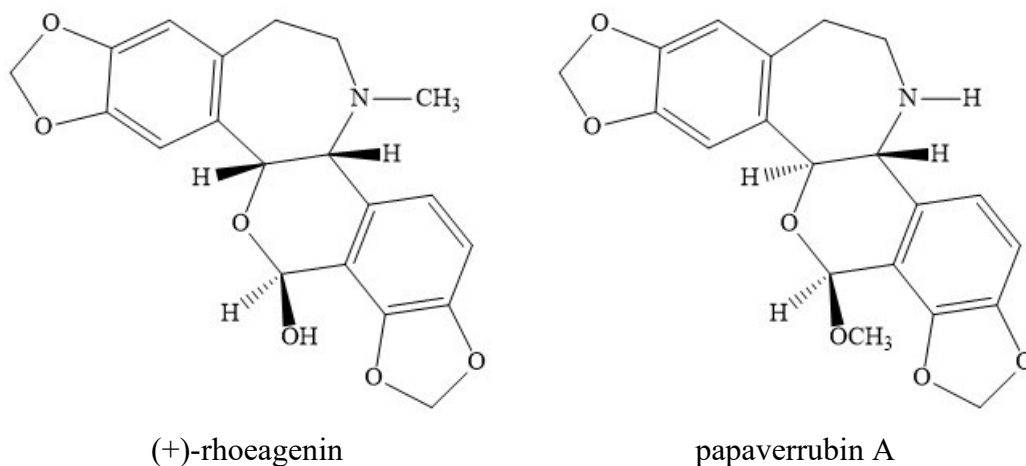


(+)-rhoeadin



isorhoeadin

Obr. 6 Rhoeadinové alkaloidy



Obr. 6 Rhoeadinové alkaloidy (pokračování)

### 3.2.5.6 Další obsahové látky

Vedle alkaloidů, jakožto hlavních farmakologicky významných obsahových látek, *Papaver rhoeas* L. dále obsahuje fenolové sloučeniny a flavonoidy.<sup>49</sup> Z flavonoidů je nejvíce zastoupen kempferol, kvercetin, luteolin, myricetin a isorhamnetin.<sup>69</sup> Červené zbarvení květů této rostliny způsobují anthocyany. Pro tyto látky je charakteristické antioxidační a antimikrobiální působení.<sup>49</sup>

## 4 Experimentální část

### 4.1 Materiál a vybavení

#### 4.1.1 Rozpouštědla a chemikálie

- amoniak vodný roztok 25-29% č. (Penta a.s., ing. Švec) ( $\text{NH}_3$ )
- cyklohexan p.a. (Penta a.s., ing. Švec) ( $\text{C}_6\text{H}_{12}$ )
- destilovaná voda ( $\text{H}_2\text{O}$ )
- diethylamin p.a. (LachNer, CZ) ( $\text{Et}_2\text{NH}$ )
- diethylether č. (LachNer, CZ) ( $\text{Et}_2\text{O}$ )
- dichlormethan p.a. (Balex, ing. Kroupa) ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ )
- ethanol 95%, denaturovaný methanolem, p.a. (Penta a.s., ing. Švec) ( $\text{EtOH}$ )
- hydroxid sodný p.a. (Penta as, ing Švec) ( $\text{NaOH}$ )
- chlorid sodný p.a. (Penta as, ing Švec) ( $\text{NaCl}$ )
- chloroform p.a. (Penta a.s., ing. Švec) ( $\text{CHCl}_3$ )
- kyselina chlorovodíková 35% p.a. (Penta a.s., ing. Švec) ( $\text{HCl}$ )
- lékařský benzín lékopisné kvality ČL 2009 (Penta a.s., ing. Švec) (LB)
- *n*-hexan p.a. (Penta a.s., ing. Švec) ( $\text{C}_6\text{H}_{14}$ )
- pyridin p.a. (LachNer, CZ) ( $\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$ )
- toluen p.a. (Penta a.s., ing. Švec) ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_3$ )

#### 4.1.2 Pomocné látky

- křemelina Celite C 535 John's Manville (Sigma-Aldrich)
- kyselina sírová 96% p.a. (Penta a.s., ing. Švec) ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ )
- uhličitan sodný 10% roztok (w/w)

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

- $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_3 + \text{Et}_2\text{NH}$  (9:1)
- $\text{C}_6\text{H}_{12} + \text{Et}_2\text{NH}$  (9:1)
- LB +  $\text{CHCl}_3$  (1:1, 2:3, 3:7, 3:17)
- LB +  $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_3 + \text{Et}_2\text{NH}$  (40:60:3)

#### 4.1.4 Chromatografické adsorbenty

- Kieselgel SiO<sub>2</sub> 60 F254, fa Merck, 20 × 20 cm, hliníková deska s vrstvou silikagelu pro TLC s hloubkou vrstvy 0,2 mm
- Oxid hlinitý (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) deaktivovaný 6 % H<sub>2</sub>O, velikost zrn 50 – 200 μm (Across)
- Silikagel 60 GF254, Merck

#### 4.1.5 Přístrojové vybavení

- Büchi Melting Point B-540 (Büchi, Flawil, Switzerland)
- NMR Varian Iniova 500 (Varian, USA)
- Plynový chromatograf s hmotnostním detektorem Agilent Technologies 7890 A GC 5975 inert MSD (Agilent Technologies Santa Clara, CA, USA)
- Polarimetr P3000 (A. Krüss Optronic, Germany)
- Vakuová odparka Büchi Rotavapor R-114 (Büchi, Flawil, Switzerland)

#### 4.1.6 Detekční činidla

- Dragendorffovo činidlo dle Muniera – připraveno z roztoku A a B v poměru 1:1.

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

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

- Meyerovo činidlo – připraveno rozpuštěním 1,36 g chloridu rtuťnatého a 5 g jodidu draselného ve 100 ml destilované vody.

#### 4.1.7 Rostlinný materiál

Sušená nať *Papaver rhoeas* L. (Papaveraceae) pochází z pole u Univerzity Hradce Králové, sběr v červnu 2015. Celkově bylo nasbíráno 155 kg čerstvých natí s nezralými tobolkami, jejichž sušením (do 40 °C) se získalo 31,5 kg suché drogy. Verifikace byla provedena prof. RNDr. Lubomírem Opletalem, CSc. a rozdrobnění drogy na kulovém mlýnu provedl PharmDr. Tomáš Siatka, CSc. *P. rhoeas* byl vybrán jako zdroj pro izolaci biologicky aktivních metabolitů na základě screeningu sumárního alkaloidního extraktu, ve kterém se testovala jeho inhibiční aktivita vůči lidským cholinesterasám. Za použití Ellmanovy spektrofotometrické *in vitro* metody

bylo zjištěno, že tento extrakt vykazoval slibnou inhibiční aktivitu vůči BuChE ( $IC_{50} = 3,94 \pm 0,35 \mu\text{g/ml}$ ), zatímco vůči AChE je téměř neaktivní ( $IC_{50} > 1000 \mu\text{g/ml}$ ).

## **4.2 Obecné postupy**

### **4.2.1 Příprava a uchovávání rozpouštědel**

Všechna použitá rozpouštědla byla před použitím přečištěna destilací dle laboratorních zvyklostí. Počátečních 5 % objemu destilovaného rozpouštědla, tzv. předeček, bylo odstraněno a zbylých cca 90 % vydestilováno. Předestilovaná rozpouštědla byla skladována v hnědých láhvích, které zajišťují ochranu před světlem.

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

Za sníženého tlaku při 40 °C byly na vakuové odparce odpařeny rozpouštědla z jednotlivých alkaloidních frakcí a extraktů, které byly získány z chromatografických sloupců a preparativní TLC.

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

Izolované chemicky čisté látky byly vloženy do exsikátoru s obsahem silikagelu, kde se po dobu alespoň 24 hodin nechaly sušit. Takto vysušené látky byly následně uskladněny v chladničce o teplotě 2–8 °C.

### **4.2.4 Chromatografické metody**

#### ***4.2.4.1 Sloupcová chromatografie***

Naplněním kolony adsorbentem (neutrální Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, velikost zrn 50-200 μm, Across, deaktivovaný přídavkem 6 % H<sub>2</sub>O) byl vytvořen základ chromatografického sloupce, na který se navrstvil předem připravený roztěr, tzn. extrakt naadsorbovaný na Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. K separaci alkaloidů byla použita skoková gradientová eluce.

#### ***4.2.4.2 Tenkovrstvá chromatografie***

Za použití metody TLC je možné zjistit přítomnost a čistotu alkaloidů. Na desky se silikagelem se nanese vzorek, vloží se do příslušné komory nasycené parami vhodné mobilní fáze a nechá se vyvíjet. Pod UV lampou (vlnová délka  $\delta = 254$  a 366 nm) lze na chromatogramu následně vidět skvrny. Zbarví-li se tyto skvrny po použití Dragendorffova činidla oranžově, jedná se o alkaloidy.

## 4.3 Strukturní analýza

### 4.3.1 GC-MS analýza

Pro získání GC-MS spekter vzorků byl použit spektrometr Agilent 7890 GC 5975, pracující v EI režimu při 70 eV. Separace proběhla na koloně DP-5 MS (parametry 30 m × 0.25 mm × 0.25 μm, výrobce Agilent Technologies Santa Clara, CA, USA). Byl nastaven teplotní gradient: od 100 °C stoupala teplota rychlostí 15 °C/min do teploty 180 °C, kde byla po dobu 1 min udržována. Dále byla teplota zvyšována o 5 °C/min až na konečných 300 °C a udržována následujících 40 min. V dalším kroku byla nastavena rychlost průtoku nosného plynu (v tomto případě použito helium) na 0,8 ml/min a teplota injektoru (280 °C). Pro detekci bylo zvoleno detekční rozmezí m/z 35-600 a teplota detektoru (200 °C). Alkaloidní roztok o objemu 1 μl a koncentrace 1 mg/ml byl na kolonu nastříknut v poměru 1:10 ve „split mode“. Výstupem této analýzy byla MS spektra, která po porovnání se spektry referenčními umožnila identifikaci jednotlivých alkaloidů. Referenční spektra pocházela z NIST knihovny, literatury a materiálů Katedry farmaceutické botaniky a ekologie FaF UK (spektra látek již v minulosti izolovaných).

