

**UNIVERZITA KARLOVA**  
**FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ**  
**KATEDRA FARMAKOGNOZIE A FARMACEUTICKÉ BOTANIKY**



**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

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

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

Vedoucí diplomové práce: doc. PharmDr Jakub Chlebek, Ph.D.

Hradec Králové 2022

Anna Bučková

CHARLES UNIVERSITY  
FACULTY OF PHARMACY IN HRADEC KRÁLOVÉ  
DEPARTMENT OF PHARMACOGNOSY  
AND PHARMACEUTICAL BOTANY



DIPLOMA THESIS

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

Head: prof. Ing. Lucie Cahlíková, Ph.D.

Supervisor: Assoc. Prof. PharmDr. Jakub Chlebek, Ph.D.

HRADEC KRÁLOVÉ 2022

Anna Bučková

## 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, 2022

.....

Anna Bučková

### Poděkování:

Ráda bych poděkovala především vedoucímu své práce doc. PharmDr. Jakubu Chlebkovi, Ph.D. za trpělivost, čas a energii, které mi věnoval. Dále konzultantovi RNDr. Jaroslavu Jenčovi, Ph.D. za změření hmotnostních spekter, doc. PharmDr. Jiřímu Kunešovi za změření a interpretaci NMR spekter, PharmDr. Daniele Hulcové, Ph.D. za změření cholinesterasové a RNDr. Martině Hrabínové, Ph.D. za změření prolyloligopeptidasové inhibiční aktivity a také celé katedře farmakognozie a farmaceutické botaniky za příjemné pracovní prostředí a nakonec svojí spolužačce Eszter Gergely, bez které by experimentální část nebyla zdaleka tak zábavná.

Tato práce byla zpracována za finanční podpory SVV UK 260 548 a Progres/UK Q42.

## OBSAH

1	ÚVOD.....	6
2	CÍL PRÁCE.....	8
3	TEORETICKÁ ČÁST .....	9
3.1	Projevy .....	9
3.2	Etiopatogeneze.....	10
3.2.1	Abnormální proteiny.....	10
3.2.2	Ztráta inervace v cholinergním systému.....	12
3.2.3	Abnormální enzymatická aktivita .....	13
3.2.4	AGE (advanced glycation end products) .....	14
3.2.5	Excitotoxicita .....	14
3.3	Rizikové faktory .....	14
3.3.1	Věk .....	14
3.3.2	Genetika .....	15
3.3.3	Apolipoprotein E.....	15
3.3.4	Kardiovaskulární onemocnění a diabetes mellitus.....	15
3.3.5	Kvalita spánku.....	16
3.4	Diagnostika AD .....	16
3.5	Prevence.....	16
3.6	Terapie .....	17
3.6.1	Behaviorální a psychologické potíže.....	17
3.6.2	Aktivity denního života .....	18
3.6.3	Kognitivní deteriorace.....	18
3.7	Průchod látky přes hematoencefalickou bariéru .....	19
3.8	<i>Papaver rhoeas</i> L. (mák vlčí).....	21
3.8.1	Taxonomické zařazení.....	21

3.8.2	Botanický popis, použití, toxicita.....	21
3.8.3	Obsahové látky .....	22
3.8.3.1	Nealkaloidní látky.....	22
3.8.3.2	Alkaloidy .....	23
3.8.3.2.1	Rhoeadinové alkaloidy .....	24
3.8.3.2.2	Aporfinové alkaloidy .....	25
3.8.3.2.3	Protoberberinové alkaloidy.....	26
3.8.3.2.4	Protopinové alkaloidy .....	26
3.8.3.2.5	Benzofenanthridinové alkaloidy.....	27
3.8.4	Účinky alkaloidů identifikovaných v rodu <i>Papaver</i> .....	27
3.8.4.1	Cholinesterasy.....	27
3.8.4.2	Prolylolyptidasa .....	28
3.8.4.3	Antiagregace A $\beta$ fragmentů .....	28
3.8.4.4	Antioxidační aktivita .....	28
3.8.4.5	Protizánětlivé účinky .....	28
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	29
4.1	Materiál a vybavení .....	29
4.1.1	Rozpouštědla a chemikálie.....	29
4.1.2	Pomocné látky .....	29
4.1.3	Chromatografické adsorbenty.....	29
4.1.4	Přístrojové vybavení .....	30
4.1.5	Kolony a kartridže pro flash chromatografii .....	30
4.1.6	Směsi k vyvíjení TLC .....	31
4.1.7	Detekční činidla .....	31
4.2	Pracovní postupy .....	31
4.2.1	Příprava a čištění rozpouštědel .....	31

4.2.2	Odpařování výtřepků, jednotlivých frakcí .....	31
4.2.3	Sušení extraktu, frakcí, izolovaných čistých látek a jejich skladování .....	32
4.2.4	TLC detekce .....	32
4.2.5	Příprava litých vrstev pro preparativní TLC .....	32
4.2.6	Flash chromatografie .....	32
4.2.6.1	Deaktivace adsorbentů .....	32
4.2.6.2	Příprava suchého vzorku (roztěru) do předkolony .....	33
4.2.6.3	Plnění skleněné kolony/HP kartridže pro flash chromatografii .....	33
4.2.7	Strukturní analýza .....	33
4.2.7.1	GC-MS analýza .....	33
4.2.7.2	LC-MS analýza .....	34
4.2.7.3	NMR analýza .....	34
4.2.7.4	Měření optické otáčivosti .....	34
4.3	Izolace alkaloidů ze spojeného chloroformového extraktu .....	34
4.3.1	Flash chromatografie na Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> .....	34
4.3.2	Flash chromatografie na SiO <sub>2</sub> .....	37
4.3.3	Izolace alkaloidů ze spojené frakce 34–77 (561 mg) .....	40
4.3.3.1	Izolace alkaloidu z podfrakce 2 (58 mg) .....	40
4.3.3.2	Izolace alkaloidu z podfrakce 3 (36,4 mg) .....	40
4.3.3.3	Izolace alkaloidu z podfrakce 4 (112 mg) .....	40
4.3.4	Měření aktivit izolovaných alkaloidů .....	41
4.3.4.1	Měření inhibice cholinesteras .....	41
4.3.4.2	Měření inhibice prolyloligopeptidasy .....	41
5	VÝSLEDKY .....	42
5.1	Strukturní analýza .....	42
5.1.1	(+)-Rhoeadin (AB-1) .....	42

5.1.2	(+)-Isorhoeagenin (AB-2).....	43
5.1.3	(+)-Rhoeagenin (AB-3).....	44
5.2	Biologická aktivita.....	45
6	DISKUZE A ZÁVĚR.....	46
7	ABSTRAKT.....	48
8	ABSTRACT.....	49
9	LITERATURA.....	50



## TABULKA POUŽITÝCH ZKRATEK A VYSVĚTLIVEK

AD	Alzheimer' s disease = Alzheimerova choroba/demence
ACh	Acetylcholin
AChE	Acetylcholinesterasa
AGE	Advanced glycation end products = konečné produkty pokročilé glykace
ApoE	Apolipoprotein E
APP	Amyloidní prekurzorový protein
BACE-1	$\beta$ -amyloid cleaving enzyme-1 = $\beta$ -sekretasa-1
BuChE	Butyrylcholinesterasa
CT	Computer tomography = počítačová tomografie
DM2	Diabetes mellitus 2. typu
EOAD	Early onset Alzheimer disease = juvenilní Alzheimerova choroba
GC-MS	Gas chromatography – mass spektrofotometry = plynová chromatografie spojená s hmotnostní detekcí

GSK-3	Glykogensynthasa-kinasa 3
HEB	Hematoencefalická bariéra
HPLC	High-performance liquid chromatography = vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IAM	Imobilised artificial membrane = imobilizovaná umělá membrána
logBB	Logaritmický poměr mezi koncentracemi dané látky v mozku a v krvi
MMSE	Mini mental state examination
MRI	Magnetic resonance imaging = magnetická rezonance
NFT	Neurofibrillary tangles = neurofibrilární klubka
NMDA	<i>N</i> -methyl D-aspartát
NMR	Nuclear magnetic resonance = nukleární magnetická rezonance
PAMPA	Parallel artificial membrane permeability assay = paralelní test permeability umělé membrány
POP	Prolyloligopeptidasa
PSEN 1	Presenilin 1
PSEN 2	Presenilin 2

- RAGE Receptor of Advanced Glycation Products = receptor konečných produktů pokročilé glykace
- ROS Reactive oxygen species = reaktivní formy kyslíku (volné radikály)
- SSRI Selective serotonin reuptake inhibitors = selektivní inhibitory zpětného vychytávání serotoninu

## PŘEHLED OBRÁZKŮ

Obrázek 1 Štěpení amyloidního prekurzorového proteinu.....	11
Obrázek 2 $\tau$ -protein .....	12
Obrázek 3 Acetylcholin.....	12
Obrázek 4 Způsoby přechodu přes HEB .....	19
Obrázek 5 Papaver rhoeas.....	22
Obrázek 6 Rhoeadin .....	25
Obrázek 7 Roemerin.....	25
Obrázek 8 Isokorydin.....	25
Obrázek 9 Berberin .....	26
Obrázek 10 Protopin .....	27
Obrázek 11 Allokryptopin.....	27
Obrázek 12 Sanguinarin .....	27
Obrázek 13 Chromatogram průběhu flash separace.....	38
Obrázek 14 TLC - 10 spojených frakcí z flash chromatografie .....	39
Obrázek 15 Struktura (+)-rhoeadinu.....	42
Obrázek 16 Struktura (+)-isorhoeageninu.....	43
Obrázek 17 Struktura (+)-isorhoeageninu.....	44

## PŘEHLED TABULEK

Tabulka 1 Cholinesterasová aktivita Et <sub>2</sub> O a spojeného výtřepku .....	35
Tabulka 2 Eluční gradient chromatografie na Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> – MF I a MF II .....	36
Tabulka 3 Inhibiční aktivita frakcí získaných z flash chromatografie .....	36
Tabulka 4 Eluční gradient chromatografie na SiO <sub>2</sub> .....	37
Tabulka 5 Hmotnosti 10 spojených frakcí z flash chromatografie (SiO <sub>2</sub> 60 15 μm) .....	39
Tabulka 6 Inhibice cholinesteras, prolyloligopeptidasy a výpočet logBB u izolovaných alkaloidů .....	45

# 1 ÚVOD

Alzheimerova choroba/demence je progresivní neurodegenerativní onemocnění projevující se zhoršováním zejména kognitivních, ale i jiných schopností. Tato onemocnění postihuje paměť, exekutivní funkce (schopnost plánovat, činit rozhodnutí, vyjadřovat se a rozumět řeči) a aktivity denního života. Navíc často pacienty s Alzheimerovou demencí postihují neuropsychiatrické změny jako např. apatie nebo naopak agitovanost, změny ve spánkovém režimu a v chuti k jídlu, ale i halucinace nebo deprese[1].

Vzhledem k tomu, že tato demence nejčastěji propuká v seniorském věku a ve vyspělých zemích dochází ke stárnutí populace, stává se tato choroba čím dál palčivějším problémem. Pacienti jsou s postupujícím onemocněním odkázáni na pečovatele, přičemž zejména obtížně zvladatelné neuropsychiatrické projevy mohou být příčinou institucionalizace pacienta. Alzheimerova demence je břemenem pro pečovatele i pro zdravotní a sociální systém[1].

Hlavní terapeutickým přístupem u tohoto onemocnění je v současnosti symptomatická léčba spočívající v inhibici cholinesteras[2]. Potentní inhibitory byly nalezeny i mezi sloučeninami rostlinného původu[3]. Prvním používaným inhibitorem acetylcholinesterasy byl fysostigmin, který je obsažen v kalabarských bobech rostliny *Physostigma venenosum*. V současnosti se tento alkaloid v terapii Alzheimerovy choroby již delší dobu nepoužívá kvůli výrazným vedlejším účinkům[4]. Na základě „Evidence-Based Medicine“ mezi používána léčiva patří látky zvyšující dostupnost acetylcholinesterasy (galanthamin, donepezil a rivastigmin). Kromě inhibitorů cholinesteras našel uplatnění i antagonist *N*-methyl-D-aspartátových receptorů memantin[2].

Dlouhodobý výzkum na katedře farmakognozie a farmaceutické botaniky na Farmaceutické fakultě Univerzity Karlovy přispívá k poznání biologické aktivity alkaloidů rostlin z čeledí Papaveraceae, Amaryllidaceae, Berberidaceae, Apocynaceae a dalších. Ukázalo se, že některé tyto obsahové látky vykazují nadějnou inhibiční aktivitu vůči cholinesterasám a také dalším enzymům dávaným do souvislosti s patogenezí Alzheimerovy choroby – např. vůči prolyloligopeptidase (POP) aj.[5]

Cíl této práce je zaměřený na izolaci alkaloidů z *Papaver rhoeas* L. a objasnit jejich vliv zejména na butyrylcholinesterasu, neboť dříve připravený alkaloidní extrakt z této rostliny vykazoval výraznou a selektivní inhibici tohoto enzymu. Tato zajímavá biologická aktivita byla zjištěna v rámci screeningu alkaloidních extraktů taxonů provedený ve skupině ADINACO na katedře farmakognozie a farmaceutické botaniky na farmaceutické fakultě Univerzity Karlovy[6].

## 2 CÍL PRÁCE

Cílem této diplomové práce je:

- izolace alespoň jednoho alkaloidu v čisté formě z dříve připraveného alkaloidního výtřepku běžnými chromatografickými metodami,
- podílet se na určení objasnění struktury izolované sloučeniny za použití spektrometrických a spektroskopických metod,
- podílet se na stanovení biologické aktivity izolovaných sloučenin (inhibice cholinesteras, prolyloligopeptidasy, logBB),
- interpretace a shrnutí dosažených výsledků,
- sepsání vlastní práce.



# 3 TEORETICKÁ ČÁST

Alzheimerova demence (AD) je progresivní neurodegenerativní onemocnění, které se vyskytuje nejčastěji ve vyšším věku, a proto se s ním setkáváme čím dál častěji kvůli stárnutí populace. Nicméně tato choroba se někdy může objevit i u člověka mladšího 65 let – tento jev se nazývá EOAD (Early Onset Alzheimer's Disease)[7]. AD je spojena s kognitivní deteriorací a řadou dalších behaviorálních a fyziologických změn. Kauzální terapie zatím neexistuje a léčba je zaměřena na zpomalení progresu a potlačování provázejících komplikací[2].

## 3.1 Projevy

AD je progredující onemocnění – příznaky se zhoršují s postupujícím stádiem. První symptomy bývají, zejména u pacientů v seniorském věku, považovány za běžné známky stárnutí[2]. Zpočátku se vykytují zdánlivě nepatrné výpadky paměti (neschopnost vybavit si název místa nebo předmětu, pokládání otázek opakovaně, odkládání věcí a neschopnost je potom najít apod.). Ve středním stadiu se stále častěji stává, že pacient ztrácí časovou nebo prostorovou orientaci, propadá změnám nálad, někdy až paranoie, trpí afázií, která se v pozdním stádiu přehoupne až v úplnou ztrátu řeči. Také tito pacienti mívají problémy s polykáním, trpívají inkontinencí a kromě krátkodobé paměti bývá zasažena i dlouhodobá paměť. Po celou dobu se zhoršuje pacientova soběstačnost, až se stává neschopným provádět běžné denní úkony a vyžaduje 24hodinový dozor a péči[8].

Dalším častým jevem u pacientů s AD je změna spánkového režimu – časté noční probouzení, brzké vstávání a někdy dochází až k takzvané spánkové inverzi. Tito lidé pospávají během dne, v noci jsou bdělí a při zmatenosti způsobené demencí se mohou procházet po bytě nebo dokonce odejít ven, přičemž hrozí, že si ublíží nebo se ztratí apod. Spánková inverze pacientů je jednou z příčin velké zátěže kladené na pečovatele[9,10].

