

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
Katedra farmaceutické botaniky a ekologie

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Screening alkaloidních rostlin na antioxidační a anticholinesterasovou aktivitu *in vitro*

II.

Screening of alkaloidal plants for antioxidant and anticholinesterase activity *in vitro* II.

Vedoucí diplomové práce: Ing. Kateřina Macáková, Ph.D.

Hradec Králové 2012

Jana Pšeničková

Prohlašuji, že tato diplomová práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.

Místo

.....

Datum

podpis

Na tomto místě bych chtěla poděkovat zejména své vedoucí diplomové práce Ing. Kateřině Macákové, Ph.D. za její podporu, trpělivost, cenné rady, pomoc při měření experimentální části a odborné vedení diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat všem pracovníkům Katedry farmaceutické botaniky a ekologie za umožnění využití laboratorních pomůcek a pomoc při obsluze přístrojů. Rovněž děkuji mé rodině za podporu při studiu a tvorbu potřebného zázemí.

Tato práce vznikla v rámci projektu Specifického vysokoškolského výzkumu 2012 SVV265002 a za podpory grantu FRVŠ 664/2011.

OBSAH

OBSAH	1
I. ÚVOD	3
II. CÍL PRÁCE	5
III. TEORETICKÁ ČÁST.....	6
1. CHARAKTERISTIKA SLEDOVANÝCH DRUHŮ.....	6
2. LÁTKY IZOLOVANÉ Z TESTOVANÝCH DRUHŮ ROSTLIN	10
3. BIOLOGICKÁ AKTIVITA VYBRANÝCH ROSTLIN	16
4. ALZHEIMEROVA CHOROBA.....	19
4.1. Současné terapeutické přístupy.....	20
4.2. Role oxidačního stresu u Alzheimerovy choroby	21
5. VOLNÉ RADIKÁLY A ANTIOXIDANTY	22
5.1. Volné radikály.....	22
5.2. Antioxidační systém organismu.....	25
5.3. Exogenní antioxidanty	27
IV. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	29
1. POTŘEBY.....	29
1.1. Chemikálie	29
1.2. Rozpouštědla.....	29
1.3. Přístrojové vybavení	30
1.4. Detekční činidlo	30
1.5. Vytvájecí soustava pro tenkovrstvou chromatografii	31
1.6. Chromatografický adsorbent.....	31
1.7. Testované drogy	31
2. METODY.....	32
2.1. Příprava extraktů.....	32
2.2. Rozdělení alkaloidů vybraných vzorků na TLC	33
2.3. Stanovení inhibiční aktivity ethanolových a alkaloidních extraktů vůči erytrocytární AChE a sérové BuChE.....	34
2.4. Stanovení antioxidační aktivity ethanolových a alkaloidních extraktů	35
V. VÝSLEDKY	37
1. MNOŽSTVÍ ZÍSKANÝCH EXTRAKTŮ	37
2. VÝSLEDKY DETEKCE ALKALOIDŮ NA TLC	37

3.	VÝSLEDKY STANOVENÍ INHIBIČNÍ AKTIVITY ETHANOLOVÝCH A ALKALOIDNÍCH EXTRAKTŮ VŮČI ERYTROCYTÁRNÍ ACHE A SÉROVÉ BUCHE ...	40
4.	STANOVENÍ ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITY ETHANOLOVÝCH A ALKALOIDNÍCH EXTRAKTŮ.....	47
VI.	DISKUZE.....	48
VII.	ZÁVĚR.....	50
VIII.	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	51
IX.	LITERATURA.....	52
X.	ABSTRAKT.....	58
XI.	ABSTRACT	59

I. ÚVOD

Krytosemenné rostliny (*Angiospermophyta*) tvoří druhově nejbohatší skupinu semenných rostlin. Zahrnují byliny až dřeviny velmi rozmanitého vzhledu a s velmi rozdílnými ekologickými požadavky. Mají nesmírný význam pro člověka, protože zahrnují převážnou část kulturních a užitkových rostlin (1).