### 4.3.2 NMR analýza

NMR spektra byla měřena na přístroji Varian Iniova 500. Pro <sup>1</sup>H jádra byla pracovní frekvence 499,9 MHz a pro <sup>13</sup>C jádra 125,7 MHz. <sup>1</sup>H NMR spektra byla měřena v inverzní 5 mm ID PGF sondě s využitím standartních pulzních frekvencí, zatímco <sup>13</sup>C NMR spektra byla měřena v 5 mm SW širokopásmové sondě. Měření proběhlo za teploty 25 °C v prostředí deuteriochloroformu.

### 4.3.3 Teplota tání

Pro zjištění teploty tání byl použit bodotávek Büchi Melting Point B-450. Do teploty o 10 °C nižší, než byla předpokládaná teplota tání dané látky, stoupala teplota ve výhřevném bloku rychlostí 15 °C/min. Poté již rostla pomaleji (0,5 °C/min), až do dosažení teploty o 10 °C vyšší, než byla předpokládaná teplota tání dané látky.

### 4.3.4 Optická otáčivost

Optická otáčivost byla měřena na polarimetru P3000, A. Krüss Optronic, Germany, v roztoku chloroformu a pyridinu za teploty 25 °C.



## 4.4 Izolace alkaloidů

### 4.4.1 Příprava alkaloidního extraktu

Pro přípravu sumárního alkaloidního extraktu bylo použito 31,5 kg sušené rozdrobněné drogy *Papaver rhoeas* L. Droga byla postupně po 350 g extrahována vroucím 96% EtOH, dvakrát 3 litry po 30 minutách. Jednotlivé ethanolové extrakty byly spojeny, přefiltrovány přes vliselin a odpařeny na vakuové poloprovozní odparce na objem přibližně 3 litry, přičemž teplota nepřekročila 50 °C. K tomuto objemu byly přidány 3 litry vody a zbývající EtOH se nechal úplně odpařit. Vzniklá suspenze se nechala ohřát na 70 °C a přidal se 1 litr 2% HCl (pH ~ 1,5). Po zchladnutí na cca 30 °C byla vzniklá suspenze naředěna 3 litry vody a přefiltrována přes vliselin. Následně byl filtr promyt 1,5 litrem 0,1% HCl, 2 litry vody a získaný extrakt doplněn vodou na 15 litrů.

Tento filtrát byl zalkalizován 2,2 litry 10% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> na pH 9-10 a postupně 5× vytřepán 4 litry CHCl<sub>3</sub>. Spojením organických vrstev a společným odpařením bylo získáno celkem 45,0 g tmavě hnědého viskózního alkaloidního extraktu.

Alkaloidní koncentrát byl rozpuštěn ve 400 ml 2% HCl, objem doplněn vodou na 1 litr a vznikla suspenze, která byla filtrována přes vrstvu čištěné křemeliny. Získaný filtrát byl alkalizován 10% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> na pH 9-10 a 5× vytřepán 300 ml CHCl<sub>3</sub>. Provedená zkouška s Meyerovým činidlem byla negativní, čímž se prokázalo, že vodná fáze již žádné alkaloidy neobsahuje a s vytřepáváním se dále nepokračovalo. Celý proces přečištění extraktu vytřepáváním byl proveden ještě 1×.

Celkově bylo po odpaření rozpouštědla získáno 17,9 g tmavě fialového až černého sumárního alkaloidního extraktu.

### 4.4.2 Sloupcová chromatografie alkaloidního extraktu

Sumární alkaloidní extrakt o celkové hmotnosti 17,9 g byl rozpuštěn v CHCl<sub>3</sub> a smíchán se 72 g neutrálního oxidu hlinitého (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, velikost zrn 50 – 200 μm, Across, deaktivovaný 6 % H<sub>2</sub>O). Takto vznikl roztěr, ze kterého byl za stálého míchání na vodní lázni odstraněn CHCl<sub>3</sub> do sucha. Následně byl roztěr umístěn do exsíkátoru, kde byl ponechán za sníženého tlaku po dobu 24 hodin na dosušení.

Jako stacionární fáze byl použit neutrální oxid hlinitý ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ , velikost zrn 50 – 200  $\mu\text{m}$ , Across, deaktivovaný 6%  $\text{H}_2\text{O}$ ), v množství 1140 g, jímž byla kolona o průměru 4,7 cm naplněna do výšky 61 cm. Na tento adsorbent byl navrstven vysušený roztěr a výsledná výška chromatografického sloupce byla 66 cm.

Separace alkaloidů probíhala stupňovitou elucí, tzn. postupným zvyšováním polaritý mobilní fáze. Nejprve byl použit LB +  $\text{CHCl}_3$  (v poměru 1:1, 2:3, 3:7, 3:17), dále  $\text{CHCl}_3$  (100%),  $\text{CHCl}_3$  + EtOH (1:1) a nakonec 95% EtOH. Mrtvý objem představoval 810 ml. Rychlost toku mobilní fáze byla 12,5 ml/min. Jednotlivé frakce byly jímány po 250 ml a tímto způsobem bylo získáno 98 frakcí. Každá byla monitorována pomocí TLC, shodné fáze sloučeny k sobě a výsledkem bylo 5 spojených frakcí. Pro dílčí kontrolní TLC ( $\text{SiO}_2$ , 60 F 254 Merck) byly použity následující soustavy:  $\text{C}_6\text{H}_{12}$  +  $\text{Et}_2\text{NH}$  (9:1) a  $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_3$  +  $\text{Et}_2\text{NH}$  (9:1).

Tab. 3 Přehled parametrů použité kolony

<b>Adsorbent</b>	neutrální $\text{Al}_2\text{O}_3$ (1140 g; 50 – 200 $\mu\text{m}$ , Across) deaktivovaný přidavkem 6 % vody
<b>Vrstva s roztěrem</b>	66 cm
<b>Vrstva bez roztěru</b>	61 cm
<b>Průměr kolony</b>	4,7 cm
<b>Mrtvý objem</b>	810 ml
<b>Objem jedné frakce</b>	250 ml
<b>Rychlost průtoku</b>	12,5 ml/min

Tab. 4 Spojené frakce sumárního alkaloidního výtřepku

<b>Frakce</b>	<b>Rozmezí frakce</b>	<b>Mobilní fáze</b>	<b>Hmotnost odparku [g]</b>
<b>1</b>	20-27	LB+ $\text{CHCl}_3$ (1:1, 2:3)	0,44
<b>2</b>	28-34	LB+ $\text{CHCl}_3$ (2:3)	0,94
<b>3</b>	35-74	LB+ $\text{CHCl}_3$ (2:3, 3:7)	9,69
<b>4</b>	75-97	$\text{CHCl}_3$ , $\text{CHCl}_3$ + EtOH (1:1)	2,68
<b>5</b>	98	EtOH	1,99

Jednotlivé spojené alkaloidní frakce byly naneseny na souhrnné TLC (adsorbent SiO<sub>2</sub> 60 F 254 Merck). Vyvíjení proběhlo 2× po sobě ve skleněné komoře nasycené parami mobilní fáze C<sub>6</sub>H<sub>12</sub> + Et<sub>2</sub>NH (9:1). Výsledná dráha TLC měřila 8,5 cm. Detekce pod UV lampou a zviditelnění skvrn Dragendorffovým činidlem prokázalo přítomnost jednotlivých alkaloidů (Obr. 7).



Obr. 7 Souhrnné TLC spojených frakcí sumárního alkaloidního výtřepku

#### 4.4.3 Separace alkaloidů z frakce 75 – 97 (2,68 g)

Byla provedena preparativní TLC na 54 nalévaných deskách o rozměrech 15 × 15 cm (adsorbent SiO<sub>2</sub> 60 GF 254), délka dráhy 12,5 cm. Desky byly vyvíjeny celkem 4× v komoře nasycené parami soustavy LB + C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>CH<sub>3</sub> + Et<sub>2</sub>NH (40:60:3) a došlo k rozdělení frakce do 6 zón (Tab. 5).

Před dalším zpracováním byly jednotlivé zóny přečištěny. Po rozpuštění v 2% HCl byly kyselé roztoky vytřepány Et<sub>2</sub>O, čímž se odstranily nealkaloidní balastní látky. Po následné alkalizaci vodné fáze 10% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> na pH 9–10 byly alkaloidy vytřepány opět Et<sub>2</sub>O a vodná vrstva byla odstraněna odpařením do sucha. Výtěžky jsou uvedeny v následující tabulce.

Tab. 5 Výsledky preparativní TLC frakce 75 – 97

Vrstva	Retenční faktor	Hmotnost [mg] <i>po separaci</i>	Hmotnost [mg] <i>po přečištění</i>
1	0,44	833	230
2	0,35	636	320
3	0,27	72	57
4	0,23	98	18
5	0,19	123	18
6	0,06	75	16

#### 4.4.3.1 Izolace alkaloidů z frakce 75 – 97, podfrakce 1 (230 mg)

Podfrakce č.1 z frakce 75 – 97 obsahovala bílou, drobně krystalickou sloučeninu (Mr 369; EI-MS). Na základně NMR analýzy bylo zjištěno, že se jedná o směs izomerů isorhoeageninu a rhoeageninu v poměru 1:1,5. Protože ve zředěné HCl izomerizují *trans*-báze do termodynamicky stálejší *cis*-báze<sup>70</sup>, tzn. izomerizací isorhoeageninu vzniká rhoeagenin<sup>71</sup>, byla tato směs izomerů (97 mg) rozpuštěna ve 30 ml 2% HCl, 10 minut inkubována ve vroucí vodní lázni a následně alkalizována 25% NH<sub>3</sub> na pH 9 – 10. Vytřepáním do Et<sub>2</sub>O a krystalizací z tohoto roztoku byla získána jemná, bílá, krystalická sloučenina LB-1 o výsledné hmotnosti 59 mg.