Velmi často bývá AD také spojována s behaviorálními poruchami. V tomto poli existuje velká rozmanitost. Poměrně obvyklým problémem pacientů s AD bývá agitovanost, od mírného neklidu až po silné projevy – např. vydávání různých skřeků, utíkání z domova

aj. Agitovanost někdy přerůstající v agresi, která může být verbální i fyzická a namířená buď pouze vůči předmětům nebo i vůči lidem – rodině, zdravotníkům, sociálním pracovníkům. Kromě agitovanosti nebo agrese se u některých pacientů mohou projevit halucinace nebo paranoia. Hodně častou komplikací je také deprese. Uvádí se, že postihují až kolem 50 % pacientů s AD, ale není vyloučeno, že toto číslo je mnohem vyšší a deprese není u části pacientů rozpoznána[11].

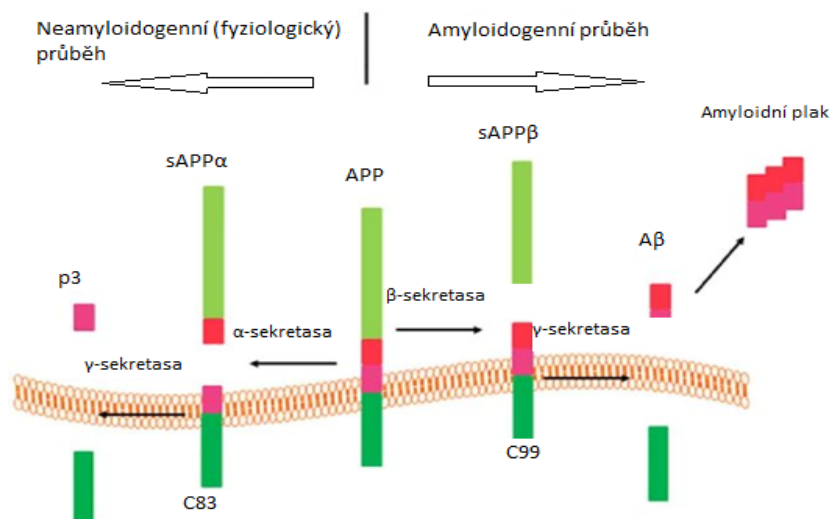
## 3.2 Etiopatogeneze

Pro patofyziologii AD existuje několik teorií, z nichž nejvýznamnější jsou teorie amyloidových plaků a cholinergní teorie. Mezi typické změny v mozku pacientů/nemocných s touto chorobou náleží senilní plaky tvořené  $\beta$ -amyloidem ( $A\beta$ ), klubka hyperfosforylovaného  $\tau$ -proteinu a probíhající sterilní zánět[12].

### 3.2.1 Abnormální proteiny

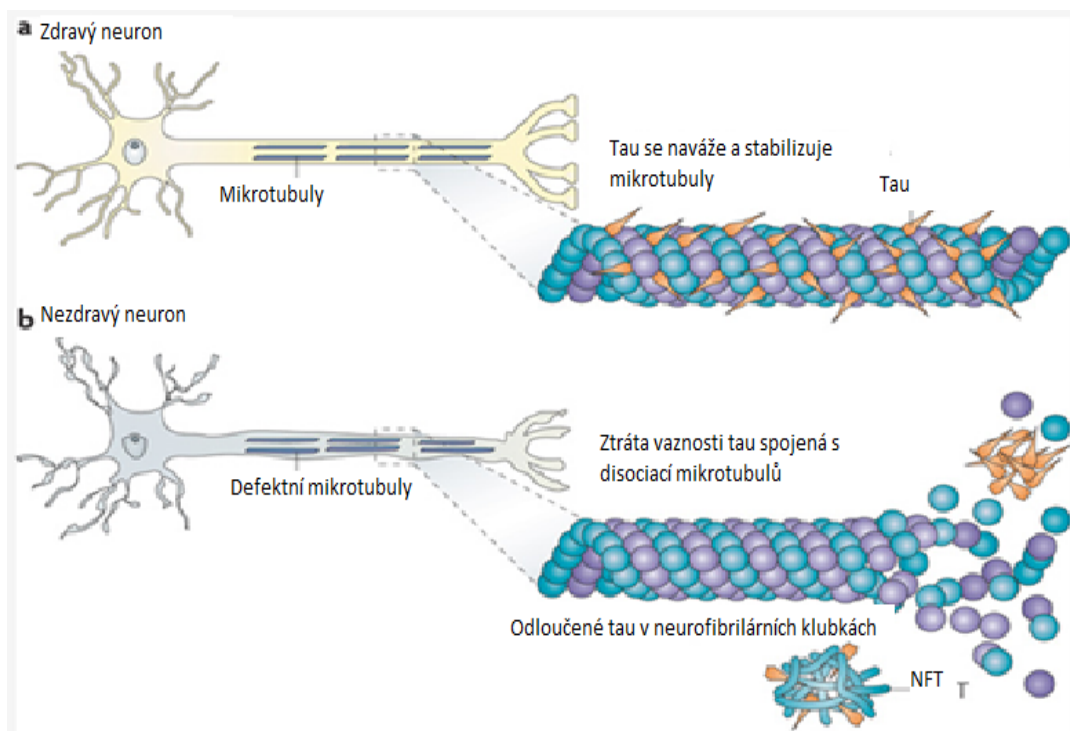
Vznik amyloidních plaků začíná chybným štěpením APP (amyloidního prekurzorového proteinu). Fyziologicky je APP štěpen  $\alpha$ -sekretasou, vzniká solubilní sAPP $\alpha$  fragment, zbytek transmembránového proteinu je štěpen na 2 části, přičemž všechny 3 fragmenty původního APP působí za těchto podmínek neuroprotektivně. Je-li APP štěpen  $\beta$ -sekretasou (BACE1) a následně  $\gamma$ -sekretasou, vznikají nefyziologické  $A\beta$  fragmenty, které se dále shlukují do nerozpustných agregátů, vyplňují mezisynaptické prostory a brání normálnímu přenosu vzruchu.  $\gamma$ -Sekretasa je schopna štěpit zbytek proteinu na 2 místech, které vedou ke vzniku  $A\beta_{40}$  nebo  $A\beta_{42}$ , přičemž  $A\beta_{42}$  vzniká v menší míře, zato působí značně neurotoxičtěji a má vyšší potenciál ke shlukování[13].

Oligomery tvořené  $A\beta$  fragmenty se umí dostat do intracelulárního prostoru, což může způsobovat inhibici proteazomu, zvýšený vtok vápenatých iontů (ten vede k poruchám přenosu vzruchu), snížení aktivity dýchacího řetězce (tím se zvýší oxidační stres kvůli volným radikálům) a také hromadění glutamátu (vyvolává excitotoxicitu, dráždění neuronu)[12].



Obrázek 1 Štěpení amyloidního precursorového proteinu – fyziologická a patologická cesta [14] (upraveno)

Shlukování oligomerů dále pokračuje do vzniku polymerů, jejichž přítomnost aktivuje kinasy ke zvýšené fosforylaci  $\tau$ -proteinu, který reaguje rovněž polymerizací a v místě se objevují tzv. neurofibrilární klubka (NFT – neurofibrilar tangles).  $\tau$ -Protein se nachází uvnitř neuronů, jeho základní funkcí je stabilizace mikrotubulů – podílí na správném fungování cytoskeletu.  $\tau$ -Protein se také uplatňuje při regulaci signálních drah nervového přenosu a pro správné fungování přenosu vzruchů přes synapse je nezbytný. Patogeneze AD s  $\tau$ -proteinem úzce souvisí, zvláště v případě, že procesy týkající se  $\tau$ -proteinu neprobíhají fyziologickým způsobem. Běžně podstupuje tento protein několik posttranslačních modifikací, např. glykosylaci, ubikvitinaci, sumoylaci, acetylaci nebo neenzymovou glykaci. Nejvýznamnější modifikací  $\tau$ -proteinu je fosforylace, která může proběhnout na zhruba 30 vazebných místech. Stupeň fosforylace určuje biologickou funkci tohoto proteinu. U osob s AD bývá  $\tau$ -protein fosforylován zhruba ve 3–4× vyšší míře než u zdravých lidí. Hyperfosforylace vede ke ztrátě funkce  $\tau$ -proteinu a také k agregaci do nežádoucích NFT[15].

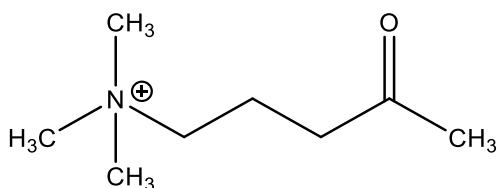


Obrázek 2  $\tau$ -protein [16] (upraveno)

Tyto patologické útvary (polymery z  $A\beta$  fragmentů a NFT) probouzí ochranné procesy mozkové tkáně, v místě dochází ke koncentrování mikroglíí, které spustí zánětlivou reakci[12].

### 3.2.2 Ztráta inervace v cholinergním systému

Acetylcholin (ACh; obr. 3) je neuromediátor, který má funkci v centrálním i periferním nervovém systému. Je hlavním mediátorem parasympatiku a ve vegetativním systému působí podporou peristaltiky gastrointestinálního traktu, snížením srdeční frekvence a síly stahu, vazodilataci na periferii, bronchokonstrikcí, zvýšením činnosti slinných a slzných žláz a dalšími.



Obrázek 3 Acetylcholin

V centrálním nervovém systému hraje ACh roli v procesech paměti a učení. Bylo prokázáno, že u lidí trpících AD jsou snížené hladiny ACh v mozku [17].

Cholinergní synapse se vyskytují ve velké hustotě v limbickém systému, striatu, talamu a neokortexu. Zejména poslední oblast je kritická pro procesy paměti, učení nebo pozornosti a je logické, že narušení cholinergní transmise vyvolá příznaky právě u AD[18]. Teorii o spojitosti AD s cholinergním systémem podporují i poznatky získané s používáním anticholinergní látky během terapie močové inkontinence, při které docházelo k zhoršení kognitivních schopností pacientů[19].

ACh je odbouráván v synapsích cholinesterasami, nejnámějším z těchto enzymů je acetylcholinesterasa (AChE). Hlavní terapeutickou přístupem se tudíž staly inhibitory tohoto enzymu, díky nimž dochází ke zvýšení hladiny ACh v mozku[2]. Některá data ale ukazují, že AChE může být u pacientů v pokročilém stádiu AD dokonce snížena a za odbourávání ACh je zodpovědná spíše butyrylcholinesterasa (BuChE), jejíž koncentrace bývá výrazně zvýšena a bylo by tedy perspektivnější cílit léčbu právě na tento enzym. Poměr těchto 2 enzymů (BuChE:AChE), který u zdravých jedinců bývá 0,2 se může zvýšit až na 11 ve prospěch BuChE[20]. Dosud byl zájem namířen převážně na AChE, ale v posledních letech se pozornost obrací právě k potenciálu inhibice BuChE. Experiment, ve kterém byly krysy vystaveny různými způsoby působení analogům látky cymserin (inhibitory BuChE), přinesl slibné výsledky. Mikrodialýza provedená po podání inhibitorů BuChE potvrdila zvýšení koncentrací ACh v mozkové kůře krysy. Jiné krysy zase prokázaly po podání cymserinových analogů schopnost rychleji se naučit trasu krysího bludiště s menším počtem chyb než kontrolní skupina. U transgenních myší produkujících lidské A $\beta$  fragmenty vyvolalo vystavení inhibitorům BuChE pokles tvorby těchto fragmentů. Výsledky této studie jsou tedy velice slibné a podporují myšlenku potenciálního využití inhibitorů BuChE v terapii AD[21].

### 3.2.3 Abnormální enzymatická aktivita

Glykogensynthasa-kinasa 3 (GSK-3) je enzym, fungující jako serin/threonin kinasa, jejíž role v patogenezi AD spočívá ve fosforylaci  $\tau$ -proteinu. Zde hraje primární roli izoforma  $\beta$ . Zvýšená aktivita nebo exprese této izoformy bývá spojována s rozvojem AD. Stejně jako u výše zmíněných enzymů, i vůči GSK-3 $\beta$  aktivní látky jsou intenzívně studovány

jako potenciální léčiva AD[22].

### 3.2.4 AGE (advanced glycation end products)

Volné radikály mohou vznikat více cestami. Jednou z nich je neenzymová glykace, neboť jednoduché cukry jsou reaktivní a s aminoskupinami vstupují do Maillardovy reakce. Několika dalšími přeměnami nakonec vznikají konečné produkty pokročilé glykace (AGE). Byl objeven receptor RAGE, kterým AGE předávají signály buňkám.

Souběžně s neenzymovou glykací probíhají také oxidační reakce (glykoxidace), během nichž se uvolňují volné kyslíkové radikály ROS[23].

### 3.2.5 Excitotoxicita

*N*-methyl-D-aspartátové receptory (NMDA) reagují na excitační mediátor glutamát. Hyperaktivace NMDA receptorů vede k dramatickému zvýšení intracelulárních koncentrací vápenatých iontů, což přes kaskádu procesů buňku nakonec usmrtí. Vápenaté ionty v cytosolu způsobují, že mitochondrie generují velké množství ROS. Kromě glutamátu může s NMDA receptorem reagovat i A $\beta$  a působit tak neurotoxicky[23].

## 3.3 Rizikové faktory

AD je onemocnění, u něhož se přesná příčina nezná a etiologie není 100% objasněná. Byly ale objeveny určité faktory, které jsou s AD nějakým způsobem spojovány. Z jejich hlediska rozlišujeme familiární a sporadickou formu AD, přičemž familiární je spjata s mutacemi v některém z konkrétních genů, u sporadické bývá příčina mnohdy méně zřejmá, případně úplně neznámá[7].

### 3.3.1 Věk

Jak již bylo naznačeno, významným rizikovým faktorem je věk. Observační studie z roku 1995 jednoznačně prokázala rostoucí prevalenci v každé následující věkové skupině (0,6 % u lidí 65–69 let, 70–74 let 1 %, 75–79 let už 2 %, 80–84 let 3,3 % a nad 85 let dokonce 8,4 %)[24].

### 3.3.2 Genetika

Když se podíváme na EOAD, existují známé genetické příčiny. Pak většinou hovoříme o familiární formě AD – lidé s některou z těchto mutací mají nejen vyšší riziko, že se AD vůbec projeví, ale častěji v nižším věku (před 65. rokem života). Geny, které toto riziko nesou, jsou geny pro APP, presenilin 1 (PSEN1) a presenilin2 (PSEN2). Při mutaci APP genu nastane změna v produkci A $\beta$  fragmentů, tento typ mutace je ale zodpovědný pouze za malou část geneticky podmíněné AD. Daleko větší význam z hlediska zasažených pacientů má mutace genů PSEN1 a 2. Tyto homologní geny nesou informaci pro produkci proteinů, které jsou určující pro aktivitu  $\gamma$ -sekretasy, čili mají vliv na množství vytvářených neurotoxických A $\beta$  fragmentů[7].

### 3.3.3 Apolipoprotein E

Třetím, poměrně dobře prozkoumaným rizikovým faktorem, je forma alely pro apolipoprotein E (Apo E). Apo E ve variantě  $\epsilon$ 3 je nejběžněji zastoupen,  $\epsilon$ 2 má protektivní účinek, naopak forma  $\epsilon$ 4 je spojena s vyšší pravděpodobností rozvoje AD. Tato spojitost je dobře vidět na četnosti, se kterou se alela  $\epsilon$ 4 objevuje: v běžné populaci je zastoupena 13,7 %, ve skupině pacientů trpících AD, ale zaujímá zhruba 40 %! Kromě výrazně vyššího rizika propuknutí AD s sebou nese  $\epsilon$ 4 také posunutí AD do nižšího věku. ApoE  $\epsilon$ 4 má na svědomí změnu metabolismu A $\beta$  – snížené odplavování a podpora jejich ukládání do senilních plaků[25].