Rostliny byly od nepaměti vyhledávány lidmi nejen jako zdroj obživy, ale také pro své léčebné účinky. Mnohé jsou součástí tradičních terapeutických systémů v místech svého přirozeného výskytu a jejich účelnost užití je podpořena výsledky tradiční terapie i výsledky spojenými s dnešními klinickými studiemi. Například tradiční čínská medicína využívá až 7000 druhů rostlin k terapii a vyniká důsledností a tvorbou logických terapeutických systémů majících tisíciletou tradici. Poznatky etnofarmakologie jsou ověřovány moderními postupy současné vědy, je dodržována zásada bezpečnosti a účinnosti (2).

Rostliny jsou schopné díky stavbě svých buněk i těla hromadit v sobě metabolity sekundárního metabolismu. Mezi ně patří také alkaloidy. Některé mají kvarterní charakter dusíku za fyziologických podmínek, což je základní strukturální rys většiny neurotransmiterů. Díky tomu jsou mnohé alkaloidy agonisty nebo antagonisty neurotransmiterů a neuroreceptorů (2). Této vlastnosti alkaloidů se dá využít při léčbě neurodegenerativních onemocnění jako je Alzheimerova choroba (AD).

AD je jedna z nejběžnějších forem demence postihující zejména starší lidi. Kromě neuropatologických znaků této nemoci, jako jsou neurofibrilární klubka a senilní plaky, je charakterizována neurochemicky shodným deficitem cholinergní neurotransmise, částečně postihující cholinergní neurony na bázi předního mozku (3).

Inhibice acetylcholinestery (AChE) slouží jako strategie léčby AD, senilní demence, ataxie, myasthenia gravis a Parkinsonovy choroby. Existuje několik syntetických léků, jako např. takrin, donepezil a rivastigmin s přírodním základem, určených pro léčbu kognitivní dysfunkce a ztráty paměti spojené s AD. Tyto sloučeniny, kvůli svým nežádoucím účinkům zahrnující

gastrointestinální poruchy a problémy spojené s biodostupností, si vynutily zájem o hledání lepších AChE inhibitorů z přírodních zdrojů (3).

Oxidativní stres je důsledkem nadměrné produkce volných radikálů porušujících buněčné a metabolické funkce. Přírodní látky s antioxidačními vlastnostmi mají velký význam díky jejich příznivým účinkům na lidské zdraví, nabízejí ochranu proti metabolickým poruchám, gastroduodenální patogenezi, předčasnému stárnutí, zánětu, revmatoidní artritidě, ateroskleróze, rakovině, neurodegenerativním, včetně AD, a kardiovaskulárním nemocím (4).

II. CÍL PRÁCE

Cílem této diplomové práce je:

- příprava ethanolových a alkaloidních extraktů rostlinných druhů čeledí *Fumariaceae*, *Papaveraceae* a *Ranunculaceae*
- separace alkaloidů jednotlivých druhů rostlin pomocí TLC
- stanovení inhibiční aktivity ethanolových a alkaloidních rostlinných extraktů vůči erytrocytární acetylcholinesterasy (AChE) a sérové butyrylcholinesterasy (BuChE) pomocí Ellmanovy spektrofotometrické metody
- stanovení antioxidační aktivity ethanolových a alkaloidních rostlinných extraktů *in vitro* DPPH testem

III. TEORETICKÁ ČÁST

1. CHARAKTERISTIKA SLEDOVANÝCH DRUHŮ

Druh: *Coptis chinensis* Franch. – koptis (nitolist) čínský, čeleď *Ranunculaceae*

Vytrvalá bylina. Oddenky žluté, často větvené s hustými vláknitými kořeny. Řapík 5 – 12 cm dlouhý, listy oválně trojhranné, rozdělené na tři laloky. 1 – 2 stvoly, 15 – 35 cm vysoké, květy oboupohlavné, jednotlivé. 6 oválných modrofialových kališních lístků, 2,8 – 4,4 cm dlouhých, žádné korunní plátky. Četné tyčinky, mnoho chlupatých pestíků. Nažky 3 – 4 mm s dlouhými měkkými chlupy. Kvete od dubna do května, plody uzrávají v červnu až červenci. Roste v hustých lesích a stinných místech (5).