#### 4.4.3.2 Izolace alkaloidů z frakce 75 – 97, podfrakce 2 (320 mg)

Krystalizací podfrakce č.2 z frakce 75 – 97 z CHCl<sub>3</sub> + EtOH (1:1) bylo získáno 160 mg bílé, krystalické sloučeniny LB-2.

## 4.5 Příprava chloridů alkaloidů

Protože izolované alkaloidy jsou velmi lipofilní (špatně se rozpouští i v  $\text{CHCl}_3$ , zejména (+)-rhoeagenin), byly tyto alkaloidy na biologické testy i NMR analýzu ((+)-rhoeagenin) převedeny na chloridy.

### 4.5.1 Příprava chlorovodíku v bezvodém diethyletheru

Roztok suchého  $\text{HCl}$  v  $\text{Et}_2\text{O}$  o přibližné koncentraci 1 M byl připraven v příslušné aparatuře: do vyvíjecí baňky se vsypalo 3,1 g  $\text{NaCl}$  a do promývacího a připouštěcího tubusu se vliło 20 ml 96%  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Náplň plynového filtru byla tvořena promytou (nebazickou) skelnou vatou; do absorbéru (promývačky), která byla umístěna za filtrem, se vliło 50 ml předem vysušeného  $\text{Et}_2\text{O}$ , který se připravil sušením s pevným  $\text{NaOH}$  a následnou destilací na parafinové lázni. Po sestavení aparatury se velmi pomalu přikapávala 96%  $\text{H}_2\text{SO}_4$  na  $\text{NaCl}$ , aby vývoj  $\text{HCl}$  nebyl překotný, a aby se stačil všechn plyn, vysušený 96%  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , absorbovat v  $\text{Et}_2\text{O}$ .  $\text{H}_2\text{SO}_4$  byla přikápnuta do reakční směsi v mírném nadbytku. Po ukončení reakce byl diethyletherový roztok chlorovodíku vylit z promývačky do uzavřené baňky, z níž se dávkoval pro přípravu chloridů.

### 4.5.2 Příprava rozpustných chloridů

Izolované alkaloidy (20 mg) se rozpustily v 250  $\mu\text{l}$   $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (alkaloidy se velice špatně rozpouštěly v  $\text{Et}_2\text{O}$ ) a k tomuto roztoku byl do cca 5 ml přidán nejprve bezvodý  $\text{Et}_2\text{O}$  a následně bezvodý  $\text{HCl}$  v mírném nadbytku (200  $\mu\text{l}$  1M  $\text{HCl}$  v  $\text{Et}_2\text{O}$ ). Vzniklá sraženina chloridu se krátce sonikovala v ultrazvuková lázni a ponechala se cca 1 hodinu v klidu sedimentovat. Přebytný (nezreagovaný)  $\text{HCl}$  byl odstraněn opatrným odfukováním suspenze při mírném zahřívání na parafinové lázni cca 40 °C po dobu 15 min.

## 4.6 Stanovení biologické aktivity alkaloidů a alkaloidního extraktu

### 4.6.1 Chemikálie, pufrý a materiál

Chemikálie:

- acetylthiocholin jodid (Sigma-Aldrich), použit 10mM roztok
- butyrylthiocholin jodid (Sigma-Aldrich), použit 10mM roztok
- dimethylsulfoxid p.a. (Sigma-Aldrich)
- galanthamin hydrobromid (Changsha Organic Haerb Inc., China)
- huperzin A (TAZHONGHUI – Tai'an zhonghui Plant Biochemical Co., Ltd., China)
- prolyloligopeptidasa (Sigma-Aldrich)
- Z-gly-pro-*p*-nitroanilid (Sigma-Aldrich)
- 1,4-dioxan (Lachema)
- 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina  $\geq 98\%$  (Sigma-Aldrich), použit 5mM roztok

Pufrý:

- 5mM fosfátový pufr pH 7,4; složení: dihydrát dihydrogenfosforečnanu sodného, p.a. (Lachema); dodekahydrát hydrogenfosfrečnanu disodného, p.a. (Lachema)
- 5mM fosfátový pufr pH 7,4 obsahující 150 mM NaCl
- 10 mM fosfátový pufr pH 7,4 obsahující 137 mM NaCl a 2,7 mM KCl
- 100mM fosfátový pufr pH 7,4; složení: dihydrát dihydrogenfosforečnanu sodného, p.a. (Lachema); dodekahydrát hydrogenfosfrečnanu disodného, p.a. (Lachema)

Materiál:

- hemolyzát lidských erytrocytů (zdroj acetylcholinesterasy)
- lidská plazma (zdroj butyrylcholinesterasa)

### 4.6.2 Přístrojové vybavení

- ELISA reader (Multi-mode microplate reader Synergy 2 - Vermont, USA)
- Reader Synergy™ HT Multi-Detection Microplate Reader (BioTek, USA)

### 4.6.3 Podmínky měření

- teplota 37 °C
- prostředí fosfátového pufru (pH 7,4)
- vlnová délka spektrofotometru 436 nm (AChE), 412 nm (BuChE), 405 nm (POP)
- mikrotitrační destičky

### 4.6.4 Postup získání erythrocytárních cholinesteras

Erythrocyty byly získány z čerstvě odebrané citrátované krve zdravých dobrovolníků. Bezprostředně po odběru se krev rozdělila stejnoměrně po 5 ml do šroubovacích zkumavek a provedla se centrifugace (rychlost 4000 rpm, teplota 4 °C, doba 10 min). Následně se plazma odsála tak, aby v ní nebyly erythrocyty. Zbytek plazmy se opatrně odsál bezpopelovým filtračním papírem s hlazeným povrchem a sestřiženou špičkou. Objem erythrocytární masy se odečetl a byl zředěn takovým množstvím 5 mM fosfátového pufru pH 7,4 obsahujícím 150 mM NaCl. Tato suspenze byla rozdělena do zkumavek o objemu 13 ml, dobře se promíchala a opět se provedla centrifugace. Tímto způsobem se promytí provedlo celkem 3× a promývací kapalina byla dokonale odstraněna. Následně bylo přidáno takové množství 5 mM fosfátového pufru pH 7,4 bez obsahu chloridu sodného, aby byl objemový poměr erythrocytů k pufru 1:9. Po homogenizaci se tato směs přelila do Erlenmayerovy baňky, kde byly erythrocyty za míchání teflonovým míchadlem při 300 rpm ponechány spontánně hemolyzovat. Bezprostředně po skončení této hemolýzy se stanovila aktivita suspenze a hemolýzát byl uchováván při – 2 °C do doby použití.

### 4.6.5 Stanovení inhibice cholinesteras

Hodnota  $IC_{50}$  byla stanovena Ellmanovou spektrofotometrickou metodou za použití kyseliny 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoové (DTNB)<sup>72</sup>. Substrátem byly estery thiocholinu, ze kterých štěpením cholinesterasami vzniká thiocholin a příslušné kyseliny. Reakcí thiolové skupiny thiocholinu s DTNB vzniká žlutě zbarvený produkt, který je stanoven spektrofotometricky při vlnové délce 436 nm (AChE) nebo 412 nm (BuChE). Po 1 minutě se zaznamenala naměřená absorbance.

V programu GraphPaD Prism (verze 6.07 pro Windows; výrobce Graph PaD Software, San Diego, CA, USA) byly nelineární regresí vypočítány hodnoty  $IC_{50}$

z naměřených hodnot poklesu aktivity AChE nebo BuChE. Tyto výsledky se porovnály s hodnotami IC<sub>50</sub> známých inhibitorů cholinesteras.

Pro výpočet procenta inhibice (% I) slouží následující vzorec:

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

$\Delta A_{BL}$  .....nárůst absorbance slepého vzorku za 1 minutu

$\Delta A_{SA}$  .....nárůst absorbance měřeného vzorku.

Pro přípravu slepého vzorku bylo do jamek mikrotitračních destiček nepipetováno 8,3  $\mu$ l plazmy či hemolyzátu a přidalo se 283  $\mu$ l 5 mM DTNB a 8,3  $\mu$ l dimethylsulfoxidu (DMSO). Obsah jamek byl 2 minuty promícháván a potom byl vložen do komory readeru, kde byl při teplotě 37 °C po dobu 5 minut ponechán inkubaci. Následně bylo přidáno 33,3  $\mu$ l roztoku substrátu (acetylthiocholinjodidu nebo butyrylthiocholinjodidu) a při příslušné vlnové délce byla změřena absorbance.

Vzorky zkoušených látek byly připravené stejným postupem jako slepý vzorek, jen místo samotného DMSO se přidávaly roztoky měřených látek o koncentracích 40,0; 10,0; 4,0; 1,0; 0,4 mM v DMSO. Roztok extraktu byl měřen v koncentracích 20,0; 10,0; 2,0; 1,0; a 0,2  $\mu$ g/ml.

#### **4.6.6 Stanovení inhibice prolyloligopeptidasy**

POP byla rozpuštěna v 10 mM fosfátovém pufru pH 7,4 obsahujícím 137 mM NaCl a 2,7 mM KCl; její biologická aktivita byla 0,2 U/ml. Metoda byla provedena na standardních 96-jamkových polystyrénových mikrodestičkách.

Zkoušené látky byly rozpuštěny v 10 mM DMSO a zředěny příslušným množstvím deionizované vody do koncentrace 10<sup>-3</sup> – 10<sup>-7</sup> M. Kontrolní roztok obsahoval stejné množství DMSO. Substrát POP, Z-gly-pro-*p*-nitroanilid, byl rozpuštěn v 50% 1,4-dioxanu. Napipetováním 170  $\mu$ l fosfátového pufru, 5  $\mu$ l zkoušené látky o různé koncentraci a 5  $\mu$ l roztoku POP do jamek mikrotitračních destiček byly připraveny jednotlivé zkušební roztoky. Tyto roztoky se nechaly inkubovat 5 min při teplotě 37 °C, následně bylo přidáno 20  $\mu$ l substrátu a inkubace probíhala při stejné teplotě dalších 30 min. Úměrně aktivitě POP vznikl reakcí se substrátem *p*-nitroanilid. Pomocí přístroje ELISA reader (Multi-mode microplate reader Synergy 2 - Vermont, USA) bylo jeho množství změřeno spektrofotometricky při vlnové délce 405 nm.