### 3.3.4 Kardiovaskulární onemocnění a diabetes mellitus

Na rozdíl od věku a varianty genu pro Apo E, riziko rozvoje AD mohou zvyšovat faktory, které jsou alespoň částečně ovlivnitelné. Jsou jimi kardiovaskulární nemoci a diabetes mellitus 2. typu (DM2). DM2 vede k mikrovaskulárním změnám, které v mozku mohou vést k atrofii spojené s kognitivním deficitem a rozvojem AD. Vysoká hladina glukosy v krvi má navíc kvůli procesu neenzymové glykace a oxidačního stresu jednoznačně negativní účinek na nervové buňky[26]. Zde ale spojitost není tak jasná jako u ApoE a věku, jelikož některé z morfologických změn, které byly nalezeny v mozkové tkáni osob trpících současně kardiovaskulárním onemocněním nebo DM2 a AD, mohou být pouze společným

symptomem, nikoliv příčinou a následkem. Výstupy studií na toto téma se různí a některé tuto teorii vyvrací[27].

### 3.3.5 Kvalita spánku

Nedávná studie (2020) poukazuje na souvislost mezi hladinou  $A\beta$  fragmentů a  $\tau$ -proteinu a délkou, kvalitou spánku. Závislost platí obousměrně, tedy při nekvalitním spánku s častější fragmentací (delším časem bdělosti) se zvyšuje tvorba a zhoršuje odplavování patologických proteinů. A naopak u pacientů s AD, u nichž se proteiny začnou deponovat, většinou dochází ke zhoršení kvality spánku[28].

## 3.4 Diagnostika AD

AD je nemoc průběžně progredující a ke zhodnocení momentálního stavu se nejčastěji využívá testu MMSE (mini mental state examination). MMSE zahrnuje otázky na orientaci v prostoru a čase, paměť, pozornost a soustředění[29].

Druhým hojně využívaným testem je Test kreslení hodin, alternativní diagnostické testy zahrnují např. ADAS-Cog a nebo jednoduchý orientační nástroj k časnému záchytu poruchy v psaném pojmenování a paměti – český test POBAV (test Pojmenování OBRÁZKŮ A jejich Vybavení)[2,30].

Kromě kognitivních testů se při AD využívají i biologické markery, jako například pomocí MRI nebo CT zjištěná atrofie amygdaly nebo hipokampu spojená se zvětšením mozkové komory a abnormální proteiny nebo změna jejich poměrů v mozkomíšním moku ( $\tau$ -protein, hyperfosforylovaný  $\tau$ -protein nebo  $A\beta$ -fragmenty). Pro určení diagnózy AD je také důležitý průběh kognitivní deteriorace, který má být pozvolný, plynulý bez větších výkyvů[2].

## 3.5 Prevence

K teorii, že zřejmě existuje způsob, jak bránit projevům AD vede také The Nun Study – unikátní studie zahájená v 90. letech minulého století. Zapojilo se do ní 678 jeptišek katolického řádu School Sisters of Notre Dame, které se každoročně podrobují testům



stanovujícím jejich kognitivní i fyzické schopnosti, všechny jeptišky také souhlasily s darováním svého mozku po smrti pro účely zkoumání. Studie přišla s velice zajímavým objevem, a sice, že značná část jeptišek s mírnými neurodegenerativními změnami na mozku (58 %), třetina (32 %) se středně závažnými změnami a nejpřekvapivěji také 8 % z jeptišek s velmi závažnou neurodegenerací mozku, nejevilo žádné nebo pouze mírné známky kognitivního úpadku navenek. Z toho tedy plyne, že tělo těchto jeptišek se s morfologickými změnami v mozku muselo nějakým způsobem vyrovnat a nějakým způsobem je vykompenzovat. Zatím není jasné, o jaký mechanismus přesně jde, ale studie formulovala teorii o tzv. kognitivní rezervě[31]. Rezerva může být chápána buď jako pasivní komodita, tzv. mozková rezerva, která je vyjádřena jako rozsah poškození mozku, které může daný člověk utřít, než se dosáhne prahu, po němž už se začne poškození manifestovat klinicky. Druhý pohled bere rezervu jako aktivní vlastnost mozku, tzv. kognitivní rezervu. Podle něj mozek po vzniklém poškození využívá kompenzační mechanismy, nespolehá tedy pouze na vyšší počet synapsí, ale na celkovou schopnost mozku je využít a případně obejít jiným zapojením, než za 100% zdravého stavu. Toto chápání by nabídlo uspokojivé vysvětlení mnoha studiím, které poukázaly, že někteří lidé mohou utrpět poměrně značné poškození mozku, aniž by se u nich objevily klinické projevy. Navíc tyto 2 teorie nemusí fungovat odděleně, je možné, že se uplatňuje jak pasivní, tak aktivní rezerva. Aktivní rezerva pravděpodobně souvisí s vysokým vrozeným IQ, se vzděláváním nebo s mentální náročností vykonávaného povolání anebo volnočasových aktivit[32].

## 3.6 Terapie

### 3.6.1 Behaviorální a psychologické potíže

Co se týče jiných než kognitivních projevů AD, ve většině případů je snaha bránit těmto příznakům nefarmakologicky. Při poruchách spánku se nejprve zkoumá, jestli v režimu pacienta neexistuje příčina spánkové poruchy jiná než právě AD – nevhodná léčiva (benzodiazepiny, neuroleptika, antiparkinsonika...) nebo jejich načasování (diuretika večer), probíhající infekce (zvláště respiračního nebo močového systému), nevhodný denní režim – málo podnětů, pacient se nudí a pospává, nebo naopak třeba sledování akčních filmů před

spaním, dále například neléčená deprese, gastroesofageální reflux či jiné somatické či duševní onemocnění. Tato příčina se v ideálním případě odstraní a zavede se vhodná spánková hygiena. Pokud tato opatření nezaberou, volí se farmakoterapie v podobě tlumivých antidepresiv mirtazapinu nebo trazodonu[9].

Při agresi se volí nejčastěji tiaprid nebo melperon, možná jsou také antipsychotika II. generace nebo v případě potřeby injekční aplikace haloperidol. U depresí nebo agitovanosti jsou léčivými volby SSRI (selektivní inhibitory zpětného vychytávání serotoninu), případně trazodon, při úzkostech totéž a navíc buspiron, pokud jde o akutní a krátkodobé řešení vyjaté situace, je vhodný zejména ve stáří např. oxazepam[33].

### 3.6.2 Aktivity denního života

Kromě farmakoterapie se může uplatnit také kognitivní rehabilitace, která bývá nejčastěji využívána při mozkových traumatech, nicméně ukazuje se, že nese výsledky i v případě neurodegenerativních onemocnění. Změny k lepšímu jsou patrné nejen z psychotestů, ale jsou dokonce prokazatelné pomocí zobrazovacích technik. V případě pacientů s AD většinou nedochází k posunu v oblasti psychometrie (např. znalosti, mentální výkonnost, schopnost úsudku), ale zlepšení je patrné v oblasti pacientova zvládnání každodenních aktivit, což vede ke zlepšení kvality života pacienta i jeho pečující osoby, nicméně ne všichni odborníci považují pozitivní vliv této metody za prokázaný[34].

### 3.6.3 Kognitivní deteriorace

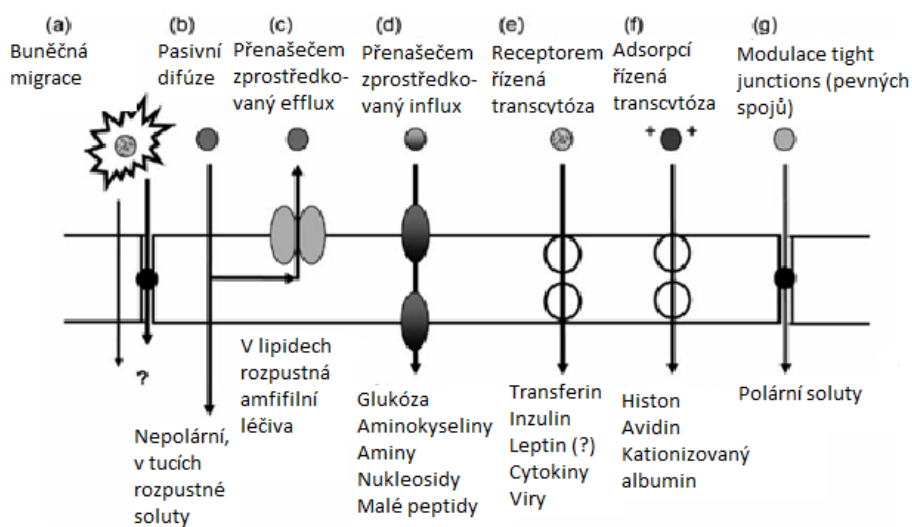
Těžištěm léčby kognitivních příznaků AD jsou inhibitory cholinesteras – v ČR jsou registrovány přípravky s účinnými látkami v různých lékových formách (donepezil – potahované tablety a orodispergovatelne tablety; rivastigmin – orodispergovatelne tablety, kapsle, perorální roztok a transdermální náplasti; galanthamin – kapsle s prodlouženým uvolňováním)[35].

Další terapeutickou možností je zejména u těžších forem demence memantin, nekompetitivní antagonist NMDA receptorů, působící na úrovni glutamatergní transmise. Dále se zkoušela využít nootropika nebo standardizovaný extrakt z *Ginkgo biloba*. Tento mechanismus (zvýšené prokrvení mozku) se uplatňuje u vaskulárních demencí, i tam je však

jejich účinnost sporná[36].

### 3.7 Průchod látky přes hematoencefalickou bariéru

Pro každé léčivo je důležitý údaj o jeho schopnosti projít přes hematoencefalickou bariéru (HEB) – u léčiv, které ovlivňují centrální nervový systém je pro jejich účinek tato schopnost nezbytná, naopak u léčiv působících na periférii je nežádoucí. Pro predikci průchodu látky přes HEB bylo vynalezeno několik metod, které můžeme rozdělit na metody *in vivo*, *in vitro* a *in silico*. Látky mohou procházet přes HEB několika způsoby, které ukazuje obrázek níže. Obecně lze říct, že lipofilní látky projdou pasivní difúzí, ostatní jsou odkázány na specifické přenašeče (např. pro glukosu nebo aminokyseliny). Příliš velké molekuly mohou za specifických podmínek procházet také vezikulárním transportem. Průchodu přes HEB naopak brání efluxní mechanismy (např. P-glykoprotein) nebo enzymy produkované endoteliálními buňkami tvořící metabolickou obranu mozku[37].



Obrázek 4 Způsoby přechodu přes HEB (upraveno) [37]

*In vivo* modely (většinou hlodavci) se využívají standardně ve farmakokinetických studiích a udává se poměr koncentrací v mozku:plazmě ( $\log_{BB}$ ). K tomuto stanovení je ale zapotřebí větší množství pokusných zvířat, dalším negativem je časová náročnost. Dosažené koncentrace se v čase mění, proto se někdy  $\log_{BB}$  vyjadřuje s využitím plochy pod křivkou. Dalším hojně využívaným *in vivo* měřením je metoda „permeability-surface area product“[38].

*In vitro* modely využívají izolované mozkové kapiláry pěstované na tkáňových kulturách, z nichž se získají monovrstvy mozkových endoteliálních buněk[37]. Existují také nebuněčné modely: IAM (immobilised artificial membrane) a PAMPA (parallel artificial membrane permeability assay). Tyto modely membrán jsou levnější než buněčné modely. Model IAM si můžeme představit jako HPLC kolonu, která napodobuje biologickou membránu, jejíž vlastnosti chceme zkoumat[38]. Model PAMPA vznikne tak, že se nasytí vysoce porózní filtr lipofilním roztokem. Podle toho, jaké složky jsou použity k přípravě tohoto olejového roztoku, se vytváří membrány s různými vlastnostmi a PAMPA má využití i za jiným účelem než zjišťování permeace skrz HEB[39]. Původní model PAMPA byl vyvinut k predikci absorpce po *p.o.* podání. Modifikací této membrány za účelem napodobení HEB bylo impregnování jiným lipofilním roztokem – extrakt z tkáně prasečího mozku v *n*-dodekanu[40].

Mezi další využitelné modely napodobující lidskou HEB jsou HEB octomilky obecné (*Drosophily melanogaster*)[41] nebo sarančete stěhovavého (*Locusta migratoria*)[42]. Překvapivě HEB těchto hmyzích druhů má velice podobné vlastnosti lidské HEB, dokonce byla prokázána přítomnost homologních proteinů fungujících podobným způsobem jako transportéry xenobiotik u savců. To napovídá, že funkce HEB zůstaly během evoluce zachovány[41].

*In silico* metody využívají počítačové programy, jejichž algoritmy počítají schopnost permeability dané molekuly na základě jejích vlastností. Tyto parametry mohou být např.: LogP, molekulová hmotnost, počet donorů nebo akceptorů vodíkových můstků, polarizovatelnost, počet atomů kyslíku, dusíku nebo počet vazeb atomu vodíku ke kyslíku nebo dusíku[43].

### 3.8 *Papaver rhoeas* L. (mák vlčí)

#### 3.8.1 Taxonomické zařazení

Magnoliophyta - krytosemenné rostliny

- Rosopsida - vyšší dvouděložné
  - Ranunculales-pryskyřníkotvaré
    - Papaveraceae-mákovité
      - *Papaver* L. – mák
        - *P. rhoeas* L. – mák vlčí[44]

#### 3.8.2 Botanický popis, použití, toxicita

Mák vlčí je bylina rostoucí hojně jako plevel – často se uchytlí na okrajích polí, podél cest nebo železničních kolejí, na zbořeništích. Původně rozšířen v Evropě, Severní Africe a v oblasti Malé Asie (mimoevropská část Turecka), ale v současnosti roste kosmopolitně – po celé Evropě kromě chladných severních oblastí, v Severní Americe, v Austrálii i na Novém Zélandu, v Číně a dalších oblastech Asie. Nejlépe se mu daří v nížinách, ve vyšších polohách se objevuje vzácněji nebo vůbec[45]. Výška lodyhy může být od pouhých 20 cm až po 90 cm (některé zdroje uvádí o něco méně, cca 50 cm). Typické je husté ochlupení celé nadzemní části rostliny. Listy v dolní části byliny se napojují na lodyhu řapíkem, horní jsou přisedlé, tvarem čepele jsou peřenodílné až peřenosečné. Po narušení pletiva roní rostlina bílý latex[45,46]. Doba květu je od května do srpna. Kveté charakteristickým jasně červeným květem tvořeným 4 korunními lístky, které mívají na bázi tmavou skvrnu. Plod máku vlčího je makovice – tobolka[45,46].

Lékopisnou drogou je květ, *Papaveris rhoeados flos*, který se používá díky obsaženým anthokyanům jako korigens barvy. Dále má také účinky mírně sedativní a antitusické. Je oblíbený i v lidovém léčení[47,48].

Mák vlčí nepatří mezi významně jedovaté rostliny. K intoxikaci by mohlo dojít zřejmě pouze po požití značného množství drogy a pravděpodobně by se projevila zvracením, bolestí břicha a také křečemi, případně kontaktní dermatitidou po styku latexu s kůží (např. jako u *P. dubium*) [49].



Obrázek 5 *Papaver rhoeas* – foto vlastní

### 3.8.3 Obsahové látky

#### 3.8.3.1 Nealkaloidní látky

*Papaver rhoeas* patří mezi rostliny, které byly poměrně zeširoka zkoumané i díky tomu, že mák vlčí se řadí mezi rostliny využívané tradičně v lidovém léčitelství, jde o snadno rostoucí nenáročnou rostlinu vyskytující se kosmopolitně. Při zjišťování obsahu látek

využitelných jako zdroj potravy byla v *P. rhoeas* nalezena jako hlavní složka kyselina glycerová, dalšími detekovanými látkami v extraktu byly jiné organické kyseliny (citronová, mravenčí, jantarová, šikimová, malonová a jablečná) a aminokyseliny (leucin, isoleucin, alanin, valin, prolin a  $\gamma$ -aminomáselná kyselina). Dále byly v extraktu prokázány sacharidy (glukosa, sacharosa a rhamnosa) a také mastné kyseliny (nejčastěji kyselina stearová, palmitová a také olejová)[50].

Z prokázaných flavonoidů jsou kvantitativně nejčastěji zastoupeny metabolity kvercetinu a myricetinu, ve výrazně menší míře jsou přítomny kempferol, luteolin, apigenin a isorhamnetin[51].