Druh: *Corydalis lutea* (L.) DC. – dymnivka žlutá, čeleď *Fumariaceae*

Vytrvalá bylina s plazivým oddenkem, hustě srstnatá, výška 15 – 30 cm. Lodyha je lysá, větvená, listy živě zelené, řapíkaté, trojčetné až trojitě zpeřené. Hrozny mnohokvěté, přímé, květy žluté s krátkou ostruhou. Kvete po celé léto. Plodem je tobolka. Roste na skalách, zídkách a podél cest, s oblibou roste na vlhčích a stinných stanovištích. Pochází ze států jižní Evropy (6).



Obr. 2: *Corydalis lutea* (L.)
(© Michael Kesi) (7)

Druh: *Corydalis solida* (L.) CLAIRV. – dymnivka plná, čeleď *Fumariaceae*

Vytrvalá bylina, vyrůstá z velké kulovité hlízy. Přímá lodyha, až 20 cm vysoká s dlouze řapíkatými lodyžními listy, dvakrát trojčetně dělenou modrozelenou čepelí. Květenství je hrozen s 4 – 20 květy a s dlanitými listeny. Květy jsou fialově červené s ostruhou na konci zakřivenou,



s hluboce vykrojeným dolním pyskem. Květní stopka je délky ostruhy nebo o polovinu délky ostruhy kratší. Kvete od března do dubna. Roste na vlhkých a výživných půdách ve světlých hájových listnatých a lužních lesích. Roste téměř po celé Evropě, v ČR v teplých oblastech, hlavně na Moravě (8).

Obr. 3: *Corydalis solida* (L.) CLAIRV.
(© Lubomír Opletal) (9)

Druh: *Corydalis yanhusuo* W. T. Wang – dymnivka yanhusuo, čeleď *Fumariaceae*

Vytrvalá, 10 – 20 cm vysoká bylina. Listy střídavé, složené, trojčetné, asi 2 cm dlouhé, eliptické, na konci tupé, celokrajné. Listeny široké, kopinaté, hrozny mnohokvěté, kališní lístky malé, opadavé. Čtyři okvětní lístky, vnější dva mírně větší, okraje růžové, střed fialový, horní prodloužený do ostruhy, vnitřní dva lístky menší. Šest tyčinek, nitky ve dvou svazcích, semeník cylindrický. Plodem je tobolka. Kvete v dubnu, plody dozrávají v květnu až červnu. Roste v lesích (10).

Druh: *Glaucium corniculatum* (L.) Rudolph – rohatec růžkatý, čeleď *Papaveraceae*



Obr. 5: *Glaucium corniculatum* (L.) Rudolph
(© Michal Pálka) (12)

Jednoletá nebo výjimečně dvouletá rostlina. Listy jsou jemně chlupaté, zpeřené, zubaté, růžicovité, za květu zasychající. Lodyhy dosahují výšky 40 cm. Květy jsou samostatné, žluté, oranžové nebo červené. Plodem je podlouhlá dvoukomorová tobolka, až 20 mm dlouhá. Semena jsou 1,2 mm až 1,5 mm dlouhá, okrouhlá až kulovitá. Roste na rumišťích, na polích a na plážích. Vyskytuje se ve středomoří, v severní Africe, Rusku a v Evropě (11).

Druh: *Papaver argemone* (L.) - mák polní, čeleď *Papaveraceae*

Jednoletá, 10 – 50 cm vysoká bylina. Lodyha přímá nebo vystoupavá, jednoduchá nebo rozvětvená už od báze, řídce olistěná, ochlupená. Dolní listy dlouze řapíkaté, 1 – 2 krát



Obr. 6: *Papaver argemone* (L.)
(© Marinella Miglio) (14)

peřnosečné, kopinaté. Střední a horní listy krátce řapíkaté až přisedlé, 1 – 2 krát peřnosečné, horní listy často celistvé, jen na okraji zubaté. Kališní lístky vejčité, koruna v průměru 25 – 70 mm. Korunní plátky podlouhle obvejčité, okraje se nepřekrývají, 12 – 35 mm dlouhé, tmavočervené, někdy na bázi s tmavou skvrnou. Nitky tyčinek ztlustělé, prašníky elipsoidní. Semeník úzký obvejčitý až válcovitý. Plodem je tobolka, 15 – 22 mm dlouhá, řídce pokrytá štětinami. Roste ve střední a západní Evropě, v ČR v teplých oblastech (13).