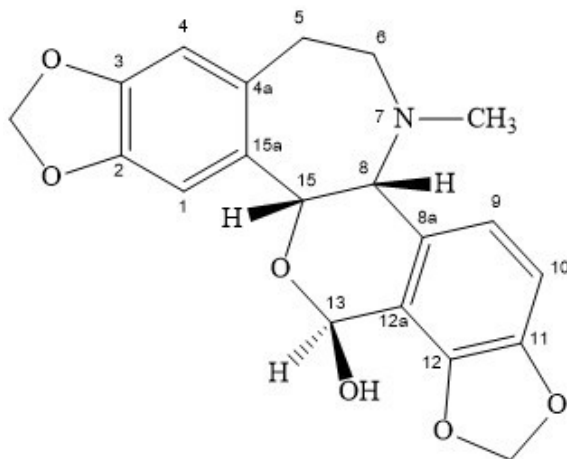


Inhibiční aktivita látek se vyjadřuje, obdobně jako u cholinesteras, jako hodnota  $IC_{50}$ , tzn. koncentrace dané látky, která vyvolá pokles aktivity enzymu o 50%.

## 5 Výsledky

### 5.1 Strukturní analýza

#### 5.1.1 (+)-rhoeagenin (LB-1)

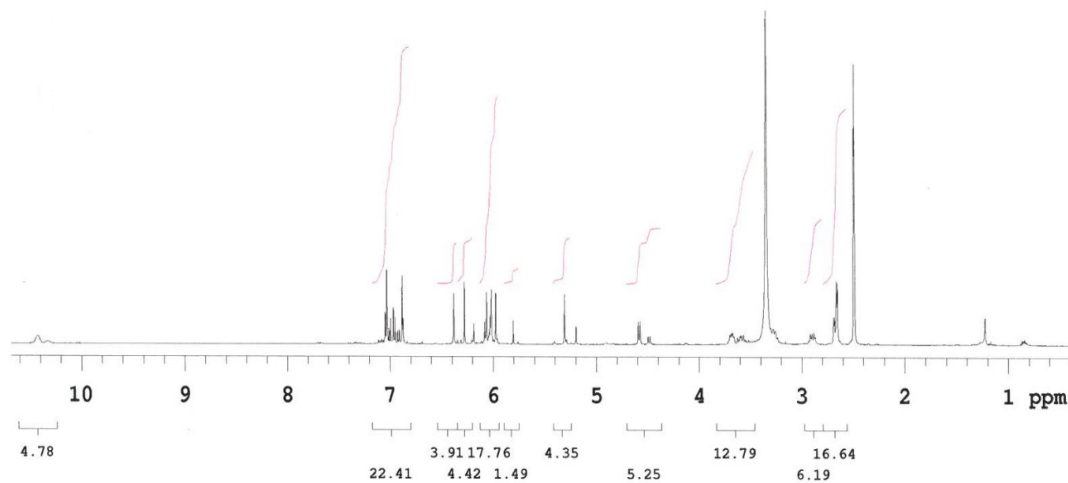


Obr. 8 (+)-rhoeagenin

##### 5.1.1.1 NMR analýza

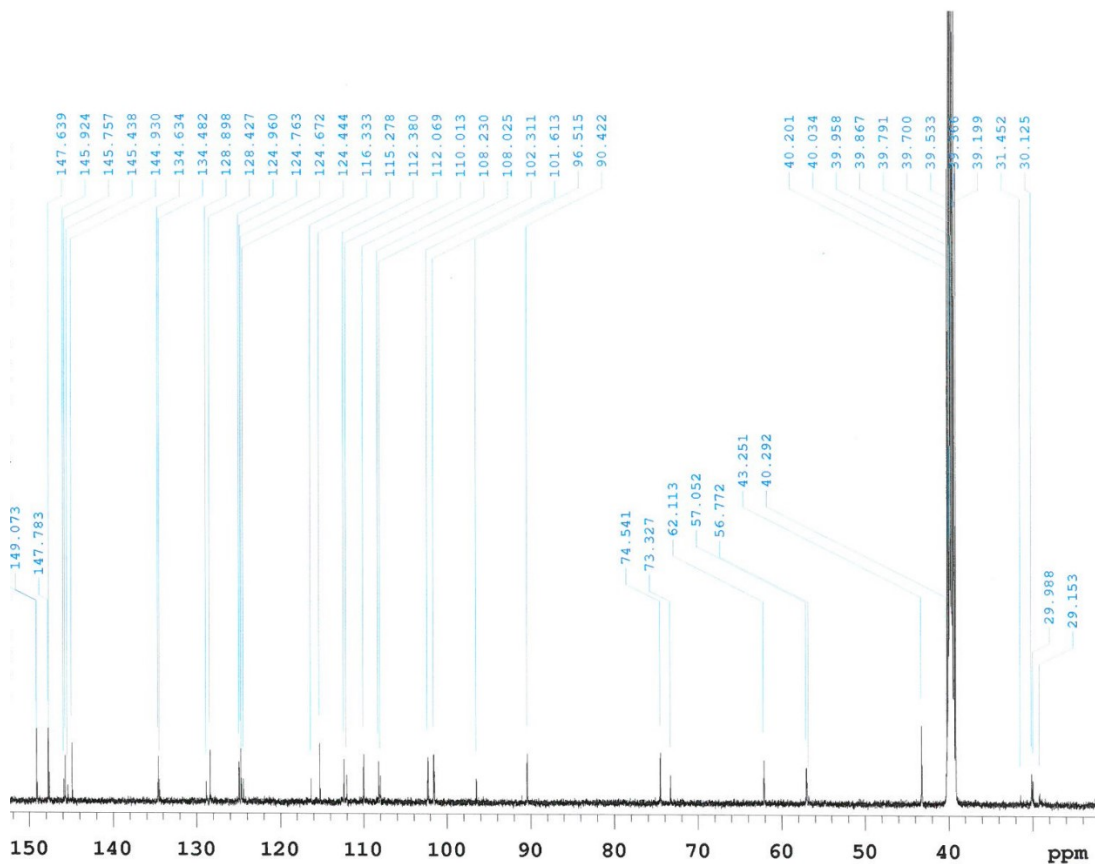
NMR analýza probíhala po převedení alkaloidu na (+)-rhoeagenin.HCl.

$^1\text{H}$  NMR (500MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 7.06 (1H, s H1), 7.02 (1H, d,  $J=7.8$  Hz, H9), 6.98 (1H, d,  $J=7.8$  Hz, H10), 6.80 (1H, s, H4), 6.46 (1H, s, H13), 6.28 (1H, d,  $J=1.0$  Hz,  $\text{OCH}_2\text{O}$ ), 6.07 (1H, d,  $J=1.0$  Hz,  $\text{OCH}_2\text{O}$ ), 6.01 (2H, d,  $J=1.5$  Hz,  $\text{OCH}_2\text{O}$ ), 5.53 (1H, s, H15), 4.51 (1H, s, H8), 3.81 (1H, dd,  $J=12.7$  Hz,  $J=6.9$  Hz, H6), 3.68-3.57 (1H, m, H5), 3.43 (1H, t,  $J=12.7$  Hz, H6), 2.99 (1H, dd,  $J=16.6$  Hz,  $J=6.9$  Hz, H5), 2.83 (3H, s,  $\text{NCH}_3$ ).



*Obr. 9  $^1\text{H}$  NMR spektrum (+)-rhoeageninu.HCl*

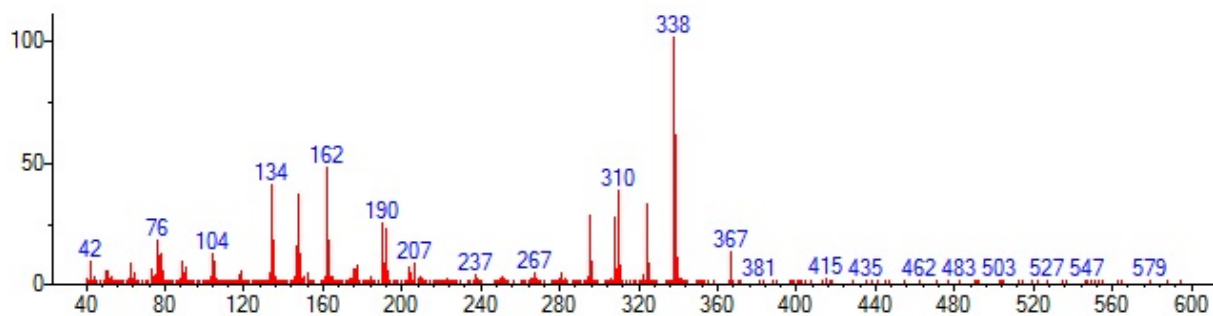
$^{13}\text{C}$  NMR (125MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 151.6 (C11), 149.9 (C3), 147.8 (C2), 147.1 (C12), 135.3 (C4a), 129.5 (C15a), 126.4 (C9), 125.3 (C8a), 116.2 (C12a), 113.6 (C1), 111.0 (C4), 109.5 (C10), 104.0 ( $\text{OCH}_2\text{O}$ ), 103.1 ( $\text{OCH}_2\text{O}$ ), 92.1 (C13), 76.3 (C15), 65.1 (C8), 59.2 (C6), 44.4 ( $\text{NCH}_3$ ), 31.9 (C5).