### 3.8.3.2 Alkaloidy

Mezi nejvýznamnější obsahové sloučeniny rostliny patří bezesporu alkaloidy. Význam obsahu alkaloidů spočívá nejen v jejich potenciálním využití, ale jejich obsah může také pomoci rozlišit jednotlivé druhy rostlin[52].

Výsledky studií se od sebe odlišují, nicméně většinou se opakují v extraktech tytéž alkaloidy a studie se různí v tom, který z alkaloidů je považován za majoritní a které za vedlejší podle jejich nalezeného množství v daném vzorku. Záleží zřejmě nejen na době sběru a sbírané rostlinné části, ale také na lokalitě a v rámci druhu *P. rhoeas* existuje více chemotypů[53].

Alkaloidy vyskytující se v *P. rhoeas* patří do skupiny isochinolinových alkaloidů. Jedná se o alkaloidy, jejichž syntéza vychází z aminokyselin tyrosinu anebo fenylalaninu[54]. Přeměnou aminokyseliny vzniká meziproduct *R*- nebo *S*-retikulin, z něhož dalšími kroky vznikají jednotlivé podtypy isochinolinových alkaloidů[55]. Isochinolinové alkaloidy byly v rostlinách nalezeny kromě čeledi Papaveraceae také v čeledích Cactaceae, Annonaceae, Berberidaceae, Euphorbiaceae, Menispermaceae a Ranunculaceae[56].

Isochinolinové alkaloidy v čeledi Papaveraceae se dělí do několika strukturních podtypů: jednoduché isochinolinové, benzylisochinolinové, proaporphinové, aporphinové, morfinanové, promorfinanové, protoberberinové, ftalidisochinolinové, protopinové a rhoeadinové[57]. Ne všechny podtypy najdeme v *P. rhoeas*.

Za hlavní alkaloidy *P. rhoeas* jsou považovány: (+)-rheadin, rheagenin[58,59] a *N*-methylassimilobin[53]. Minoritní alkaloidy jsou řazeny např. isorhoeadin, isorhoeagenin, protopin nebo papaverrubinové alkaloidy, některé studie zmiňují také allokryptopin, koptisin, (+)-roemerin, sanguinarin, stylopin, sinaktin, berberin nebo kulteropin[53,58,60].

V rámci druhu *P. rhoeas* existují různé chemotypy, podle lokality růstu. Příkladem je kultivar rostoucí v Libanonu, z něhož byl poprvé v rodu *Papaver* izolován epiberberin a také kanadin, prvně identifikovaný u *P. rhoeas*[61]. Dalším příkladem je *P. rhoeas* var. *chelidonioides*, v němž hlavními alkaloidy jsou rheadin a koptisin – koptisin způsobuje žluté zbarvení latexu (latex v *P. rhoeas* je tradičně bílý)[62].

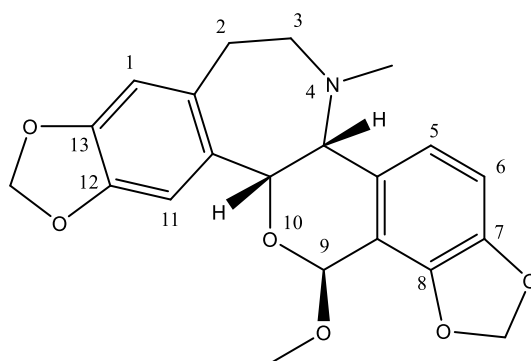
Isochinolinové alkaloidy jsou předmětem zájmu, protože se mezi nimi našly látky s terapeuticky využitelnými účinky. Příkladem mohou být bolest tlumící morfin, antitusický kodein nebo AChE inhibující galanthamin. Další účinky, které byly prokázány u isochinolinových alkaloidů jsou antibakteriální, antifungální, antivirotické, antiparazitické, antioxidační nebo protizánětlivé nebo antineoplastické[63].

#### 3.8.3.2.1 Rheadinové alkaloidy

Rheadinové alkaloidy jsou typickými zástupci alkaloidů objevujících se v *P. rhoeas* a v dalších rostlinách čeledi Papaveraceae. Hlavním alkaloidem je rheadin, sloučenina s tetrahydro-3-benzazepinovou kostrou spojenou s isochromanem obsahujícím acetalový nebo hemiacetalový uhlík – benz[d]isochromano[4,3-b]azepin (Obrázek 6). Všichni zástupci mají kyslíkatý substituent na C-7, C-8, C-12 a C-13. Strukturně velmi podobné jsou tzv. papaverrubinové alkaloidy (norrheadiny – odvozeny *N*-demethylací rheadinu nebo isorhoeadinu[64]), které získaly označení díky své barvě – v kyselém prostředí (pH roztoku <3) se zbarvují do výrazné červené. Zjištění jejich struktury bylo dlouho problematické kvůli jejich nestabilitě. Nicméně jsou velmi snadno chromatograficky detekovatelné a to i v nízkých koncentracích právě díky specifickému a jasně viditelnému zbarvení[65].

Z rheadinových alkaloidů nacházíme v *P. rhoeas* rheadin, papaverrubiny A,B,C a D, rheagenin, glaukamin, isorhoeagenin, isorhoeadin, isorhoeagenin-D-glukosid [65].



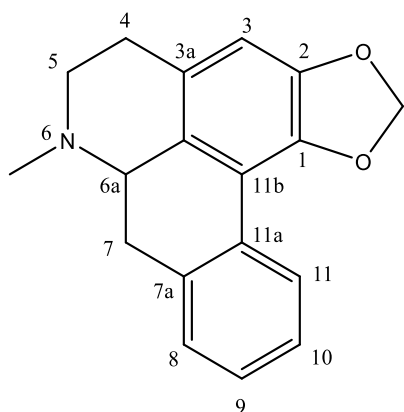


Obrázek 6 Rhoedin

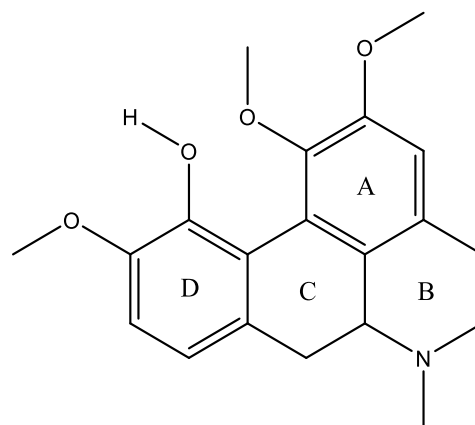
Rhoedin i papaverrubiny jsou biosynteticky odvozeny od protopinu (mohou vznikat z protopinu, kryptopinu nebo muraminu). Oproti tomu relativně často se objevující protopinový alkaloid allokryptopin nemá mezi rhoedinovými alkaloidy svůj analog[66].

### 3.8.3.2.2 Aporfinové alkaloidy

Aporfinové alkaloidy jsou jednou z nejčastěji se vyskytujících podskupin benzylochinolinových alkaloidů. Jejich struktura obsahuje tetracykl; ze 4 kruhů jsou 2 aromatické a v poloze 6 se nachází dusík.



Obrázek 7 Roemerin



Obrázek 8 Isokorydin

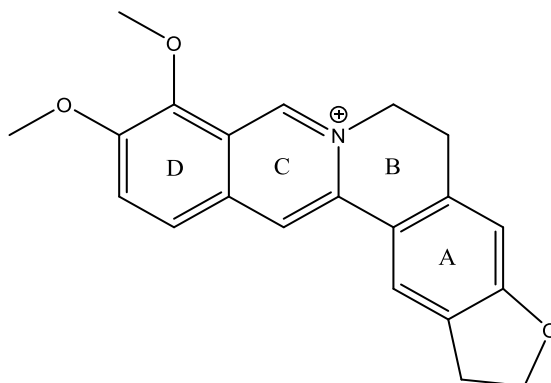
Uhlík v poloze C-6a je chirální, a proto vykazují aporfinové alkaloidy optickou aktivitu. Přirozeně se vyskytující aporfiny mívají v polohách C-1 a C-2 hydroxy-, methoxy- nebo methylenedioxy substituenty[67]. Mezi zástupce tohoto alkaloidního typu v *P. rhoeas* patří *N*-methylasimilobin, (+)-isokorydin a (+)-roemerin.

Roemerin a některé další aporfinové alkaloidy vykazují poměrně silnou inhibiční aktivitu vůči AChE[68]. Aporfiny, izolované z rostlin rodu *Papaver*, mohou ovlivňovat/působit na rozličné cíle v nervové soustavě:  $\tau$ -protein nebo transportéry pro noradrenalin, dopamin a serotonin, podmínkou je, aby kruh C nebyl substituovaný a na kruhu A nebyl navázán dioxolanový kruh[57].

### 3.8.3.2.3 Protoberberinové alkaloidy

V čeledi Papaveraceae byly nalezeny tyto alkaloidy protoberberinového typu: berberin, epiberberin, stylopin, koptisin, sinaktin a mekambrin[64].

Mezi nejstudovanější alkaloidy tohoto strukturního typu patří berberin (obr. 11). Ve vztahu k AD vykazuje žádoucí aktivitu na několika úrovních: působí inhibičně na AChE i BuChE, snižuje tvorbu A $\beta$ , funguje jako „scavenger“ volných radikálů, působí protizánětlivě a snižuje hladinu cholesterolu. V terapeutických dávkách nevykazoval toxicitu a prochází přes HEB[69,70].



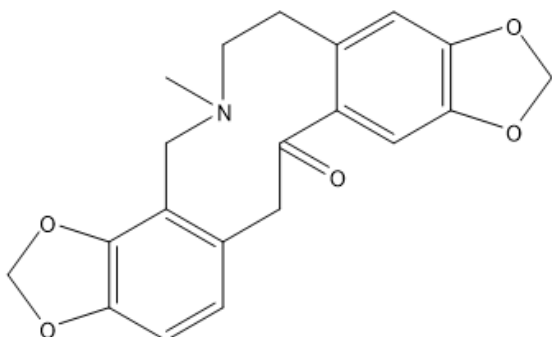
Obrázek 9 Berberin

Strukturním znakem zodpovědným za afinitu a aktivitu vůči cholinesterasám je dehydrogenace kruhu C (protoberberiny se rovněž řadí mezi tetracykly s kruhy A–D). Alkaloidy s nasyceným kruhem C tuto aktivitu nemají nebo je u nich výrazně snížena[57].

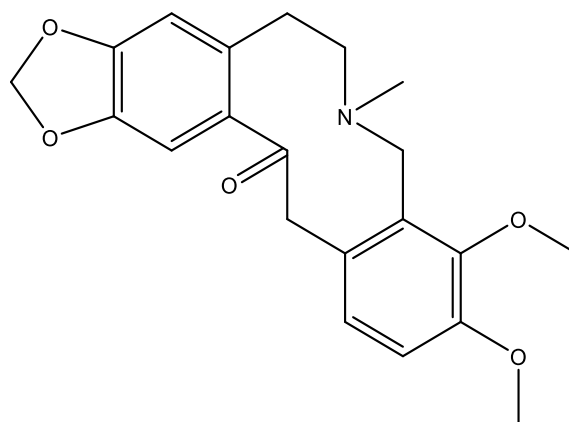
### 3.8.3.2.4 Protopinové alkaloidy

Další podskupinou isochinolinových alkaloidů jsou protopinové alkaloidy, jejichž výskyt je spojován s rostlinami z čeledí Papaveraceae, Berberidaceae, Rutaceae

a Ranunculaceae[71]. Z alkaloidů izolovaných z *P. rhoeas* sem náleží protopin, allokryptopin a kulteropin.



Obrázek 10 Protopin

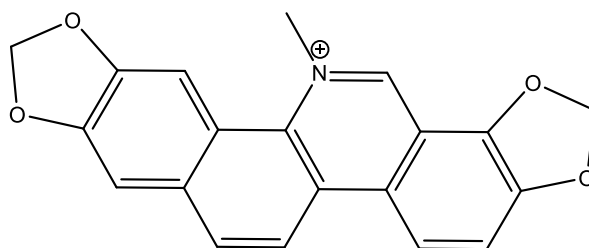


Obrázek 11 Allokryptopin

Jde o tricyklické alkaloidy, které mohou vykazovat cholinergní účinky, pokud mají vhodně umístěný dioxolanový kruh (allokryptopin)[57].

#### 3.8.3.2.5 Benzofenanthridinové alkaloidy

Benzofenanthridinové alkaloidy nejsou tolik rozšířené, byly identifikované v čeledích Papaveraceae, Rutaceae, Caprifoliaceae a Meliaceae. Alkaloidem z *P. rhoeas* z této skupiny je sanguinarin[72].



Obrázek 12 Sanguinarin

#### 3.8.4 Účinky alkaloidů identifikovaných v rodu *Papaver*

##### 3.8.4.1 Cholinesterasy

Inhibice cholinesteras, především AChE, je v současnosti základem terapie AD. Jak již bylo zmíněno výše, poměry cholinesteras se v mozku pacientů s demencí mění

ve prospěch BuChE[20]. Zdá se, že u alkaloidů je důležité, aby jejich dusík byl kvartérní, pak mají dobrou vaznost k cholinesterasám. Nevýhodou tohoto strukturního znaku je obtížná permeace přes HEB[73]. AChE inhibují např. berberin, koptisin, sanguinarin[74], protopin, allokryptopin[75] a stylopin[76].

#### 3.8.4.2 *Prolyloligopeptidasa*

Kromě cholinesteras se pozornost zaměřuje také na další enzym: prolyloligopeptidasu (POP). Jde o serinovou cytosolickou peptidasu, která štípe aminokyselinu prolin z C-konce. Její aktivita se odráží v několika funkcích, mezi které patří i přenos signálu v buňkách, paměť a učení. Látky s vlivem na aktivitu tohoto enzymu by tedy mohly být přínosné např. v terapii schizofrenie, bipolární poruchy a také AD. Experimenty na zvířatech ukázaly, že inhibitory POP vedly ke zlepšení kognitivních funkcí a neuroprotekcí[77]. Aktivita proti POP byla potvrzena u berberinu, který někdy bývá dokonce využíván jako standard[73,78] a dále také u sinaktinu[22].

#### 3.8.4.3 *Antiagregace A $\beta$ fragmentů*

Účinek, který zmírňuje rozvoj AD, je i inhibice agregace A $\beta$ <sub>1-42</sub> fragmentů. Z alkaloidů vyskytujících se v rodu *Papaver* byla tato schopnost potvrzena u berberinu[79].

#### 3.8.4.4 *Antioxidační aktivita*

Jak bylo rozebráno v kapitole 3.2 Etiopatogeneze, produkce ROS hraje v rozvoji AD značnou roli. Proto mají látky s antioxidačním účinkem potenciál podílet se na terapii AD. Z alkaloidů nalezených v *P. rhoeas* tuto aktivitu nese koptisin[80], berberin[69] a pravděpodobně také roemerin[81].

#### 3.8.4.5 *Protizánětlivé účinky*

Jelikož bývá AD spojována se sterilním zánětem, dalším potenciálním terapeutickým směrem by mohlo být jeho potlačování. Zástupci isochinolinových alkaloidů, u nichž byla protizánětlivá aktivita zaznamenána, jsou berberin, sanguinarin a protopin[82].