Druh: *Papaver confine* Jordan – mák časný, čeleď *Papaveraceae*

Jednoletá bylina, přímá lodyha, 40 – 80 cm vysoká, bohatě větvená, chlupatá. Přízemní dlouze řapíkaté listy za květu zasychají, obvykle peřenodílné až peřenosečné, čepel celokrajná



nebo vykrajovaná. Střední a horní lodyžní listy krátce řapíkaté až přisedlé, 2 krát peřenosečné, čepel celokrajná nebo zubatá. Korunní lístky cihlově červené, většinou bez tmavší skvrny při bázi; prašníky hnědě fialové, bliznových laloků 6 – 8. Bliznový terč plochý nebo uprostřed vmáčklý, výjimečně mírně vystouplý. Tobolky 2,0 – 2,3 krát delší než široké. Roste nejčastěji na suchých travnatých a křovinatých stráních, na okrajích skalních výchozů. Rozšířen je v jižní a střední Evropě a v Malé Asii (15).

Obr. 7: *Papaver confine* Jordan
(© Filip Trnka) (16)

Druh: *Papaver orientale* (L.) – mák východní, čeleď *Papaveraceae*

Vytrvalá bylina, 70 – 100 cm vysoká, celou rostlinu pokrývají tvrdé chlupy. Listy zpeřené,



30 cm dlouhé, kopinaté, okraj čepele zubatý. Na vrcholu stonku samostatný květ o průměru 10 – 15 cm, bez listenů, 2 opadavé kališní lístky, 4 – 6 obvejčitých červených korunních lístků, na bázi s různě barevnými místy. Četné tyčinky, 11 – 15 bliznových laloků. Tobolka téměř kulovitá (17).

Obr. 8: *Papaver orientale* (L.)
(© Petr Vobořil) (18)

2. LÁTKY IZOLOVANÉ Z TESTOVANÝCH DRUHŮ ROSTLIN

V tabulce č. 1 jsou uvedeny některé izolované alkaloidy druhů rostlin testovaných v této práci. Jedná se převážně o isochinolinové alkaloidy.

Tabulka č. 1: Látky izolované z testovaných druhů rostlin

Druh	Část rostliny	Izolované/identifikované látky	Citace
<i>Coptis chinensis</i> Franch.	oddenek	berberin, palmatin, jateorrhizin, epiberberin, koptisin, magnoflorin	(19)
<i>Corydalis lutea</i> (L.)	nať a kořen	koptisin, (+)-isokorydin, adlumidicein, enollakton adlumidiceinu, (+)-bikukullin, (-)-korypalmin, korysamin, (-)-isokorypalmin, jatrorrhizin, 8-oxokoptisin, 6-oxysanguinarin, protopin, (-)-stylopin, (-)-tetrahydropalmatin	(20)
<i>Corydalis solida</i> (L.)	hlíza	(+)- a (±)-tetrahydropalmatin, protopin, (+)-korydalin, allokryptopin, dehydrokorydalin, jatrorrhizin, (±)-korybulbin, (+)-korypalmin, (-)-isokorypalmin, (-)-skulerin, (-)-stylopin, korysamin, palmatin, (+)- <i>N</i> -methyllaudanidinium hydroxid, (-)- <i>cis-N</i> -methylkanadinium hydroxid a <i>cis-N</i> -methylstylopinium hydroxid, bulbokapnin, koptisin, berberin a kolumbamin	(21)