Obr. 10  $^{13}\text{C}$  NMR spektrum (+)-rhoeageninu.HCl

### 5.1.1.2 MS analýza

EI-MS (m/z) 369(<1), 367 (13), 339 (60), 338 (100), 324 (32), 310 (38), 308 (27), 190 (24), 162 (47), 148 (36), 134 (40).



Obr. 11 EI spektrum (+)-rhoegeninu

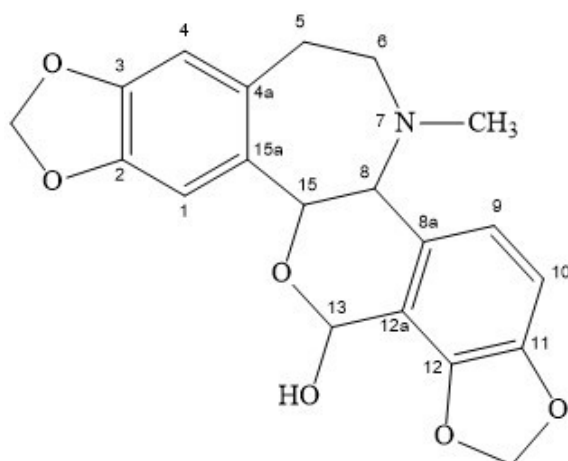
### 5.1.1.3 Optická otáčivost

$[\alpha]_D^{25} = +130^\circ$  (c = 0,50; C<sub>5</sub>H<sub>5</sub>N)

### 5.1.1.4 Teplota tání

236 – 237 °C.

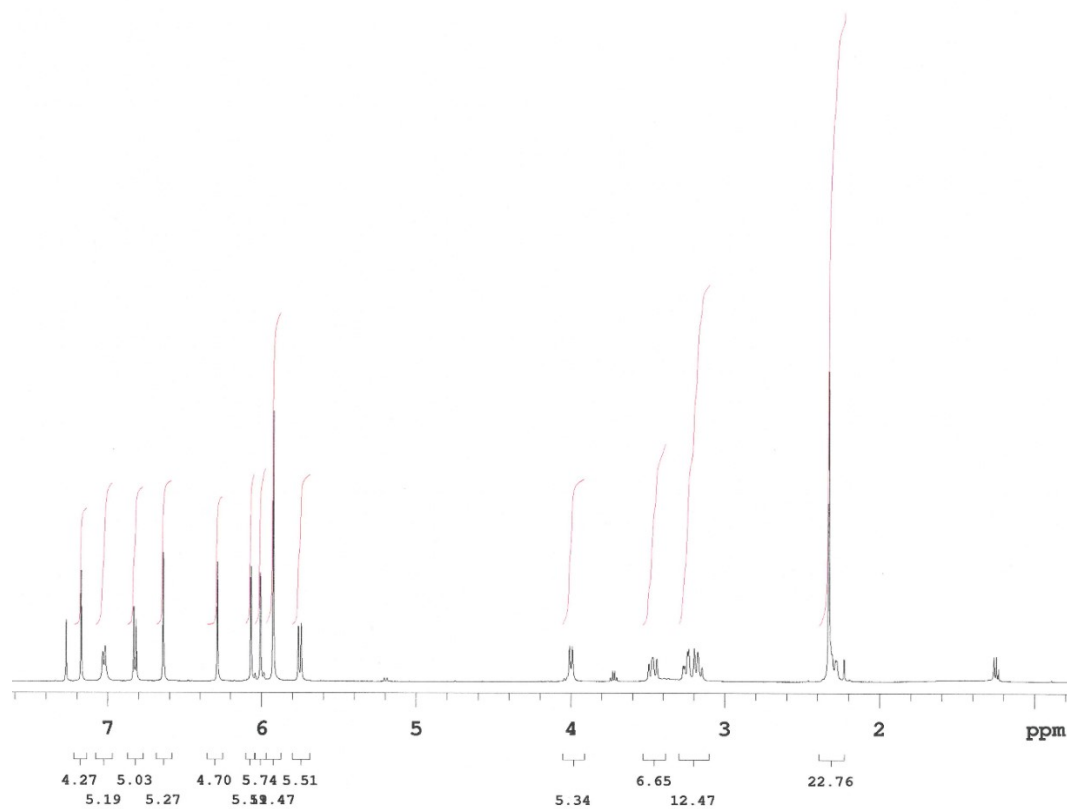
## 5.1.2 LB-2



Obr. 12 LB-2

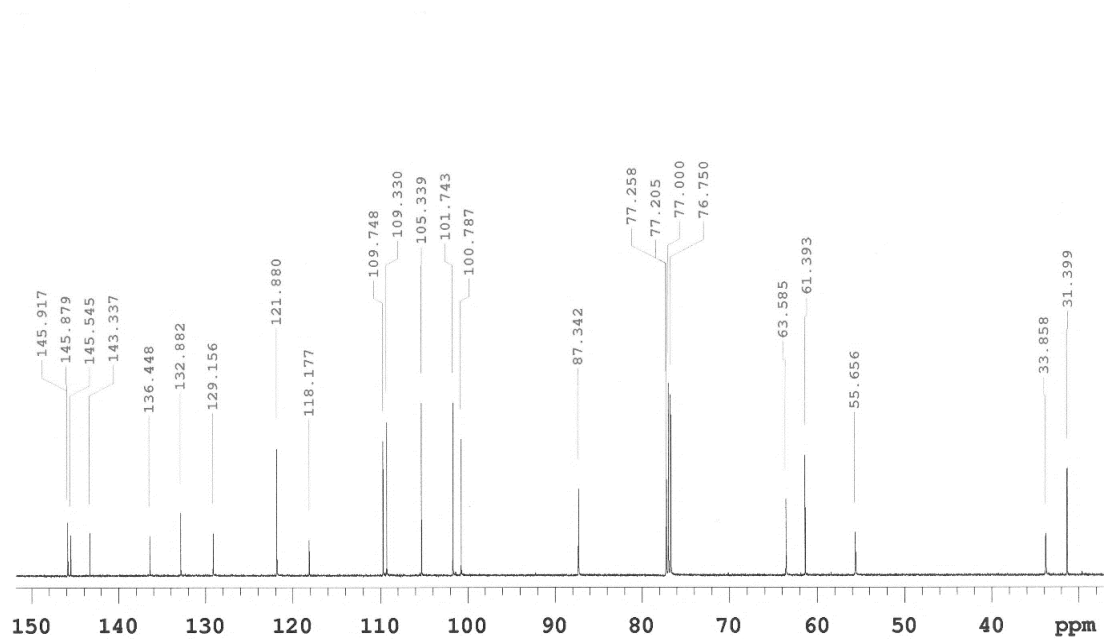
### 5.1.2.1 NMR analýza

<sup>1</sup>H NMR (500MHz, DMSO)  $\delta$ : 6.87 (1H, d,  $J=7.8$  Hz, H10), 6.86 (1H, s, H1), 6.79 (1H, d,  $J=7.8$  Hz, H9), 6.78 (1H, s, H4), 6.12 (1H, d,  $J=1.0$  Hz, OCH<sub>2</sub>O), 6.03 (1H, d,  $J=1.0$  Hz, OCH<sub>2</sub>O), 5.98-5.95 (2H, m, OCH<sub>2</sub>O), 5.91 (1H, d,  $J=11.3$  HZ, H13), 4.53 (1H, s, H15), 3.28-3.18 (2H, m, H6, H8), 3.56 (1H, dd,  $J=15.2$  Hz,  $J=10.8$  Hz, H5), 2.65 (1H, dd,  $J=15.2$  Hz,  $J=7.3$  Hz, H5), 2.36 (1H, t,  $J=11.7$  Hz, H6), 2.12 (3H, s, NCH<sub>3</sub>).



*Obr. 13  $^1\text{H}$  NMR spektrum LB-2*

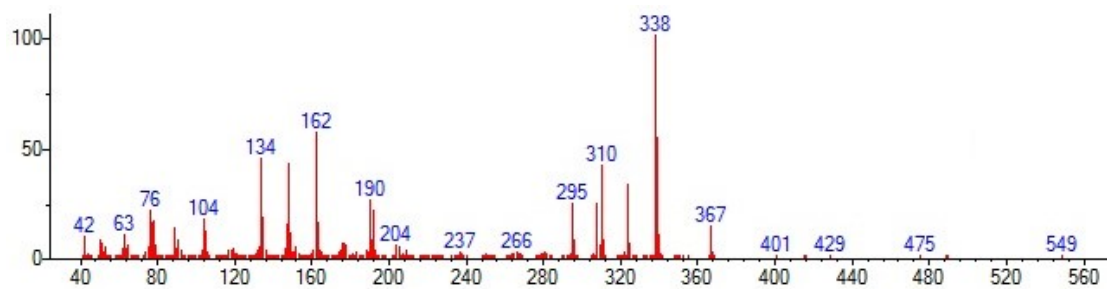
$^{13}\text{C}$  NMR (125MHz, DMSO)  $\delta$ : 147.4 (C11), 147.1 (C3), 145.2 (C2), 143.1 (C12), 136.8 (C4a), 132.6 (C8a), 130.6 (C15a), 120.9 (C9), 118.6 (C12a), 111.9 (C1), 109.9 (C4), 107.2 (C10), 101.8 (OCH<sub>2</sub>O), 101.1 (OCH<sub>2</sub>O), 88.5 (C13), 82.7 (C15), 65.1 (C8), 57.3 (C6), 44.2 (NCH<sub>3</sub>), 33.0 (C5).



Obr. 14  $^{13}\text{C}$  NMR spektrum LB-2

### 5.1.2.2 MS analýza

EI-MS (m/z) 369(<1), 367 (14), 339 (54), 338 (100), 324 (33), 310 (42), 308 (24), 295 (24), 190 (26), 162 (56), 148 (42), 134 (44).



Obr. 15 EI spektrum LB-2

### 5.1.2.3 Optická otáčivost

$[\alpha]_D^{25} = + 273^\circ$  (c = 0,68;  $\text{CHCl}_3$ )

### 5.1.2.4 Teplota tání

213 – 215 °C.