# 4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

## 4.1 Materiál a vybavení

### 4.1.1 Rozpouštědla a chemikálie

- benzín lékařský, lékopisné kvality (Ing. Švec – Penta, Praha), (LB)
- dichlormethan (Ing. Švec – Penta, Praha), ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ )
- ethyl-acetát (Ing. Švec – Penta, Praha) (EtOAc)
- methanol HPLC kvality (Ing. Švec – Penta, Praha), ( $\text{CH}_3\text{OH}$ )
- isopropanol p.a. (Ing. Švec – Penta, Praha), (IPA)
- vodný roztok amoniaku 25% (Ing. Švec – Penta, Praha), ( $\text{NH}_4\text{OH}$ )
- cyklohexan p.a. (Ing. Švec – Penta, Praha) ( $\text{C}_6\text{H}_{12}$ )
- diethylamin p.a. (Ing. Švec – Penta, Praha), ( $\text{Et}_2\text{NH}$ )
- chlorid rtuťnatý p. a. (Fisher Scientific, Pardubice) ( $\text{HgCl}_2$ )
- dusičnan bismutitý zásaditý (Lachema, Brno)
- jodid draselný č. (Lach-Ner, Neratovice)
- kyselina vinná p. a. (Balex, Pardubice)
- methanol LC-MS (VWR Chemicals, Stříbrná Skalice), ( $\text{MeOH}$ )
- kyselina mravenčí  $\geq 99$ , LC-MS kvality (VWR Chemicals, Stříbrná Skalice), ( $\text{HCOOH}$ )
- deuterizovaný chloroform pro NMR analýzu (Sigma Aldrich, Praha) ( $\text{CDCl}_3$ )
- síran sodný bezvodý p. a. (Ing. Švec – Penta, Praha) ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ )
- destilovaná voda

### 4.1.2 Pomocné látky

- křemelina Celite C 535 (Sigma Aldrich, Praha)
- sušící perly silikagelu (Ing. Švec – Penta, Praha)

### 4.1.3 Chromatografické adsorbenty

- analytické TLC desky silikagel 60 F<sub>254</sub> (Merck Millipore, Praha), 20 × 20 cm, vrstva 200  $\mu\text{m}$ .
- silikagel 60 GF<sub>254</sub> pro preparativní TLC (Merck Millipore, Praha)

- silikagel 60 15  $\mu\text{m}$  (Interchim, Chromservis, Praha)
- oxid hlinitý neutrální HPLC flash grade 32–63  $\mu\text{m}$  (Alfa-Aesar, Termofisher Scientific, Pardubice)

#### 4.1.4 Přístrojové vybavení

- Plynový chromatograf s hmotnostní detekcí (GC-MS) Agilent (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Systém obsahuje chromatograf Agilent 7890 A s hmotnostním detektorem Agilent 5975 C MSD pracujícím v režimu elektronové ionizace při 70 eV (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)
- Flash chromatografický systém BÜCHI Sepacore flash system X10 skládající se z řídicí jednotky Büchi C-620, sběrače frakcí Büchi C-660, detektoru UV C-640 a pumpy Büchi C-605 (Büchi, Švýcarsko). K ovládní systému se používá PC s programem SepacoreControl 1.2. (Büchi, Švýcarsko).
- Preparativní/analytický HPLC Waters Autopurification system (Waters Corporation, Milford, USA). Přístroj se skládá z tohoto přístrojového vybavení: automatické dávkovací zařízení připojené ke sběrači frakcí Waters Sample Manager 2767, kolonový selektor System Fluidics Organizer, binární gradientová pumpa Waters 2545, detektor s diodovým polem Waters 2998 a hmotnostní spektrometr Waters Acquity qDa s ionizací elektro-sprejem. Kolona XSelect<sup>®</sup> CSH<sup>™</sup> C18 OBD<sup>™</sup> (100 mm x 4,6 mm, vel. částic 5  $\mu\text{m}$ ) (Milford, USA)
- Vakuová odparka Büchi Rotavapor R-114 (Büchi, Flawil, Švýcarsko)
- Spektrometr Varian VNMR S500 (Varian, Palo Alto, California, USA)
- Polarimetr P3000 (A. Krüss Opteronic, Hamburg, Německo)
- Merck Millipore (Milford, MA, USA)
- Ultrazvuková lázeň Sonorex Super 10P (Bandelin, Berlin, Německo)
- Magnetická míchačka Heidolph Mr Hei-Standard (Heidolph, Schwabach, Německo)
- Exsikátor

#### 4.1.5 Kolony a kartridže pro flash chromatografii

- PP kartridže 40 x 150 mm (Büchi, Švýcarsko)
- skleněná předkolona 100 x 26 mm (Büchi, Švýcarsko)

- skleněné kolony 15 × 125 mm a 15 × 250 mm (YMC, Chromservis, Praha)

#### 4.1.6 Směsi k vyvíjení TLC

- S1 (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub> + EtOAc + Et<sub>2</sub>NH; 45:45:10)
- S2 (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub> + EtOAc + Et<sub>2</sub>NH; 85:10:5)
- S3 (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub> + EtOAc + Et<sub>2</sub>NH; 90:10:5)
- S4 (MeOH + NH<sub>4</sub>OH 0,1%)
- S5 (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub> + Et<sub>2</sub>NH; 97:3)

#### 4.1.7 Detekční činidla

- Dragendorffovo činidlo dle Muniera

(Zásobní roztok byl připraven z roztoků A a B v poměru 1:1. Roztok A byl připraven rozpuštěním 1,7 g zásaditého dusičnanu bismutitého a 20 g kyseliny vinné v 80 ml destilované vody. Roztok B obsahoval 32 g jodidu draselného ve 40 ml vody. Detekční činidlo pro postřik vzniklo smísením 10 g kyseliny vinné rozpuštěné v 50 ml destilované vody a 5 ml zásobního roztoku. Činidlo poskytuje pozitivní reakci na alkaloidy vznikem oranžově zabarvených skvrn na TLC. Připravený roztok se uchovával při 2–8 °C)

## 4.2 Pracovní postupy

### 4.2.1 Příprava a čištění rozpouštědel

Komerčně používaná rozpouštědla pro chromatografii byla před použitím čištěna destilací, pokud nebyla HPLC kvality a vyšší. Destilace probíhala podle standardních postupů a hlavní frakce byly jímány podle teploty varu daných rozpouštědel.

### 4.2.2 Odpařování výtřepků, jednotlivých frakcí

Frakce získané ze separace flash chromatografií a preparativní TLC byly odpařeny na rotační vakuové odparce Büchi Rotavapor R-114 na vodní lázni do 50 °C.

#### 4.2.3 Sušení extraktu, frakcí, izolovaných čistých látek a jejich skladování

Jednotlivé frakce získané ze separace flash chromatografií a preparativní TLC a následně chemicky čisté izolované látky byly vysoušeny v exsikátoru (vakuum cca 1,33 kPa) nad silikagelovými perlami po dobu minimálně 24 hodin. Frakce a čisté izolované alkaloidy byly následně uskladněny v lednici při 2–8 °C.

#### 4.2.4 TLC detekce

Pro zjištění přítomnosti alkaloidů ve frakcích získaných flash chromatografií nebo čistoty izolovaných alkaloidů se používala detekce v oblasti UV světla (chromatogram pozorován pod UV lampou při  $\lambda = 254$  a  $366$  nm), následovaná postřikem Dragendorffovým činidlem dle Muniera.

#### 4.2.5 Příprava litých vrstev pro preparativní TLC

Suspenze pro nalévání litých skleněných desek pro preparativní TLC se připravila smísením a homogenizací silikagelu Kieselgel 60 GF<sub>254</sub> (6,5 g) s destilovanou vodou (20 ml). Takto připravená suspenze byla nanášena na skleněné desky (15 × 15 cm), které byly před nanášením suspenze očištěné EtOH a CHCl<sub>3</sub>. Lité TLC desky se nechaly schnout nejméně 24 hodin před použitím.

#### 4.2.6 Flash chromatografie

##### 4.2.6.1 Deaktivace adsorbentů

Pro flash chromatografii se nejčastěji používají plně aktivní adsorbenty. Pro separaci na silikagelu 60 15  $\mu\text{m}$  byla ale provedena deaktivace adsorbentu 25% vody (nastavení aktivity silikagelu na stupeň IV podle Brockmana). K odváženému množství adsorbentu (25 g) se postupně přidalo vypočtené množství vody a silikagel se nechal promíchávat na magnetické míchačce po dobu 60 minut. Podobný způsob modifikace aktivity adsorbentu byl použit i u neutrálního Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (32–63  $\mu\text{m}$ ), ke kterému bylo přidáno 6 % vody.



#### 4.2.6.2 Příprava suchého vzorku (roztěru) do předkolony

Výtřepek/frakce byly rozpuštěny v  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  (1:1) a smíchány s dvojnásobným množstvím silikagelu nebo čtyřnásobným množstvím oxidu hlinitého k hmotnosti frakce/výtřepku. Na přípravu roztěru byl použit adsorbent stejné kvality jako pro následnou separaci. Odpařením rozpouštědel na vodní lázni při 60 °C za stálého míchání došlo k adsorpci směsi alkaloidů na chromatografické adsorbenty. Připravené roztěry byly dosušeny v exsíkátoru za sníženého tlaku po dobu 24 hodin.

#### 4.2.6.3 Plnění skleněné kolony/HP kartridže pro flash chromatografii

Kartridže/kolony se plnily nasypáním požadovaného množství daného adsorbentu za občasného sklepaní. Před samotnou separací bylo provedeno kondicionování kolony mobilní fází odpovídající trojnásobku kolonového objemu.

#### 4.2.7 Strukturní analýza

##### 4.2.7.1 GC-MS analýza

K identifikaci izolovaných alkaloidů byl použit plynový chromatograf Agilent 7890A GC spojený s hmotnostním detektorem Agilent 5975. Analýza probíhala v EI režimu s elektronovou ionizací 70 eV. Látky byly separovány na koloně DP-5 MS (30 m x 0,25 mm x 0,25  $\mu\text{m}$ , Agilent Technologies Santa Clara, California, USA). Nejprve byla teplota nastavena na 100 °C na 1 min, poté teplotní gradient probíhal navyšováním teploty rychlostí 15 °C/min z počáteční teploty 100 °C do teploty 180 °C, na které setrval opět 1 minutu. Následně bylo zvyšování teploty zpomaleno na 10 °C/min až do výše 300 °C, na které zůstala nezměněná 12 minut. Rychlost průtoku nosného plynu helia: 1 ml/min, nástřik vzorku (0,2 mg/ml) o objemu 1  $\mu\text{l}$  byl proveden injektorem nastaveným na teplotu 270 °C při poměru 1:10 („split mode“). Teplota detektoru byla 305 °C a detekční rozmezí m/z 50–500. Identifikace alkaloidů probíhala porovnáním jejich hmotnostních spekter se spektry v knihovně NIST11 (National Institute of Standards and Technology Library, USA) a s daty publikovanými v literárních zdrojích.

#### 4.2.7.2 LC-MS analýza

Alkaloidy (0,2 mg) byly rozpuštěny v 1 ml MeOH (LC-MS kvality) a měřeny systémem Waters Autopurification™. Jako mobilní fáze (MF) byla použita H<sub>2</sub>O s 0,1 % HCOOH (MF A) a MeOH s 0,1 % HCOOH (MF B). Průtok mobilní fáze byl nastaven na 1 ml/min. Eluční program s gradientem byl následovný (v/v): 0 min 5 % MF B, 5 min 100 % MF B, 8,5 min 5 % MF B, poté 1,5 minuty v počátečních podmínkách pro ekvilibraci. Hodnoty parametrů ESI-MS byly následující: kapilární napětí (0,8 kV), teplota próby (600 °C), kuželové napětí (15 V). LC-MS hmotnostní spektra byla detekována v rozmezí 200–800 m/z. Rozsah PDA detektoru byl nastaven od 190 do 700 nm. ESI-MS analýzy probíhaly v kladném iontovém módu.

#### 4.2.7.3 NMR analýza

NMR spektra (<sup>1</sup>H NMR a <sup>13</sup>C NMR) byla naměřena na spektrometru Varian Iniova 500 s pracovní frekvencí 500 MHz pro <sup>1</sup>H a 125 MHz pro <sup>13</sup>C jádra. Měření bylo provedeno při teplotě 25 °C v deuteriochloroformu (CDCl<sub>3</sub>) na katedře organické a bioorganické chemie (doc. PharmDr. Jiří Kuneš), Ph.D. Spektra <sup>1</sup>H byla měřena inverzní 5 mm ID PGF sondou za použití standardních pulzních frekvencí a pro měření <sup>13</sup>C spekter bylo využito 5 mm SW širokopásmové sondy.

#### 4.2.7.4 Měření optické otáčivosti

Optická otáčivost byla měřena v CHCl<sub>3</sub> na polarimetru Automatic P 3000 při 25 °C.

### 4.3 Izolace alkaloidů ze spojeného chloroformového extraktu

#### 4.3.1 Flash chromatografie na Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

Cílem této diplomové práce byla separace alkaloidů ze spojeného výtřepku (CHCl<sub>3</sub> + EtOAc + I<sup>-</sup>) obsahující původní chloroformový (7,62 g), ethyl-acetátový (1,90 g) a výtřepok ve formě jodidů obsahující kvarterní alkaloidy (0,45 g). Přesný popis přípravy alkaloidního sumárního extraktu a jednotlivých výtřepků je popsán v diplomové práci Mgr. Simony Víchové[83]. Spojení CHCl<sub>3</sub> + EtOAc + I<sup>-</sup> výtřepků proběhlo na základě vyhodnocení LC-MS

analýzy a tato spojená frakce se jevila jako velice perspektivní pro separaci alkaloidů s výraznou inhibiční aktivitou vůči BuChE (Tabulka 1).

*Tabulka 1 Cholinesterasová aktivita Et<sub>2</sub>O a spojeného výtřepku*

Analyzované alkaloidní extrakty	% inhibice AChE (50 µg/ml)	% inhibice BuChE (50 µg/ml)
Et <sub>2</sub> O	31,48 ± 1,22	93,84 ± 0,63
<b>CHCl<sub>3</sub> +EtOAc + I<sup>-</sup></b>	<b>41,16 ± 1,52</b>	<b>93,79 ± 0,41</b>

Spojený výtřepok (9,97 g) byl separován flash chromatografickým systémem BÜCHI Sepacore flash system X10 za použití neutrálního Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 32–63 µm (HP kartridž 40 × 150 mm; 200 g), která byla před samotnou separací kondicionována (promyta) trojnásobným kolonovým objemem mobilní fází LB + EtOAc (9:1) s průtokem 40 ml/min. Alkaloidy ve formě „suchého vzorku“ (roztěr 50 g, předkolona 100 × 26 mm) byly separovány stupňovitou elucí nejprve mobilní fází I (LB + EtOAc) po dobu 1 h 30 min podle uvedeného gradientu v Tab. 2 a následně mobilní fází EtOAc + MeOH po dobu 1 h 10 min (Tab. 2). Průtok u obou metod byl nastaven na 40 ml/min, sběr frakcí v průběhu píku byl po 25 ml, sběr frakcí mimo pík probíhal po 50 ml. Detekce alkaloidů probíhala při vlnových délkách 254, 270, 280 a 290 nm. Celkově bylo jímáno 154 frakcí, které byly i pomocí TLC analýzy na silikagelu 60 F<sub>254</sub> (vyvíjecí směs S1, počet vyvíjení 1x, detekce UV + Dragendorffovo činidlo) spojené do 7 frakcí, které byly podrobeny dalšímu screeningu biologické aktivitě – inhibici BuChE (Tab. 3).