Tabulka č. 1: pokračování

Druh	Část rostliny	Izolované/identifikované látky	Citace
<i>Corydalis solida</i> (L.)	nat'	berberin, koptisin, (-)- a (±)-kanadin, (-)-stylopin, isoboldin, protopin, kolumbamin, (-)- <i>cis-N</i> -methylkanadinium hydroxid, allokryptopin, (-)-isokorypalmin, (+)-korypalmin, (±)- a (-)-tetrahydropalmatin, korysamin, dehydrothaliktrikavin, palmatin, <i>cis-N</i> -methylstylopinium hydroxid, jatrorrhizin, bulbokapnin	(21)
<i>Corydalis yanhusuo</i> W. T. Wang	hlíza	dihydrochelerythrin, dehydrokorydalin, tetrahydrokolumbamin, isokorybulbin, korydalin, tetrahydrokoptisin, jatrorrhizin, koptisin, berberin, palmatin, tetrahydropalmatin	(22)
<i>Galucium corniculatum</i> (L.)	nat'	bulbokapnin, dicentrin, protopin, korydin, isokorydin, glaucin, α -allokryptopin, <i>O</i> -methylflavinantin	(23)
<i>Papaver argemone</i> (L.)	kořen	korytuberin, magnoflorin, protopin, isokorydin, skulerin, allokryptopin, kryptopin, koptisin, rhoeadin, papaverrubiny C, D a E	(24)
<i>Papaver confine</i> Jordan	nat'	rhoeadin, isokorydin, aporhein, stylopin, papaverrubiny A a E, korydin, protopin, kryptopin, thebain, skulerin, berberin, koptisin, korysamin, korytuberin	(25)

Tabulka č. 1: pokračování

Druh	Část rostliny	Izolované/identifikované látky	Citace
<i>Papaver confine</i> Jordan	tobolka	thebain, allokryptopin, kryptopin, protopin, rhoeadin, berberin, koptisin, korytuberin	(25)
<i>Papaver orientale</i> (L.)	kořen	thebain, isothebain, alpinigenin, oripavin, papaverrubiny G, A, B, D a C, brakteolin, skulerin, palmatin, koptisin, <i>N</i> -methylthebainium jodid, <i>N</i> -methylisothebainium jodid, korytuberin, magnoflorin	(26)
	zelené tobolky a 5cm stonek	thebain, isothebain, alpinigenin, oripavin, papaverrubiny G, A, B, D a C, brakteolin, isoboldin, skulerin, palmatin, koptisin, korytuberin, <i>N</i> -methylthebainium jodid, magnoflorin, <i>N</i> -methylisothebainium jodid	(26)

Benzylisochinolinové alkaloidy zahrnují skupinu sekundárních metabolitů, převážně druhu *Papaver*, s přibližně 2500 strukturami. Některé z nich mají významné farmakologické účinky (27). V následující tabulce č. 2 jsou uvedeny struktury některých alkaloidů izolovaných z druhů rostlin sledovaných v této práci.

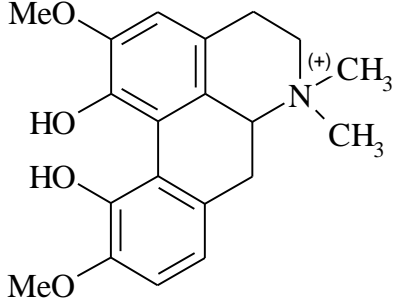
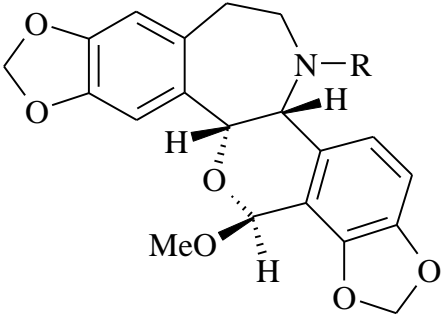
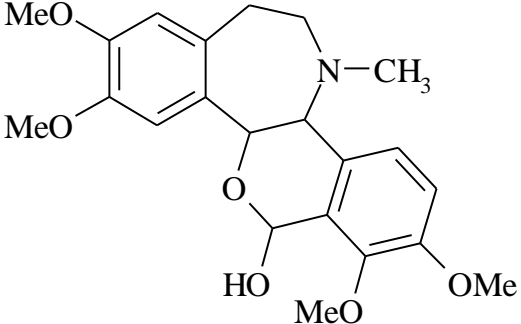
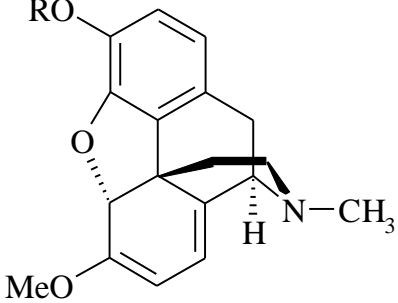
Tabulka č. 2: Chemické vzorce některých alkaloidů izolovaných z testovaných druhů rostlin