## 5.2 Biologická aktivita izolovaných alkaloidů

U izolovaných alkaloidů (+)-rhoeageninu a LB-2 byla změřena jejich inhibiční aktivita vůči enzymům AChE, BChE a POP. V následující tabulce jsou tyto hodnoty uvedeny společně s hodnotami referenčních látek, které jsou vyznačeny kurzívou

Tab. 6 Přehled hodnot  $IC_{50}$  izolovaných alkaloidů a referenčních látek

Testovaná látka:	$IC_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )		
	AChE	BChE	POP
(+)-rhoeagenin	>1000	$230 \pm 10$	$878 \pm 45$
LB-2	>1000	$314 \pm 13$	$706 \pm 23$
<i>galanthamin</i> *	$1,71 \pm 0,065$	$42,30 \pm 1,30$	>1000
<i>huperzin A</i> *	$0,033 \pm 0,001$	>1000	>1000
<i>rivastigmin</i> *	$0,037 \pm 0,001$	$0,0033 \pm 0,0003$	n.d.
<i>berberin</i> *	-	-	$142 \pm 21$
<i>Z-pro-prolinal</i> *	-	-	$3,27 \pm 0,02 \times 10^{-3}$

\*standardy

## 6 Diskuze

Sumární alkaloidní extrakt natě *Papaver rhoeas* L. byl podroben primárnímu screeningu biologické aktivity. Za použití Ellmanovy spektrofotometrické *in vitro* metody bylo zjištěno, že tento extrakt vykazuje slibnou inhibiční aktivitu vůči BuChE ( $IC_{50} = 3,94 \pm 0,35 \mu\text{g/ml}$ ), zatímco vůči AChE je téměř neaktivní ( $IC_{50} > 1000 \mu\text{g/ml}$ ).

Cílem této diplomové práce bylo izolovat z frakce 75 – 97, získané pomocí sloupcové chromatografie sumárního extraktu, alkaloidy v čisté formě a v jejím rámci dále určit jejich strukturu a biologickou aktivitu.

Preparativní TLC, zahříváním směsi krystalů isomerů (LB-1 a LB-2) na horké vodní lázni za přítomnosti zředěné HCl a následnou krystalizací byly izolovány dva alkaloidy. NMR a GC-MS analýza poskytly data, která umožnila jejich identifikaci na základně s odbornou literaturou. Prvním izolovaným alkaloidem byl (+)-rhoeagenin (LB-1) a druhým LB-2, jehož struktura nebyla dosud přesně určena – jeho absolutní konfigurace je v současnosti řešena ve spolupráci s prof. Ing. Alešem Růžičkou, Ph.D. (Univerzita Pardubice). Dále byla zjištěna také příslušná optická otáčivost a teplota tání.

Ellmanovou spektrofotometrickou metodou byly následně určeny cholinesterasové inhibiční aktivity  $IC_{50}$  ( $\mu\text{M}$ ) získaných alkaloidů. (+)-Rhoeagenin a LB-2 vykazovaly pouze mírnou butyrylcholinesterasovou inhibiční aktivitu ( $IC_{50} = 230 \pm 10 \mu\text{M}$  a  $314 \pm 13 \mu\text{M}$ ) v porovnání se standardy, které se v terapii AD používají. Těmito standardy jsou alkaloidy galanthamin ( $IC_{50} = 42,30 \pm 1,30 \mu\text{M}$ ) a rivastigmin ( $IC_{50} = 0,0033 \pm 0,0003 \mu\text{M}$ ). Vůči AChE se (+)-rhoeagenin i LB-2 projevil jako neaktivní ( $IC_{50} > 1000 \mu\text{M}$ ).

Izolované alkaloidy vykazovaly i mírnou inhibici POP, (+)-rhoeagenin ( $IC_{50} = 878 \pm 45 \mu\text{M}$ ) a LB-2 ( $IC_{50} = 706 \pm 23 \mu\text{M}$ ), ve srovnání se standardem alkaloidu berberinu ( $142 \pm 21 \mu\text{M}$ ) a dipeptidické látky Z-pro-prolinalu ( $3,27 \pm 0,02 \text{ nM}$ ).

Ačkoliv *Papaver rhoeas* L. dosud nebyl zkoumán za účelem nalezení inhibitorů cholinesteras, dříve byly v této rostlině nalezeny alkaloidy, které tuto vlastnost mají, např. berberin<sup>52</sup>, protopin<sup>65</sup>, ( $\pm$ )-stylopin a (+)-magnoflorin<sup>73</sup>. Navíc

bylo zjištěno, že i flavonoid luteolin, který se v rostlině běžně nachází, cholinesterasy také inhibuje ( $IC_{50}$  AChE = 65,8  $\mu$ M).<sup>74,75</sup> U extraktů jiných druhů rodu *Papaver* (např. u *Papaver somniferum* L.<sup>76</sup>) byla cholinesterasová inhibiční aktivita prokázána.

Přestože získané alkaloidy (+)-rheagenin a LB-2 inhibují POP jen mírně, některé jiné isochinolinové alkaloidy (zejména kalifornidin a dihydrosanguinarin) vykazují propyloligopeptidasovou inhibiční aktivitu mnohem vyšší<sup>77</sup>.

Výsledkem diplomové práce je, že izolované alkaloidy rhoeadinového typu (+)-rheagenin a LB-2 mají mnohem nižší inhibiční vlastnosti vůči cholinestrásám a POP než standardní látky. S jistotou lze také říci, že ani jeden z izolovaných alkaloidů (+)-rheagenin a LB-2 není zodpovědný za butyrylcholinesterasovou inhibiční aktivitu sumárního alkaloidního extraktu natě *Papaver rhoeas* L ( $IC_{50}$  = 3,94  $\pm$  0,35  $\mu$ g/ml).

## 7 Závěr

Z alkaloidního extraktu *Papaver rhoeas* L. byly izolovány alkaloidy rhoeadinového strukturního typu LB-2 a (+)-rhoeagenin, které byly testovány na cholinesterasovou a prolyloligopeptidasovou inhibiční aktivitu. Tyto alkaloidy vykazovaly jen mírnou inhibici na tyto vybrané enzymy, a tudíž se jeví jako potenciálně neperspektivní pro další výzkum a využití v terapii AD jako inhibitory cholinesteras a prolyloligopeptidasy.

## 8 Abstrakt

Bulvová, L.: Alkaloidy *Papaver rhoeas* L. (Papaveraceae) a jejich biologická aktivita vztažená k Alzheimerově chorobě I. Diplomová práce, Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra farmaceutické botaniky a ekologie, Hradec Králové 2017.

Cílem této diplomové práce bylo zpracovat sumární alkaloidní extrakt natě *Papaver rhoeas* L.; pomocí chromatografických metod izolovat přítomné alkaloidy; identifikovat je a stanovit jejich inhibiční aktivitu vůči lidským enzymům acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase a prolyloligopeptidase. Celkem byly získány dva alkaloidy, z nichž první byl identifikován jako (+)-rhoeagenin a LB-2, jehož absolutní konfigurace se v současnosti řeší.

Testy na biologickou aktivitu těchto alkaloidů přinesly následující výsledky: (+)-rhoeagenin ( $IC_{50}$  AChE > 1000  $\mu$ M,  $IC_{50}$  BuChE =  $230 \pm 10$   $\mu$ M,  $IC_{50}$  POP =  $878 \pm 45$   $\mu$ M) a látka LB-2 ( $IC_{50}$  AChE > 1000  $\mu$ M,  $IC_{50}$  BuChE =  $314 \pm 13$   $\mu$ M,  $IC_{50}$  POP =  $706 \pm 2$   $\mu$ M).

Naměřené hodnoty byly porovnány se standardními látkami – cholinesterasovými inhibitory galanthaminem ( $IC_{50}$  AChE =  $1,71 \pm 0,065$   $\mu$ M,  $IC_{50}$  BuChE =  $42,30 \pm 1,30$   $\mu$ M), huperzinem A ( $IC_{50}$  AChE =  $0,033 \pm 0,001$   $\mu$ M,  $IC_{50}$  BuChE > 1000  $\mu$ M,  $IC_{50}$  POP > 1000  $\mu$ M) a rivastigminem ( $IC_{50}$  AChE =  $0,037 \pm 0,001$   $\mu$ M,  $IC_{50}$  BuChE =  $0,0033 \pm 0,0003$   $\mu$ M); prolyloligopeptidasovými inhibitory berberinem ( $IC_{50}$  POP =  $142 \pm 21$   $\mu$ M) a Z-pro-prolinalem ( $IC_{50}$  POP =  $3,27 \pm 0,02$  nM). Žádná z izolovaných látek nevykazovala vůči daným enzymům lepší inhibiční aktivitu než použité standardy.

Klíčová slova: *Papaver rhoeas*, Papaveraceae, Alzheimerova choroba, acetylcholinesterasa, butyrylcholinesterasa, prolyloligopeptidasa

## 9 Abstract

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

The aim of this study was to process the summary alkaloidal extract of aerial parts of *Papaver rhoeas* L.; to isolate contained alkaloids using chromatographical methods; to identify them and to determine their inhibitory activity towards human enzymes acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase and prolyloligopeptidase. Two alkaloids (+)-rhoeagenine and LB-2 were isolated, and the structure of LB-2 (its absolute configuration) is being determined nowadays.

*In vitro* biological assays of these alkaloids found the following results: (+)-rhoeagenine ( $IC_{50}$  AChE  $> 1000 \mu\text{M}$ ,  $IC_{50}$  BuChE =  $230 \pm 10 \mu\text{M}$ ,  $IC_{50}$  POP =  $878 \pm 45 \mu\text{M}$ ) and LB-2 ( $IC_{50}$  AChE  $> 1000 \mu\text{M}$ ,  $IC_{50}$  BuChE =  $314 \pm 13 \mu\text{M}$ ,  $IC_{50}$  POP =  $706 \pm 2 \mu\text{M}$ ).