Tabulka 2 Eluční gradient chromatografie na  $Al_2O_3$  – MF I a MF II

MF I				MF II			
Start %B	End %B	min	s	Start %B	End %B	min	s
10	10	10	0	98	98	10	0
10	12	0	5	98	95	0	5
12	12	10	0	95	95	10	0
12	15	0	5	95	90	0	5
15	15	10	0	90	90	10	0
15	20	0	5	90	80	0	5
20	20	10	0	80	80	10	0
20	30	0	5	80	60	0	5
30	30	10	0	60	60	10	0
30	45	0	5	60	40	0	5
45	45	10	0	40	40	10	0
45	60	0	5	40	0	0	5
60	60	10	0	0	0	10	0
60	80	0	5				
80	80	10	0				
80	100	0	5				
100	100	10	0				

Total Time: 01:30:40

Total Time: 01:10:30

Tabulka 3 Inhibiční aktivita frakcí získaných z flash chromatografie na neutrálním  $Al_2O_3$

Frakce	Spojené frakce	% inhibice BuChE (50 $\mu$ g/ml)
1	1-23 (LB+EtOAc), 2540 mg	39,40 $\pm$ 0,37
2	24-47 (LB+EtOAc), 3210 mg	63,09 $\pm$ 0,95
3	48-73 (LB+EtOAc) + 1-14 (EtOAc+MeOH), 810 mg	64,47 $\pm$ 1,54
4	15-48 (EtOAc+MeOH), 530 mg	84,90 $\pm$ 0,56
5	49-56 (EtOAc+MeOH) 100 mg	57,82 $\pm$ 1,16
6	57-81 (EtOAc+MeOH), 88 mg	82,00 $\pm$ 0,94
7	eluze kolny (112 mg)	70,22 $\pm$ 0,33

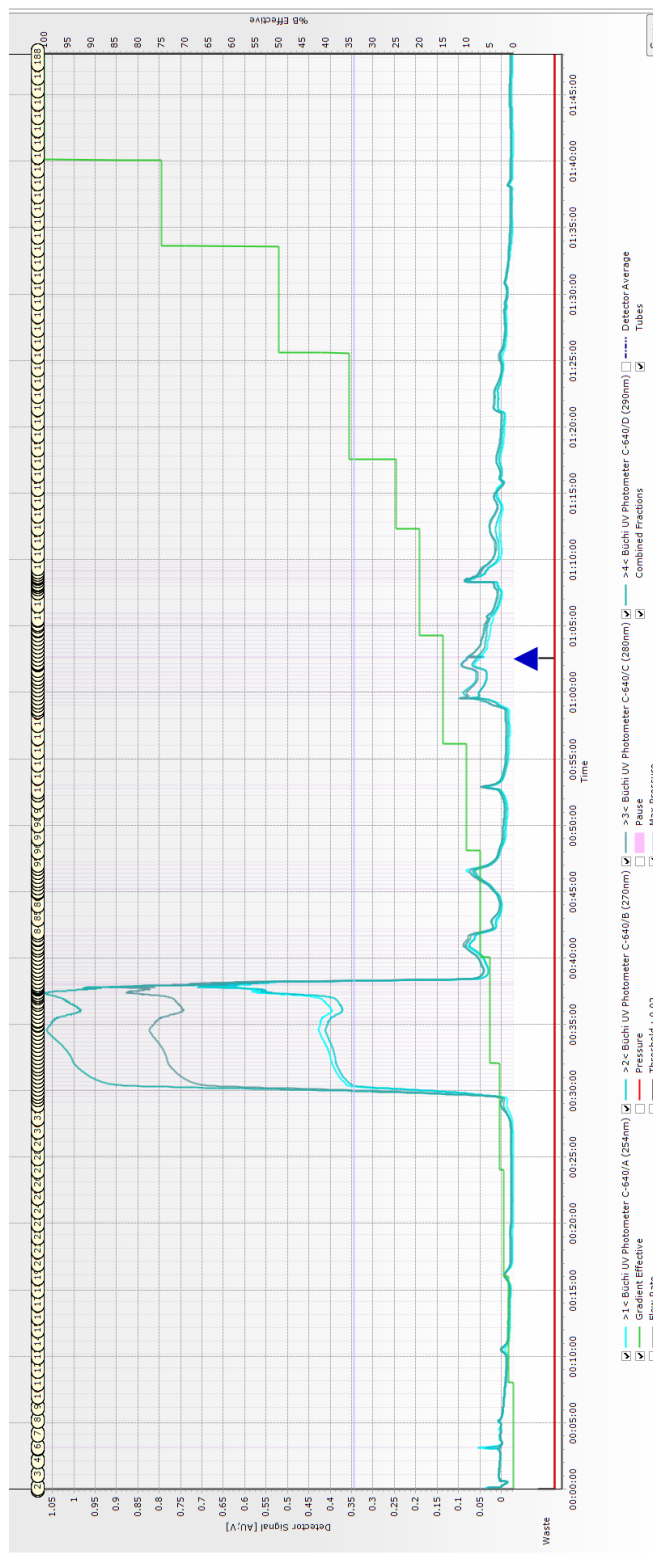
#### 4.3.2 Flash chromatografie na SiO<sub>2</sub>

Na základě LC-MS analýzy a screeningu inhibiční aktivity (Tab. 3) byly frakce 4–7 z předchozí flash separace spojené (830 mg) a tato spojená frakce byla podrobena flash separaci na silikagelu 60 15 µm (skleněná kolona 15 × 250 mm; 25 g), který byl deaktivován přidávkem vody (25 %). Kolona byla kondicionována trojnásobkem kolonového objemu CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> při průtoku 10 ml/min. Separace alkaloidů ve formě roztěru (1,6 g, předkolona 15 × 125 mm) byla provedena mobilní fází skládající se z CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> a MeOH obsahující 0,1 % NH<sub>4</sub>OH), stupňovitý gradient probíhal podle Tab. 4 od dobu 1 h 50 min při průtoku 10 ml/min. Frakce v průběhu píky byly jímány po 3 ml, mezi píky po 10 ml. UV detekce byla nastavena na 254, 270, 280 a 290 nm. Celkově bylo jímáno 188 frakcí, které byly spojeny do 10 frakcí (Obrázek 14, Tabulka 5) i na základě TLC analýzy (silikagel 60 F<sub>254</sub>, vyvíjející směs S4, počet vyvíjení 1x, detekce UV + Dragendorffovo činidlo).

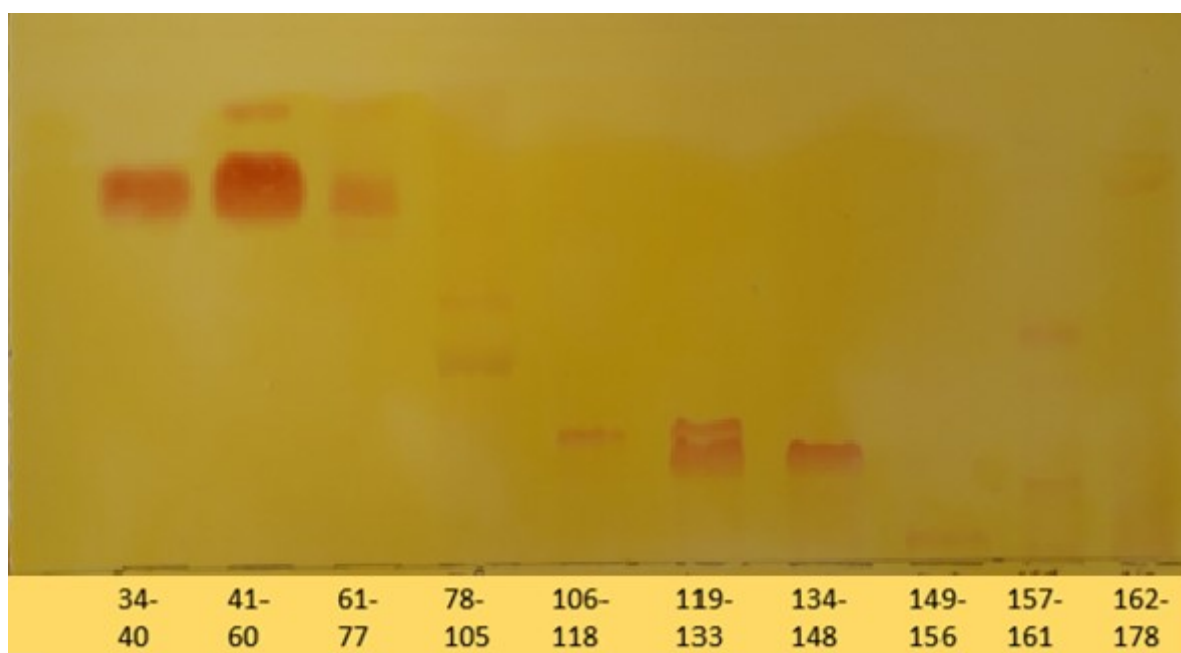
*Tabulka 4 Eluční gradient chromatografie na SiO<sub>2</sub>*

Start %B	End %B	min	s
0	0	8	0
0	1	0	1
1	1	8	0
1	2	0	1
2	2	8	0
2	3	0	1
3	3	8	0
3	5	0	1
5	5	8	0
5	7	0	1
7	7	8	0
7	10	0	1
10	10	8	0
10	15	0	1
15	15	8	0
15	20	0	1
20	20	8	0
20	25	0	1
25	25	8	0
25	35	0	1
35	35	8	0
35	50	0	1
50	50	8	0
50	75	0	1
75	75	8	0
75	100	0	1
100	100	8	0

Total Time: 01:52:13



Obrázek 13 Chromatogram průběhu flash separace na SiO<sub>2</sub> 60 15 μm



Obrázek 14 TLC - 10 spojených frakcí z flash chromatografie separované na SiO<sub>2</sub> 60 15 μm

Tabulka 5 Hmotnosti 10 spojených frakcí z flash chromatografie (SiO<sub>2</sub> 60 15 μm)

Frakce	Spojené frakce	Hmotnost mg
1	34–40	94
2	41–60	345
3	61–77	122
4	78–105	62
5	106–118	14
6	119–133	17
7	134–148	12
8	149–156	36
9	157–161	20
10	162–178	107

#### 4.3.3 Izolace alkaloidů ze spojené frakce 34–77 (561 mg)

Izolace spojené frakce 34–77 probíhala preparativní TLC na 12 litých deskách 15 × 15 cm na silikagelu 60 GF<sub>254</sub> za použití vyvíjecí směsi S2, počet vyvíjení 2x. Celkově bylo získáno 4 zóny, eluce alkaloidů z adsorbentu ze zón probíhala CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>+MeOH 1:1. Po odpaření rozpouštědel za sníženého vakua na rotační vakuové odparce činily hmotnosti jednotlivých frakcí:

1. Rf 0,60; m = 2,9 mg
2. Rf 0,55; m = 58 mg
3. Rf 0,25; m = 36,4 mg
4. Rf 0,20; m = 112 mg

##### 4.3.3.1 Izolace alkaloidu z podfrakce 2 (58 mg)

Podfrakce 1 (2,9 mg) nebyla dále zpracovávána z důvodu malé hmotnosti. Podfrakce 2 byla dále purifikována preparativní TLC na 6 analytických TLC deskách silikagel 60 F<sub>254</sub> 20 × 10, dráha 8,5 cm, vyvíjecí směs S5, počet vyvíjení 3x. Elucí hlavní zóny (Rf 0,40) směsí CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>+MeOH 1:1 po odpaření bylo získáno 28 mg bílé, práškovité látky **AB-1**.

##### 4.3.3.2 Izolace alkaloidu z podfrakce 3 (36,4 mg)

Podfrakce 3 byla dále purifikována preparativní TLC na 4 analytických TLC deskách silikagel 60 F<sub>254</sub> 20 × 10, dráha 8,5 cm, vyvíjecí směs S3, počet vyvíjení 3x. Elucí hlavní zóny (Rf 0,30) směsí CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>+MeOH 1:1 po odpaření bylo získáno 20 mg bílé, práškovité látky **AB-2**.

##### 4.3.3.3 Izolace alkaloidu z podfrakce 4 (112 mg)

Podfrakce 4 byla dále purifikována preparativní TLC na 10 analytických TLC deskách silikagel 60 F<sub>254</sub> 20 × 10, dráha 8,5 cm, vyvíjecí směs S3, počet vyvíjení 3x. Elucí hlavních 2 zón směsí CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>+MeOH 1:1 po odpaření bylo získáno 15 mg bílé, práškovité látky **AB-2** (Rf 0,30) a 59 mg bílé, práškovité látky **AB-3** (Rf 0,25).



#### 4.3.4 Měření aktivit izolovaných alkaloidů

##### 4.3.4.1 *Měření inhibice cholinesteras*

Nebylo náplní této diplomové práce, inhibici měřila Pharmdr. Daniela Hulcová, Ph.D. (katedra farmakognozie a farmaceutické botaniky). Přesné podmínky, za kterých probíhala měření, jsou stejné jako podmínky popsané v této publikaci [84].

##### 4.3.4.2 *Měření inhibice prolyloligopeptidasy*

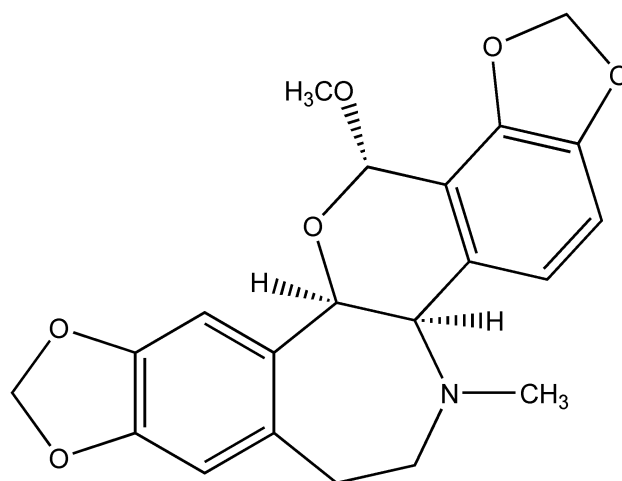
Nebylo náplní této diplomové práce, inhibici měřila RNDr. Martina Hrabínová, Ph.D. (Univerzita Obrany, Hradec Králové). Přesné podmínky, za kterých probíhala měření, jsou stejné jako podmínky popsané v této publikaci [84]

# 5 VÝSLEDKY

## 5.1 Strukturní analýza

### 5.1.1 (+)-Rhoeadin (AB-1)

Sumární vzorec:  $C_{21}H_{21}NO_6$



Obrázek 15 Struktura (+)-rhoeadinu

#### NMR analýza

Alkaloid byla určena na základě porovnáním naměřených dat s literaturou[85].

#### ESI-MS

ESI-MS  $[M + H]^+$   $m/z$  384,4.

#### GC-MS

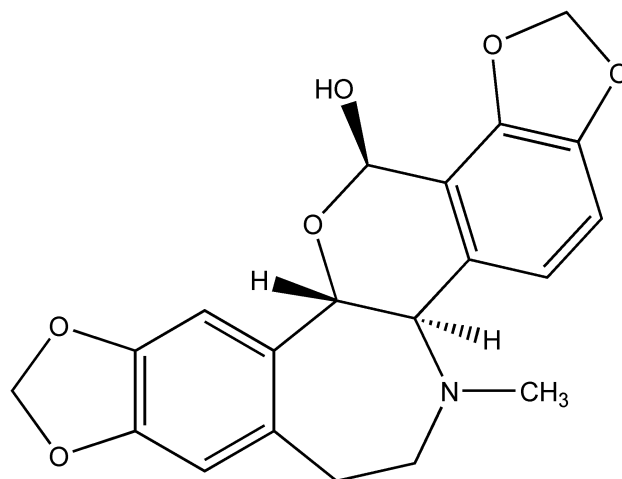
EI-MS  $[M]^{+}$   $m/z$  (%) 383 (63), 368 (55), 206 (20), 192 (14), 190 (14), 177 (100), 163 (15), 135 (15).

#### Optická otáčivost

$[\alpha] = + 240^\circ$  ( $c = 0,12$ ;  $CHCl_3$ )

### 5.1.2 (+)-Isorhoeagenin (AB-2)

**Sumární vzorec:** C<sub>20</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>6</sub>



Obrázek 16 Struktura (+)-isorhoeageninu

#### **NMR analýza**

Alkaloid byl určena na základě porovnáním naměřených dat s literaturou[85].

#### **ESI-MS**

ESI-MS [M + H]<sup>+</sup> m/z 370,4.

#### **GC-MS**

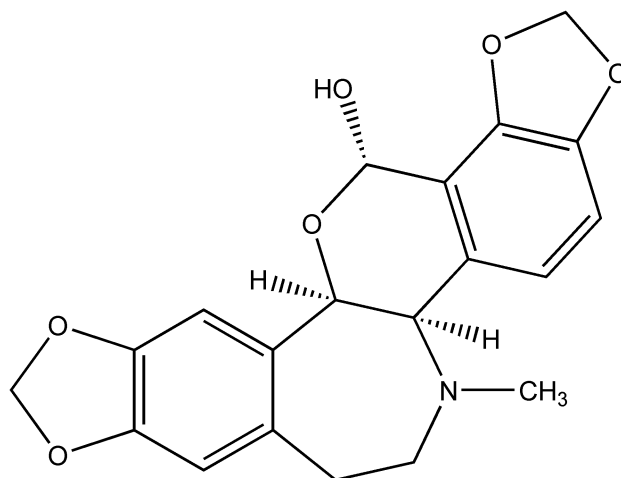
EI-MS [M]<sup>+</sup> m/z (%) 369 (<1), 368(3),367(10), 339(48), 338(100), 324(29), 310(41), 308(39), 190(29), 162(72), 148(51), 134(47).

#### **Optická otáčivost**

[α] = + 150° (c = 0,12; CHCl<sub>3</sub>)

### 5.1.3 (+)-Rhoeagenin (AB-3)

**Sumární vzorec:** C<sub>20</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>6</sub>



Obrázek 17 Struktura (+)-isorhoeageninu

#### **NMR analýza**

Alkaloid byl určena na základě porovnáním naměřených dat s literaturou[85].

#### **ESI-MS**

ESI-MS [M + H]<sup>+</sup> m/z (%) 370,4.

#### **GC-MS**

EI-MS [M]<sup>+</sup> m/z (%) 369 (<2), 368(3),367(10), 339(53), 338(100), 324(29), 310(45), 308(33), 207(75), 190(31), 281(34), 162(81), 148(61), 134(50).

#### **Optická otáčivost**

[ $\alpha$ ] = + 135° (c = 0,13; CHCl<sub>3</sub>)

## 5.2 Biologická aktivita

Tabulka 6 Inhibice cholinesteras, prolyloligopeptidasy a výpočet logBB u izolovaných alkaloidů

Alkaloid	AChE (IC <sub>50</sub> μM) <sup>a</sup>	BuChE (IC <sub>50</sub> μM) <sup>a</sup>	POP (IC <sub>50</sub> μM) <sup>a</sup>	logBB <sup>b</sup>
(+)-rhoneadin	> 100	> 100	>790	-0,460
(+)-isorhoeagenin	> 100	> 100	706 ± 23	-0,694
(+)-rhoeagenin	> 100	> 100	878 ± 45	-0,694
Huperzin A	0,033 ± 0,001	>1000	-	-0,250
Rivastigmin	0,037 ± 0,001	0,033 ± 0,0003	-	0,213
Berberin	0,71 ± 0,10	30,7 ± 3,5	142 ± 21	0,420

<sup>a</sup> Koncentrace inhibitoru nutná k poklesu aktivity enzymu na 50 %; hodnoty jsou uváděny se směrodatnou odchylkou, měření probíhala ve třech nezávislých měření v triplikátu.

<sup>b</sup> Logaritmický poměr mezi koncentracemi dané látky v mozku a v krvi – předpoklad prostupu látky přes HEB

## 6 DISKUZE A ZÁVĚR

Separace spojeného alkaloidního výtřepku připraveného *Papaver rhoeas* L. probíhala nejprve pomocí flash chromatografie. Ve flash chromatografii se pro separaci látek nejčastěji používá plně aktivní silikagel[86]. Prvotní snahy separovat alkaloidy flash chromatografií tohoto výtřepku na aktivním silikagelu (40-63  $\mu\text{m}$ ), silikagelu s reverzní fází (C18 40  $\mu\text{m}$ ) byly neúspěšné (výsledky těchto pokusů nejsou součástí této práce). Proto padla volba použít pro separaci neutrální oxid hlinitý. Jelikož aktivní substance obsahovaly frakce, které byly získány elucí EtOAc s MeOH (Tab. 3), byl pro následnou purifikaci použit silikagel (15  $\mu\text{m}$ ), u kterého byla upravena aktivita přidavkem vody (25 %) kvůli polaritě látek, ale i využití adsorpčně-rozdělovacího mechanismu[87]. Využití deaktivovaného silikagelu poskytlo velmi dobré rozdělení frakcí (Obr. 14). Izolace alkaloidů z frakcí získaných z flash chromatografie probíhala preparativní TLC. Struktura čistých látek byla objasněna spektroskopickými a spektroskopickými metodami (MS, NMR a optická otáčivost). Izolované alkaloidy byly určeny jako (+)-rheadin, (+)-rheagenin a (+)-isorheagenin a spadají do strukturní skupiny rheadinových alkaloidů. Jedná se o sloučeniny již dříve z *P. rhoeas* izolovány[85].

Ačkoliv se jedná o již známé látky, dosud nebyla zjišťována jejich biologická aktivita vzhledem k Alzheimerově chorobě.

Studiem jejich cholinesterasové inhibiční aktivity bylo zjištěno, že se jedná o látky s  $\text{IC}_{50} > 100 \mu\text{M}$ , tedy neaktivní, zejména ve srovnání s použitými standardy huperzinem A, rivastigminem a berberinem. Z výsledků hodnot  $\text{IC}_{50}$  studovaných látek tedy vyplývá, že nejsou zodpovědné za výraznou a selektivní inhibiční aktivitu vůči BuChE, která byla zjištěna u spojeného výtřepku.

Co se týká inhibiční aktivity vůči POP, při porovnání se standardem berberinem ( $\text{IC}_{50} 142 \pm 21 \mu\text{M}$ ) vychází identifikované alkaloidy jen jako mírné inhibitory tohoto enzymu: (+)-rheadin ( $\text{IC}_{50} > 790 \mu\text{M}$ ), (+)-isorheagenin ( $\text{IC}_{50} 706 \pm 23 \mu\text{M}$ ) a (+)-rheagenin ( $878 \pm 45 \mu\text{M}$ ).

Závěrem, (+)-rheadin, (+)-rheagenin i (+)-isorheagenin se jeví jako neperspektivní sloučeniny pro potenciální využití v terapii Alzheimerovy choroby z hlediska inhibice lidských cholinesteras a prolyloligopeptidasy. Otázkou zůstává, zda tyto alkaloidy testovat vůči jiným terapeutickým možným zásahům do patofyziologie této choroby (např. inhibice GSK-3 $\beta$ ,  $\beta$ -sekretasy apod.), protože na základě vypočteného logBB tyto látky budou přecházet pasivní difúzí přes hematoencefalickou bariéru jen omezeně (logBB < 0)[88,89].

## 7 ABSTRAKT

Bučková, A.: Alkaloidy *Papaver rhoeas* L. (Papaveraceae) a jejich biologická aktivita vztažená k Alzheimerově chorobě III.; Diplomová práce, Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra farmakognozie a farmaceutické botaniky, Hradec Králové 2022, počet stran 59

Tato diplomová práce se zabývá separací spojeného výtřepku ( $\text{CHCl}_3 + \text{EtOAc} + \text{I}^-$ ) *Papaver rhoeas* L. flash chromatografií a následnou izolací alkaloidů z vybraných frakcí preparativní TLC. Objasnění struktury izolovaných látek probíhalo na základě spektrometrických a spektroskopických metod (MS, NMR a optické otáčivosti). Alkaloidy byly identifikované jako (+)-rhoeadin, (+)-rhoeagenin a (+)-isorhoeagenin. Po objasnění struktury byly alkaloidy testovány *in vitro* na schopnost inhibovat enzymy hrající roli v patogenezi Alzheimerovy choroby (acetylcholinesterasa, butyrylcholinesterasa a prolyloligopeptidasa). Na základě získaných výsledků se studované alkaloidy jeví jako neaktivní vůči vybraným enzymům (hodnoty  $\text{IC}_{50} > 100 \mu\text{M}$ ).

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



## 8 ABSTRACT

Bučková, A.: Alkaloids of *Papaver rhoeas* L. (Papaveraceae) and their biological activity related to Alzheimer's disease III.; Diploma thesis, Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Department of Pharmacognosy and Pharmaceutical Botany, Hradec Králové 2022, 59 pages

The aim of this diploma thesis was to fractionate the combined extract (CHCl<sub>3</sub> + EtOAc + I<sup>-</sup>) from *Papaver rhoeas* L. using flash chromatography and subsequently, to isolate alkaloids from the chosen fractions by preparative TLC. The chemical structures of the isolated compounds were determined by spectrometric and spectroscopic methods (MS, NMR and optical rotation). Alkaloids were identified as (+)-rheadin, (+)-rheadenin and (+)-isorheadenin. After structure elucidation, the alkaloids were tested *in vitro* for inhibitory activity towards enzymes that are playing part in the pathogenesis of the Alzheimer's disease (acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase and prolyl oligopeptidase). Based on the results, the studied alkaloids seem to be inactive towards chosen enzymes (values IC<sub>50</sub> > 100 μM).

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

# 9 LITERATURA

1. Apoštolová, L. G. Alzheimer Disease: *CONTINUUM: Lifelong Learning in Neurology* **2016**, 22, 419–434, doi:10.1212/CON.0000000000000307.
2. Jiráček, R. Diagnostika a Terapie Alzheimerovy Choroby. *Neurologie pro praxi*, Solen, **2008**, 4, 240–244, ISSN 1803-5280
3. Ng, Y.P.; Or, T.C.T.; Ip, N.Y. Plant Alkaloids as Drug Leads for Alzheimer's Disease. *Neurochemistry International* **2015**, 89, 260–270, doi:10.1016/j.neuint.2015.07.018.
4. Physostigmine for Alzheimer's Disease - PubMed Dostupné online: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11405996/> (navštíveno 23. října 2021).
5. ADINACO | Vědecký Portál - Farmaceutická Fakulta UK - Publikace Dostupné online: <https://portal.faf.cuni.cz/Groups/ADINACO/Publications/> (navštíveno 30. března 2022).
6. Bulvová, L. Alkaloidy Papaver Rhoëas L. (Papaveraceae) a Jejich Biologická Aktivita Vztažená k Alzheimerově Chorobě I., Univerzita Karlova, **2018**.
7. Piaceri, I. Genetics of Familial and Sporadic Alzheimer s Disease. *Front Biosci* **2013**, E5, 167–177, doi:10.2741/E605.
8. Alzheimer's Disease - Symptoms Dostupné online: <https://www.nhs.uk/conditions/alzheimers-disease/symptoms/> (navštíveno 23. října 2021).
9. Rusina, R.; Holmerová I. Poruchy Spánku a Nočního Chování u Alzheimerovy Nemoci a Dalších Demencí. *Neurologie pro praxi, Solen*, **2014**, 4, ISSN 1803-5280
10. Peter-Derex, L.; Yamine, P.; Bastuji, H.; Croisile, B. Sleep and Alzheimer's Disease. *Sleep Medicine Reviews* **2015**, 19, 29–38, doi:10.1016/j.smrv.2014.03.007.

11. Jiráček, R. Poruchy Chování u Pacientů s Alzheimerovou Chorobou. *Neurologie pro praxi, Solen*, **2008**, 5, 15–18, ISSN 1803-5280.
12. Tiwari, S.; Atluri, V.; Kaushik, A.; Yndart, A.; Nair, M. Alzheimer's Disease: Pathogenesis, Diagnostics, and Therapeutics. *Int J Nanomedicine* **2019**, 14, 5541–5554, doi:10.2147/IJN.S200490.
13. Zhang, Y.; Thompson, R.; Zhang, H.; Xu, H. APP Processing in Alzheimer's Disease. *Mol Brain* **2011**, 4, 3, doi:10.1186/1756-6606-4-3.
14. Zhao, J.; Deng, Y.; Jiang, Z.; Qing, H. G Protein-Coupled Receptors (GPCRs) in Alzheimer's Disease: A Focus on BACE1 Related GPCRs. *Front. Aging Neurosci.* **2016**, 8, doi:10.3389/fnagi.2016.00058.
15. Pîrșcoveanu, D.F.V.; Pirici, I.; Tudorică, V.; Bălșeanu, T.A.; Albu, V.C.; Bondari, S.; Bumbea, A.M.; Pîrșcoveanu, M. Tau Protein in Neurodegenerative Diseases - a Review. *Rom J Morphol Embryol* **2017**, 58, 1141–1150.
16. Defective-Tau.Png (PNG Obrázek, 727 × 519 Bodů) Dostupné online: <https://lambertds.files.wordpress.com/2013/11/defective-tau.png> (navštíveno 8. prosince 2021).
17. Acetylcholine | Definition, Function, & Facts | Britannica Dostupné online: <https://www.britannica.com/science/acetylcholine> (navštíveno 23. října 2021).
18. Hampel, H.; Mesulam, M.-M.; Cuello, A.C.; Farlow, M.R.; Giacobini, E.; Grossberg, G.T.; Khachaturian, A.S.; Vergallo, A.; Cavado, E.; Snyder, P.J.; et al. The Cholinergic System in the Pathophysiology and Treatment of Alzheimer's Disease. *Brain* **2018**, 141, 1917–1933, doi:10.1093/brain/awy132.
19. Tsao, J.W.; Heilman, K.M. Transient Memory Impairment and Hallucinations Associated with Tolterodine Use. *The New England Journal of Medicine* **2003**, 349, 2274–2275, doi:10.1056/NEJM200312043492325.

20. Giacobini, E. Cholinergic Function and Alzheimer's Disease. *Int. J. Geriatr. Psychiatry* **2003**, *18*, S1–S5, doi:10.1002/gps.935.
21. Greig, N.H.; Utsuki, T.; Ingram, D.K.; Wang, Y.; Pepeu, G.; Scali, C.; Yu, Q.-S.; Mamczarz, J.; Holloway, H.W.; Giordano, T.; et al. Selective Butyrylcholinesterase Inhibition Elevates Brain Acetylcholine, Augments Learning and Lowers Alzheimer -Amyloid Peptide in Rodent. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2005**, *102*, 17213–17218, doi:10.1073/pnas.0508575102.
22. Chlebek, J.; Novák, Z.; Kassemová, D.; Šafratová, M.; Kostelník, J.; Malý, L.; Ločárek, M.; Opletal, L.; Hošťálková, A.; Hrabínová, M.; et al. Isoquinoline Alkaloids from *Fumaria Officinalis* L. and Their Biological Activities Related to Alzheimer's Disease. *Chemistry & Biodiversity* **2016**, *13*, 91–99, doi:10.1002/cbdv.201500033.
23. Štípek, S. *Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a nemoci*; Grada: Praha, **2000**; ISBN 978-80-7169-704-6.
24. Hebert, L.E.; Scherr, P.A.; Beckett, L.A.; Albert, M.S.; Pilgrim, D.M.; Chown, M.J.; Funkenstein, H.H.; Evans, D.A. Age-Specific Incidence of Alzheimer's Disease in a Community Population. *JAMA* **1995**, *273*, 1354–1359.
25. Liu, C.-C.; Liu, C.-C.; Kanekiyo, T.; Xu, H.; Bu, G. Apolipoprotein E and Alzheimer Disease: Risk, Mechanisms and Therapy. *Nat Rev Neurol* **2013**, *9*, 106–118, doi:10.1038/nrneurol.2012.263.
26. de Bruijn, R.F.A.G.; Ikram, M.A. Cardiovascular Risk Factors and Future Risk of Alzheimer's Disease. *BMC Med* **2014**, *12*, 130, doi:10.1186/s12916-014-0130-5.
27. Poels, M.M.F.; van Oijen, M.; Mattace-Raso, F.U.S.; Hofman, A.; Koudstaal, P.J.; Witteman, J.C.M.; Breteler, M.M.B. Arterial Stiffness, Cognitive Decline, and Risk of Dementia: The Rotterdam Study. *Stroke* **2007**, *38*, 888–892, doi:10.1161/01.STR.0000257998.33768.87.
28. Wang, C.; Holtzman, D.M. Bidirectional Relationship between Sleep and Alzheimer's Disease: Role of Amyloid, Tau, and Other Factors. *Neuropsychopharmacol.* **2020**, *45*, 104–120, doi:10.1038/s41386-019-0478-5.