The determined  $IC_{50}$  values of isolated alkaloids were compared with inhibitory standards of cholinesterases galanthamine ( $IC_{50}$  AChE =  $1,71 \pm 0,065 \mu\text{M}$ ,  $IC_{50}$  BuChE =  $42,30 \pm 1,30 \mu\text{M}$ ), huperzine A ( $IC_{50}$  AChE =  $0,033 \pm 0,001 \mu\text{M}$ ,  $IC_{50}$  BuChE  $> 1000 \mu\text{M}$ ,  $IC_{50}$  POP  $> 1000 \mu\text{M}$ ) and rivastigmine ( $IC_{50}$  AChE =  $0,037 \pm 0,001 \mu\text{M}$ ,  $IC_{50}$  BuChE =  $0,0033 \pm 0,0003 \mu\text{M}$ ); with POP standards berberine ( $IC_{50}$  POP =  $142 \pm 21 \mu\text{M}$ ) and Z-pro-prolinal ( $IC_{50}$  POP =  $3,27 \pm 0,02 \text{ nM}$ ). None of the isolated compounds showed better inhibitory activity than the used reference compounds.

Key words: *Papaver rhoeas*, Papaveraceae, Alzheimer's disease, acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase, prolyl oligopeptidase

## 10 Použitá literatura

- 
- <sup>1</sup> Čevela, R., Kalvach, Z., Čeledová, L.: *Sociální gerontologie*. Grada, Praha 2012.
- <sup>2</sup> Vlček, J.: *Klinická farmacie I*. Grada, Praha 2010.
- <sup>3</sup> Raboch, J., Zvolský P.: *Psychiatrie*. Galén, Karolinum, Praha 2001.
- <sup>4</sup> Terry, A. V., Buccafusco, J. J.: The cholinergic hypothesis of age and Alzheimer's disease-related cognitive deficits: recent challenges and their implications for novel drug development. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 2003, 306, 821-827.
- <sup>5</sup> Sheardová, K., Hort, J., Rusina, R., Bartoš, A., Línek, V., Ressler, P., Rektorová, I.: Doporučené postupy pro terapii Alzheimerovy nemoci a ostatních demencí. *Neurologie pro praxi* 2009, 10, 28-31.
- <sup>6</sup> Kaňovský, P., Herzig, R.: *Speciální neurologie*. 1. vyd., Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc 2007.
- <sup>7</sup> <http://www.alzheimer.cz/alzheimerova-choroba/vyskyt-demence/> staženo 11. 11. 2016
- <sup>8</sup> Mielke, M. M., Vemuri, P., Rocca, W. A.: Clinical epidemiology of Alzheimer's disease: assessing sex and gender differences. *Clinical Epidemiology* 2014, 6, 37-48.
- <sup>9</sup> Cummings, J. L., Vinters, H. V., Cole, G. M., Khachaturian, Z. S.: Alzheimer's disease Etiologies, pathophysiology, cognitive reserve, and treatment opportunities. *Neurology* 1998, 51, Suppl 1: S2-S17.
- <sup>10</sup> Povova, J., Ambroz, P., Bar, M., Pavukova, V., Sery, O., Tomaskova, H., Janout, V.: Epidemiological of and risk factors for Alzheimer's disease: A review. *Biomedical Papers* 2012, 156, 108-114.
- <sup>11</sup> Alzheimer's Association: Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's & dementia* 2013, 9, 208-245.
- <sup>12</sup> Yokota, O., Tsuchiya, K., Kuroda, S.: Early onset dementia with abundant non-neuritic A $\beta$  plaques and without significant neuronal loss: Report of two Japanese

---

autopsy cases. *Alzheimer's Disease Diagnosis and Treatments*, Nova Science Publishers, Inc. 2011, 35.

<sup>13</sup> Jalkanen, A. J., Puttonen, K. A., Venäläinen, J. I., Sinervä, V., Mannila, A., Ruotsalainen, S., Jarho, E. M., Wallén, E. A. A., Männistö, P. T.: Beneficial Effect of Prolyl Oligopeptidase Inhibition on Spatial Memory in Young but Not in Old Scopolamine-Treated Rats. *Basic & clinical pharmacology & toxicology* 2007, *100*, 132-138.

<sup>14</sup> Bartolini, M., Bertucci, C., Cavrini, V., Andrisano, V.:  $\beta$ -Amyloid aggregation induced by human acetylcholinesterase: inhibition studies. *Biochemical Pharmacology* 2003, *65*, 407-416.

<sup>15</sup> Crowther, D. C., Page, R. M., Luheshi, L., Lomas, D. A.: How and Where Does A $\beta$  Exert its Toxic Effects in Alzheimer's Disease?. *Alzheimer's Disease Diagnosis and Treatments*, Nova Science Publishers, Inc. 2011, 59.

<sup>16</sup> Ghosh, A. K., Brindisi, M., Tang, J.: Developing  $\beta$ -secretase inhibitors for treatment of Alzheimer's disease. *Journal of Neurochemistry* 2012, *120*, 71-83.

<sup>17</sup> Martin, L., Latypova, X., Terro, F.: Post-translational modifications of tau protein: implications for Alzheimer's disease. *Neurochemistry International* 2011, *58*, 458-471.

<sup>18</sup> Goedert, M., Wischik, C. M., Crowther, R. A., Walker, J. E., Klug, A.: Cloning and sequencing of the cDNA encoding a core protein of the paired helical filament of Alzheimer disease: identification as the microtubule-associated protein tau. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1988, *85*, 4051-4055.

<sup>19</sup> Billingsley, M. L., Kincaid, R. L.: Regulated phosphorylation and dephosphorylation of tau protein: effects on microtubule interaction, intracellular trafficking and neurodegeneration. *Biochemical Journal* 1997, *323*, 577-591.

<sup>20</sup> Stern, D.: Non-enzymatically glycosylated tau in Alzheimer's disease induces neuronal oxidant stress resulting in cytokine gene expression and release of amyloid b-peptide. *Nature Medicine* 1995, *1*, 693-699.

<sup>21</sup> Jiang, Q., Lee, C. Y., Mandrekar, S., Wilkinson, B., Cramer, P., Zelcer, N., Mann, K., Lamb, B., Willson, T. M., Collins, J. L., Richardson, J. C., Smith, J. D., Comery,



---

T. A., Riddell, D., Holtzman, D. M., Tontonoz, P., Landreth, G. E.: ApoE promotes the proteolytic degradation of A $\beta$ . *Neuron* 2008, 58, 681-693.

<sup>22</sup> Wang, X., Wang, W., Li, L., Perry, G., Lee, H. G., Zhu, X.: Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease. *BBA-Molecular Basis of Disease* 2014, 1842, 1240-1247.

<sup>23</sup> Balez, R., Steiner, N., Engel, M., Muñoz, S. S., Lum, J. S., Wu, Y., Wang, D., Vallotton, P., Sachdev, P., O'Connor, M., Sidhu, K., Münch, G., Ooi, L.: Neuroprotective effects of apigenin against inflammation, neuronal excitability and apoptosis in an induced pluripotent stem cell model of Alzheimer's disease. *Scientific Reports* 2016, 6.

<sup>24</sup> Quadros, A., Abdullah, L., Patel, N., Volmar, C. H.: Relevance of COX-2 inhibitors in Alzheimer's disease. *Trends in COX-2 Inhibitor Research*, Nova Science Publishers, Inc. 2006, 27.

<sup>25</sup> Lincová, D., Farghali, H.: *Základní a aplikovaná farmakologie*. 2. vyd., Galén, 2005.

<sup>26</sup> Giovannini, M. G., Scali, C., Bellucci, A., Pepeu, G., Casamenti, F.: NSAIDs in Animal Models of Alzheimer's Disease. *Trends in COX-2 Inhibitor Research*. Nova Science Publishers, Inc. 2006, 1.

<sup>27</sup> Lane, R. M., Potkin, S. G., Enz, A.: Targeting acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in dementia. *International Journal of Neuropsychopharmacology* 2006, 9, 101-124.

<sup>28</sup> Giacobini, E.: Cholinesterase inhibitors: new roles and therapeutic alternatives. *Pharmacological Research* 2004, 50, 433-440.

<sup>29</sup> Colovic, M. B., Krstic, D. Z., Lazarevic-Pasti, T. D., Bondzic, A. M., Vasic, V. M.: Acetylcholinesterase inhibitors: pharmacology and toxicology. *Current Neuropharmacology* 2013, 11, 315-335.

<sup>30</sup> Jann, M. W.: Rivastigmine, a new-generation cholinesterase inhibitor for the treatment of Alzheimer's disease. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy* 2000, 20, 1-12.

- 
- <sup>31</sup> Zangara, A.: The psychopharmacology of huperzine A: an alkaloid with cognitive enhancing and neuroprotective properties of interest in the treatment of Alzheimer's disease. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 2003, 75, 675-686.
- <sup>32</sup> Qian, Z. M., Ke, Y.: Huperzine A: is it an effective disease-modifying drug for Alzheimer's Disease?. *Frontiers in aging neuroscience* 2014, 6, 216.
- <sup>33</sup> Danysz, W., Parsons, C. G.: The NMDA receptor antagonist memantine as a symptomatological and neuroprotective treatment for Alzheimer's disease: preclinical evidence. *International Journal of Geriatric Psychology* 2003, 18, S23-S32.
- <sup>34</sup> Sheik Hosenbocus, M. D.: Memantine: a review of possible uses in child and adolescent psychiatry. *Journal of the Canadian Academy of Child and Adolescent Psychiatry* 2013, 22, 167.
- <sup>35</sup> Smith, J. V., Luo, Y.: Elevation of oxidative free radicals in Alzheimer's disease models can be attenuated by Ginkgo biloba extract EGb 761. *Journal of Alzheimer's Disease* 2003, 5, 287-300.
- <sup>36</sup> Doležal, M. a kol.: *Farmaceutická chemie léčiv působících na centrální nervový systém*. Karolinum, Praha 2013.
- <sup>37</sup> Giovannini, M. G., Scali, C., Prosperi, C., Bellucci, A., Pepeu, G., Casamenti, F.: Experimental brain inflammation and neurodegeneration as model of Alzheimer's disease: protective effects of selective COX-2 inhibitors. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology* 2003, 16, 31-40.
- <sup>38</sup> Butterfield, D. A., Castegna, A., Drake, J., Scapagnini, G., Calabrese, V.: Vitamin E and neurodegenerative disorders associated with oxidative stress. *Nutritional Neuroscience* 2013, 5, 229-239.
- <sup>39</sup> Dysken, M. W., Sano, M., Asthana, S., Vertrees, J. E., Pallaki, M., Llorente, M., Love, S., Schellenberg, G. D., McCarten, J. R., Malphurs, J. Prieto, S.: Effect of vitamin E and memantine on functional decline in Alzheimer disease: the TEAM-AD VA cooperative randomized trial. *Jama* 2014, 311, 33-44.
- <sup>40</sup> Geldenhuys, W. J., Darvesh, A. S.: Pharmacotherapy of Alzheimer's disease: current and future trends. *Expert review of neurotherapeutics* 2015, 15, 3-5.