29. Konrád, J. Standardizovaná Škála MMSE – SMMSE - Jak standardně používat MMSE - Nejčastější omyly a chyby při administraci a skórování.
30. Bartoš, A. Návod k Vyšetřování - Test Pojmenování Obrázků a Jejich Vybavení. *Neurologie pro praxi, Solen*, **2018**, 11–13, ISSN 1803-5280.
31. Snowdon, D.A. Healthy Aging and Dementia: Findings from the Nun Study. *Ann Intern Med* **2003**, *139*, 450, doi:10.7326/0003-4819-139-5\_Part\_2-200309021-00014.
32. Stern, Y. Cognitive Reserve and Alzheimer Disease. *Alzheimer Disease & Associated Disorders* **2006**, *20*, 112–117, doi:10.1097/01.wad.0000213815.20177.19.
33. Franková, V. Léčebné Postupy u Behaviorálních Poruch u Demence. *Psychiatrie pro praxi* **2007**, *6*, 257–261, ISSN 1803-5272.
34. Nilius, P.; Nikolai, T. Kognitivní Rehabilitace. *Neurologie pro praxi, Solen*, **2018**, *1*, 65–66, ISSN 1803-5280.
35. *AISLP*; N06DA-anticholinesterázy, (navštíveno 26. října 2021)
36. Vlček, J.; Fialová, D. *Klinická farmacie*; Grada: Praha, **2010**; ISBN 978-80-247-3169-8.
37. Abbott, N.; Dolman, D.; Patabendige, A. Assays to Predict Drug Permeation Across the Blood-Brain Barrier, and Distribution to Brain. *CDM* **2008**, *9*, 901–910, doi:10.2174/138920008786485182.
38. Abbott, N.J. Prediction of Blood–Brain Barrier Permeation in Drug Discovery from in Vivo, in Vitro and in Silico Models. *Drug Discovery Today: Technologies* **2004**, *1*, 407–416, doi:10.1016/j.ddtec.2004.11.014.
39. Avdeef, A. The Rise of PAMPA. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology* **2005**, *1*, 325–342, doi:10.1517/17425255.1.2.325.

40. Di, L.; Kerns, E.H.; Fan, K.; McConnell, O.J.; Carter, G.T. High Throughput Artificial Membrane Permeability Assay for Blood–Brain Barrier. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2003**, *38*, 223–232, doi:10.1016/S0223-5234(03)00012-6.
41. Mayer, F.; Mayer, N.; Chinn, L.; Pinsonneault, R.L.; Kroetz, D.; Bainton, R.J. Evolutionary Conservation of Vertebrate Blood-Brain Barrier Chemoprotective Mechanisms in *Drosophila*. *Journal of Neuroscience* **2009**, *29*, 3538–3550, doi:10.1523/JNEUROSCI.5564-08.2009.
42. Nielsen, P.A.; Andersson, O.; Hansen, S.H.; Simonsen, K.B.; Andersson, G. Models for Predicting Blood–Brain Barrier Permeation. *Drug Discovery Today* **2011**, *16*, 472–475, doi:10.1016/j.drudis.2011.04.004.
43. Garg, P.; Verma, J. In Silico Prediction of Blood Brain Barrier Permeability: An Artificial Neural Network Model. *J. Chem. Inf. Model.* **2006**, *46*, 289–297, doi:10.1021/ci050303i.
44. Profil taxonu *Papaver rhoeas* L., O.Z. BioLib: Biological library Dostupné online: <https://www.biolib.cz/cz/taxon/id3504/> (navštíveno 13. května. 2022).
45. BOTANY.Cz » PAPAVER RHOEAS L. – Mák Vlčí / Mak Vlčí. *Botany.cz./* Dostupné online: <https://botany.cz/cs/papaver-rhoeas/> (navštíveno 23. října 2021).
46. Papaver Rhoeas - Mák Vlčí | Papaveraceae - Makovité | Natura Bohemica Dostupné online: <http://www.naturabohemica.cz/papaver-rhoeas/> (navštíveno 23. října 2021).
47. Jahodář, L.; Univerzita Karlova *Farmakobotanika: semenné rostliny*; Karolinum: Praha, **2011**; ISBN 978-80-246-2015-2.

48. Spilková, J.; Martin, J.; Siatka, T. *Farmakognozie*; **2016**; ISBN 978-80-246-3294-0.
49. Jahodář, L. *Rostliny způsobující otravy*; **2018**; ISBN 978-80-246-4190-4.
50. Grauso, L.; Emrick, S.; Bonanomi, G.; Lanzotti, V. Metabolomics of the Alimurgic Plants *Taraxacum officinale*, *Papaver rhoeas* and *Urtica dioica* by Combined NMR and GC–MS Analysis. *Phytochemical Analysis* **2019**, *30*, 535–546, doi:10.1002/pca.2845.
51. Trichopoulou, A. Nutritional Composition and Flavonoid Content of Edible Wild Greens and Green Pies: A Potential Rich Source of Antioxidant Nutrients in the Mediterranean Diet. *Food Chemistry* **2000**, *70*, 319–323, doi:10.1016/S0308-8146(00)00091-1.
52. Choe, S.; Kim, S.; Lee, C.; Yang, W.; Park, Y.; Choi, H.; Chung, H.; Lee, D.; Hwang, B.Y. Species Identification of Papaver by Metabolite Profiling. *Forensic Science International* **2011**, *211*, 51–60, doi:10.1016/j.forsciint.2011.04.015.
53. El-Masry, S.; El-Ghazooly, M.; Omar, A.; Khafagy, S.; Phillipson, J. Alkaloids from Egyptian Papaver Rhoëas. *Planta Med* **1981**, *41*, 61–64, doi:10.1055/s-2007-971675.
54. Staunton, J. Biosynthesis of Isoquinoline Alkaloids. *Planta Med* **1979**, *36*, 1–20, doi:10.1055/s-0028-1097235.
55. Preininger, V. Chemotaxonomy of the Papaveraceae Alkaloids. In *The Chemistry and Biology of Isoquinoline Alkaloids*; Phillipson, J.D., Roberts, M.F., Zenk, M.H., Eds.; Proceedings in Life Sciences; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, **1985**; pp. 23–37 ISBN 978-3-642-70130-6.
56. Menachery, M.D.; Lavanier, G.L.; Wetherly, M.L.; Guinaudeau, H.; Shamma, M. Simple Isoquinoline Alkaloids. *J. Nat. Prod.* **1986**, *49*, 745–778, doi:10.1021/np50047a001.
57. Bayazeid, O.; Yalçın, F.N. Biological Targets of 92 Alkaloids Isolated from Papaver Genus: A Perspective Based on in Silico Predictions. *Med Chem Res* **2021**, *30*, 574–585, doi:10.1007/s00044-020-02663-9.

58. Kalav, Y.; Sariyar, G. Alkaloids from Turkish *Papaver Rhoeas*. *Planta Med* **1989**, *55*, 488–488, doi:10.1055/s-2006-962072.
59. Preininger, V.; Šimánek, V.; Gašić, O.; Šantavý, F.; Dolejš, L. Adlumidiceine and Adlumiceine: New Alkaloids of Narceine Type. *Phytochemistry* **1973**, *12*, 2513–2515, doi:10.1016/0031-9422(73)80466-2.
60. Grauso, L.; de Falco, B.; Motti, R.; Lanzotti, V. Corn Poppy, *Papaver Rhoeas* L.: A Critical Review of Its Botany, Phytochemistry and Pharmacology. *Phytochem Rev* **2021**, *20*, 227–248, doi:10.1007/s11101-020-09676-7.
61. Mohamad, A. H.; Maha, A. E.; Kamal, B.; Maamoun, F.; Hala, K.; Abdalla, E. L.; Hala, G. M. Cytotoxic Activity of Alkaloids from *Papaver Rhoeas* Growing in Lebanon. *Records of Natural Products* **2017**, 211–216.
62. Slavík, J.; Slavíková, L.; Bochořáková, J. Alkaloids from *Papaver Rhoeas* Var. *Chelidonioides* O. KUNTZE, P. Confine JORD., and P. *Dubium* L. *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1989**, *54*, 1118–1125, doi:10.1135/cccc19891118.
63. Shang, X.; Yang, C.; Morris-Natschke, S.L.; Li, J.; Yin, X.; Liu, Y.; Guo, X.; Peng, J.; Goto, M.; Zhang, J.; et al. Biologically Active Isoquinoline Alkaloids Covering 2014–2018. *Med Res Rev* **2020**, *40*, 2212–2289, doi:10.1002/med.21703.
64. Šantavý, F. Chapter 5 *Papaveraceae* Alkaloids. In *The Alkaloids: Chemistry and Physiology*; Elsevier, **1970**; Vol. 12, p. 412 ISBN 978-0-12-469512-2.
65. Rösch, H. Chapter 1 *Rhoadine* Alkaloids. In *The Alkaloids: Chemistry and Pharmacology*; Elsevier, **1986**; Vol. 28, pp. 1–93 ISBN 978-0-12-469528-3.
66. Montgomery, C.T.; Cassels, B.K.; Shamma, M. The *Rhoadine* Alkaloids. *J. Nat. Prod.* **1983**, *46*, 441–453, doi:10.1021/np50028a001.
67. Ríos, J.L.; Máñez, S.; Giner, R.M.; Recio, M.Carmen. Biological Aspects of *Aporphinoid* Alkaloids. In *The Alkaloids: Chemistry and Biology*; Elsevier, **1999**; Vol. 53, pp. 57–117 ISBN 978-0-12-469553-5.



68. Dong, J.-W.; Cai, L.; Fang, Y.-S.; Xiao, H.; Li, Z.-J.; Ding, Z.-T. Proaporphine and Aporphine Alkaloids with Acetylcholinesterase Inhibitory Activity from *Stephania Epigaea*. *Fitoterapia* **2015**, *104*, 102–107, doi:10.1016/j.fitote.2015.05.019.
69. Ji, H.-F.; Shen, L. Berberine: A Potential Multipotent Natural Product to Combat Alzheimer's Disease. *Molecules* **2011**, *16*, 6732–6740, doi:10.3390/molecules16086732.
70. Kulkarni, S.K.; Dhir, A. Berberine: A Plant Alkaloid with Therapeutic Potential for Central Nervous System Disorders: BERBERINE IN NEUROLOGICAL DISORDERS. *Phytother. Res.* **2010**, *24*, 317–324, doi:10.1002/ptr.2968.
71. Onda, M.; Takahashi, H. Chapter 4 Protopine Alkaloids. In *The Alkaloids: Chemistry and Pharmacology*; Elsevier, **1989**; Vol. 34, pp. 181–209 ISBN 978-0-12-469534-4.
72. Šimánek, V. Chapter 4 Benzophenanthridine Alkaloids. In *The Alkaloids: Chemistry and Pharmacology*; Elsevier, **1985**; Vol. 26, pp. 185–240 ISBN 978-0-12-469526-9.
73. Hošťálková, A.; Maříková, J.; Opletal, L.; Korábečný, J.; Hulcová, D.; Kuneš, J.; Nováková, L.; Perez, D.I.; Jun, D.; Kučera, T.; et al. Isoquinoline Alkaloids from *Berberis Vulgaris* as Potential Lead Compounds for the Treatment of Alzheimer's Disease. *J. Nat. Prod.* **2019**, *82*, 239–248, doi:10.1021/acs.jnatprod.8b00592.
74. Adsersen, A.; Gauguin, B.; Gudiksen, L.; Jäger, A.K. Screening of Plants Used in Danish Folk Medicine to Treat Memory Dysfunction for Acetylcholinesterase Inhibitory Activity. *Journal of Ethnopharmacology* **2006**, *104*, 418–422, doi:10.1016/j.jep.2005.09.032.
75. Siatka, T.; Adamcová, M.; Opletal, L.; Cahlíková, L.; Jun, D.; Hrabínová, M.; Kuneš, J.; Chlebek, J. Cholinesterase and Prolyl Oligopeptidase Inhibitory Activities of Alkaloids from Argemone Platyceras (Papaveraceae). *Molecules* **2017**, *22*, 1181, doi:10.3390/molecules22071181.
76. Berkov, S.; Bastida, J.; Nikolova, M.; Viladomat, F.; Codina, C. Rapid TLC/GC-MS Identification of Acetylcholinesterase Inhibitors in Alkaloid Extracts. *Phytochem. Anal.* **2008**, *19*, 411–419, doi:10.1002/pca.1066.

77. Cahlíková, L.; Hulová, L.; Hrabínová, M.; Chlebek, J.; Hošťálková, A.; Adamcová, M.; Šafratová, M.; Jun, D.; Opletal, L.; Ločárek, M.; et al. Isoquinoline Alkaloids as Prolyl Oligopeptidase Inhibitors. *Fitoterapia* **2015**, *103*, 192–196, doi:10.1016/j.fitote.2015.04.004.
78. Al Mamun, A.; Maříková, J.; Hulcová, D.; Janoušek, J.; Šafratová, M.; Nováková, L.; Kučera, T.; Hrabínová, M.; Kuneš, J.; Korábečný, J.; et al. Amaryllidaceae Alkaloids of Belladine-Type from *Narcissus Pseudonarcissus* Cv. Carlton as New Selective Inhibitors of Butyrylcholinesterase. *Biomolecules* **2020**, *10*, 800, doi:10.3390/biom10050800.
79. Zhao, C.; Su, P.; Lv, C.; Guo, L.; Cao, G.; Qin, C.; Zhang, W. Berberine Alleviates Amyloid  $\beta$  -Induced Mitochondrial Dysfunction and Synaptic Loss. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2019**, 1–11, doi:10.1155/2019/7593608.
80. Friedemann, T.; Schumacher, U.; Tao, Y.; Leung, A.K.-M.; Schröder, S. Neuroprotective Activity of Coptisine from *Coptis Chinensis* (Franch). *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* **2015**, 1–9, doi:10.1155/2015/827308.
81. Ahmed, A. J.; Abdullah, S. S.; Fuad, O. A.; Yaseen, G.; Kamaran, K. A.; *Papaver Decaisnei: GC-MS Alkaloids Profiling, in Vitro Antioxidant, and Anticancer Activity*; In Review, **2022**; doi: 10.21203/rs.3.rs-1207324/v2
82. Barbosa-Filho, J.M.; Piuvezam, M.R.; Moura, M.D.; Silva, M.S.; Lima, K.V.B.; da-Cunha, E.V.L.; Fechine, I.M.; Takemura, O.S. Anti-Inflammatory Activity of Alkaloids: A Twenty-Century Review. *Rev. bras. farmacogn.* **2006**, *16*, 109–139, doi:10.1590/S0102-695X2006000100020.
83. Víchová, S. Využití Separačních Technik ve Fytochemické Analýze. Diplomová práce, Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy v Hradci Králové: Hradec Králové, **2021**.
84. Vrabec, R.; Maříková, J.; Ločárek, M.; Korábečný, J.; Hulcová, D.; Hošťálková, A.; Kuneš, J.; Chlebek, J.; Kučera, T.; Hrabínová, M.; et al. Monoterpene Indole Alkaloids from *Vinca Minor* L. (Apocynaceae): Identification of New Structural Scaffold for Treatment of Alzheimer's Disease. *Phytochemistry* **2022**, *194*, 113017, doi:10.1016/j.phytochem.2021.113017.

85. Šantavý, F.; Hrbek, J.; Bláha, K. Isolation and Chemistry of the Alkaloids from Some Plants of the Genus *Papaver*. XLI. ORD-Curves of Rhoeadine and Related Substances. *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1967**, *32*, 4452–4459, doi:10.1135/cccc19674452.
86. Bickler, B. Why Does My Silica Flash Chromatography Column Get Hot? Available online: <https://selekt.biotage.com/blog/why-does-my-silica-flash-chromatography-column-get-hot> (accessed on 15 May 2022).
87. Opletal, L.; Drašar, P.B. *Fytochemické metody: skripta pro posluchače Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy. Díl 1: Izolace obsahových látek*; Karolinum: Praha, 1994; ISBN 978-80-7066-912-9.
88. Abraham, M.H.; Takács-Novák, K.; Mitchell, R.C. On the Partition of Ampholytes: Application to Blood–Brain Distribution. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **1997**, *86*, 310–315, doi:10.1021/js960328j.
89. Carpenter, T.S.; Kirshner, D.A.; Lau, E.Y.; Wong, S.E.; Nilmeier, J.P.; Lightstone, F.C. A Method to Predict Blood-Brain Barrier Permeability of Drug-Like Compounds Using Molecular Dynamics Simulations. *Biophysical Journal* **2014**, *107*, 630–641, doi:10.1016/j.bpj.2014.06.024.