- 
- <sup>41</sup> Stockburger, C., Miano, D., Pallas, T., Friedland, K., Müller, W. E.: Enhanced neuroplasticity by the metabolic enhancer piracetam associated with improved mitochondrial dynamics and altered permeability transition pore function. *Neural Plasticity* 2016, 1-14.
- <sup>42</sup> Chen, N., Yang, M., Guo, J., Zhou, M., Zhu, C., He, L.: Cerebrolysin for vascular dementia. *The Cochrane Library* 2013.
- <sup>43</sup> Gauthier, S., Proaño, J. V., Jia, J., Froelich, L., Vester, J. C., Doppler, E.: Cerebrolysin in mild-to-moderate Alzheimer's disease: a meta-analysis of randomized controlled clinical trials. *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders* 2015, 39, 332-347.
- <sup>44</sup> Lee, J. H., Jiang, Y., Han, D. H., Shin, S. K., Choi, W. H., Lee, M. J.: Targeting estrogen receptors for the treatment of Alzheimer's disease. *Molecular Neurobiology* 2014, 49, 39-49.
- <sup>45</sup> Hejny, S., Slavík, B.: *Květena České republiky 1. 2. vyd.*, Academia, Praha 1997.
- <sup>46</sup> Obrázek stažen ze stránky <http://lambley.com.au/plant/poppy-flanders-poppy>, 22. 10. 2016
- <sup>47</sup> Kadereit, J. W.: Papaveraceae. *Flowering Plants-Dicotyledons*. Springer Berlin Heidelberg 1993.
- <sup>48</sup> Christenhusz, M. J., Byng, J. W.: The number of known plants species in the world and its annual increase. *Phytotaxa* 2016, 261, 201-217.
- <sup>49</sup> Kostic, D. A., Mitic, S. S., Mitic, M. N., Velickovic, J. M.: Phenolic contents, antioxidant and antimicrobial activity of *Papaver rhoeas* L. extracts from Southeast Serbia. *Journal of Medical Plants Research* 2010, 4, 1727-1732.
- <sup>50</sup> Grycová, L., Dostál, J., Marek, R.: Quaternary protoberberine alkaloids. *Phytochemistry* 2007, 68, 150-175.
- <sup>51</sup> Phillipson, J. D., Gray, A. I., Askari, A. A., Khalil, A. A.: Alkaloids from Iraqi species of Papaveraceae. *Journal of Natural Products* 1981, 44, 296-307.

- 
- <sup>52</sup> Jung, H. A., Min, B. S., Yokozawa, T., Lee, J. H., Kim, Y. S., Choi, J. S.: Anti-Alzheimer and antioxidant activities of Coptidis Rhizoma alkaloids. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 2009, 32, 1433-1438.
- <sup>53</sup> Shamma, M.: *The Isoquinoline Alkaloids Chemistry and Pharmacology*. ACADEMIC PRESS New York and London, 1972.
- <sup>54</sup> Zhong, M., Liu, Y., Liu, J., Di, D., Xu, M., Yang, Y., Li, W., Chen, Y., Liu, J.: Isocorydine derivatives and their anticancer activities. *Molecules* 2014, 19, 12099-12115.
- <sup>55</sup> Konda, Y., Imai, Y., Hojo, H., Endo, T., Nozoe, S.: Suppression of tumor cell growth and mitogen response by aporphine alkaloids, dicentrine, glaucine, corydine, and apomorphine. *Journal of Pharmacobio-dynamics* 1990, 13, 426-431.
- <sup>56</sup> Omar, H., Hashim, N. M., Zajmi, A., Nordin, N., Abdelwahab, S. I., Azizan, A. H. S., Hadi, A. H. A., Ali, H. M.: Aporphine alkaloids from the leaves of *Phoebe grandis* (Nees) Mer. (Lauraceae) and their cytotoxic and antibacterial activities. *Molecules* 2013, 18, 8994-9009.
- <sup>57</sup> Lin, R. J., Wu, M. H., Ma, Y. H., Chung, L. Y., Chen, C. Y., Yen, C. M.: Anthelmintic activities of aporphine from *Nelumbo nucifera* Gaertn. cv. Rosa-plena against *Hymenolepis nana*. *International Journal of Molecular Sciences* 2014, 15, 3624-3639.
- <sup>58</sup> Agnihotri, V. K., ElSohly, H. N., Khan, S. I., Jacob, M. R., Joshi, V. C., Smillie, T., Khan, I. A., Walker, L. A.: Constituents of *Nelumbo nucifera* leaves and their antimalarial and antifungal activity. *Phytochemistry Letters* 2008, 1, 89-93.
- <sup>59</sup> Yang, Z., Song, Z., Xue, W., Sheng, J., Shu, Z., Shi, Y., Liang, J., Yao, X.: Synthesis and structure–activity relationship of nuciferine derivatives as potential acetylcholinesterase inhibitors. *Medicinal Chemistry Research* 2014, 23, 3178-3186.
- <sup>60</sup> Guinaudeau, H., Shamma, M.: The protopine alkaloids. *Journal of Natural Products* 1982, 45, 237-246.
- <sup>61</sup> Ruffer, M., Zenk, M. H.: Enzymatic formation of protopines by a microsomal cytochrome P-450 system of *Corydalis vaginans*. *Tetrahedron Letters* 1987, 28, 5307-5310.

- 
- <sup>62</sup> Onda, M., Takahashi, H.: Protopine alkaloids. *The Alkaloids: Chemistry and Pharmacology* 1989, 34, 181-209.
- <sup>63</sup> Alles, G. A., Ellis, C. H.: A comparative study of the pharmacology of certain cryptopine alkaloids. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 1952, 104, 253-263.
- <sup>64</sup> Song, L. S., Ren, G. J., Chen, Z. L., Chen, Z. H., Zhou, Z. N., Cheng, H.: Electrophysiological effects of protopine in cardiac myocytes: inhibition of multiple cation channel currents. *British Journal of Pharmacology* 2000, 129, 893-900.
- <sup>65</sup> Vacek, J., Walterova, D., Vrublova, E., Simanek, V.: The chemical and biological properties of protopine and allocryptopine. *Heterocycles* 2010, 81, 1773-1789.
- <sup>66</sup> Xiao, X., Liu, J., Hu, J., Li, T., Zhang, Y.: Protective effect of protopine on the focal cerebral ischaemic injury in rats. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* 2007, 101, 85-89.
- <sup>67</sup> Montgomery, C. T., Cassels, B. K., Shamma, M.: The rhoeadine alkaloids. *Journal of Natural Products* 1983, 46, 441-453.
- <sup>68</sup> Dogan, G., Bagcı, E.: Essential oil composition of *Papaver rhoeas* L. (corn poppy) (Papaveraceae) from Turkey. *Hacettepe Journal of Biology and Chemistry* 2014, 42, 545-549.
- <sup>69</sup> Hillenbrand, M., Zapp, J., Becker, H.: Depsides from the petals of *Papaver rhoeas*. *Planta Medica* 2004, 70, 380-382.
- <sup>70</sup> Hrbek, J., Hruban, L., Šimánek, V., Šantavý, F., Snatzke, G.: Isolation and chemistry of the alkaloids from some plants of the genus *Papaver*. LVII. Chiroptical properties and preparation of some rhoeadine and isorhoeadine derivatives. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications* 1973, 38, 2799-2816.
- <sup>71</sup> Slavík, J.: Characterization of alkaloids from the roots of *Papaver rhoeas* L. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications* 1978, 43, 316-319.
- <sup>72</sup> Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V., Featherstone, R. M.: A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology* 1961, 7, 88-95.

- 
- <sup>73</sup> Hung, T. M., Thuong, P. T., Nguyen, T. N., Nguyen, T. T. M., Quan, T. L., Choi, J. S., Woo, M. H., Min, B., S., Bae, K. H.: Cholinesterase inhibitory activities of alkaloids from *Corydalis tuber*. *Natural Product Sciences* 2011, *17*, 108-112.
- <sup>74</sup> Liu, R., Gao, M., Qiang, G. F., Zhang, T. T., Lan, X., Ying, J., Du, G. H.: The anti-amnesic effects of luteolin against amyloid  $\beta$  25–35 peptide-induced toxicity in mice involve the protection of neurovascular unit. *Neuroscience* 2009, *162*, 1232-1243.
- <sup>75</sup> Nantakornsuttanan, N., Thuphairo, K., Kukreja, R. K., Charoenkiatkul, S., Suttisansanee, U.: Anti-cholinesterase inhibitory activities of different varieties of chili peppers extracts. *International Food Research Journal* 2016, *23*, 1953-1959.
- <sup>76</sup> Howes, M. J. R., Houghton, P. J.: Acetylcholinesterase inhibitors of natural origin. *International Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences* 2009, *3*, 67-86.
- <sup>77</sup> 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. *Fitoterapia* 2015, *103*, 192-196.