Chemický vzorec	R	Alkaloid
	$R^1 = R^2 = R^3 = R^4 = \text{CH}_3$, $R^5 = \text{H}$	tetrahydropalmatin
	$R^1 = R^2 = R^3 = R^4 = R^5 = \text{CH}_3$	korydalin
	$R^1 = R^3 = R^4 = R^5 = \text{CH}_3$, $R^2 = \text{H}$	korybulbin
	$R^1 = R^3 = R^4 = \text{CH}_3$, $R^2 = R^5 = \text{H}$	korypalmin
	$R^1 = R^5 = \text{H}$, $R^2 = R^3 = R^4 = \text{CH}_3$	isokorypalmin
	$R^1 = R^3 = R^5 = \text{H}$, $R^2 = R^4 = \text{CH}_3$	skulerin
	$R^1 + R^2 = R^3 + R^4 = \text{CH}_2$, $R^5 = \text{H}$	stylopin
	$R^1 + R^2 = \text{CH}_2$, $R^3 = R^4 = \text{CH}_3$, $R^5 = \text{H}$	kanadin
		(+)- <i>N</i> -methylaudanidium iodid
	$R^1 + R^2 = \text{CH}_2$	protopin
	$R^1 = R^2 = \text{CH}_3$	allokryptopin

Tabulka č. 2: pokračování

Chemický vzorec	R	Alkaloid
	$R^1 = R^2 = R^3 = R^4 = R^5 = \text{CH}_3, X = \text{Cl}$	dehydrokorydalin chlorid
	$R^1 + R^2 = R^3 + R^4 = \text{CH}_2, R^5 = \text{H}, X = \text{Cl}$	korysamin chlorid
	$R^1 = R^2 = R^3 = R^4 = \text{CH}_3, R^5 = \text{H}, X = \text{Cl}$	palmatin chlorid
	$R^1 = R^3 = R^4 = \text{CH}_3, R^2 = R^5 = \text{H}, X = \text{I}$	jatrorrhizin iodid
	$R^1 + R^2 = \text{CH}_2, R^3 = R^4 = \text{CH}_3, R^5 = \text{H}$	berberin
	$R^1 = R^2 = \text{CH}_3, R^3 + R^4 = \text{CH}_2, R^5 = \text{H}$	epiberberin
	$R^1 + R^2 = R^3 + R^4 = \text{CH}_2, R^5 = \text{H}$	koptisin
	$R^1 + R^2 = \text{CH}_2, R^3 = R^4 = R^5 = \text{CH}_3, X = \text{Cl}$	dehydrothaliktrikavin chlorid
$R^1 = R^5 = \text{H}, R^2 = R^3 = R^4 = \text{CH}_3, X = \text{I}$	kolumbamin iodid	
	$R^1 = R^2 = \text{CH}_3$	(-)- <i>cis</i> - <i>N</i> -methylkanadinium iodid
	$R^1 + R^2 = \text{CH}_2$	<i>cis</i> - <i>N</i> -methylstylopinium iodid
	$R^1 = \text{CH}_3, R^4 = \text{OCH}_3, R^2 = R^3 = R^5 = \text{H}$	isoboldin
	$R^1 = R^2 = \text{CH}_3, R^4 = \text{OCH}_3, R^3 = R^5 = \text{H}$	isokorydin
	$R^1 = R^2 = R^3 = \text{CH}_3, R^4 = \text{OCH}_3, R^5 = \text{H}$	glaucin
	$R^1 + R^2 = \text{CH}_2, R^3 = \text{H}, R^4 = \text{OH}$	aporhein
	$R^1 = R^3 = \text{CH}_3, R^2 = R^4 = R^5 = \text{H}$	isothebain

Tabulka č. 2: pokračování

Chemický vzorec	R	Alkaloid
		magnoflorin
	R = CH ₃	rhoeadin
	R = H	papaverrubin A
		alpinigenin
	R = CH ₃	thebain
	R = H	oripavin

3. BIOLOGICKÁ AKTIVITA VYBRANÝCH ROSTLIN

Alkaloidy z kořene *Coptis chinensis* Franch. vykazaly antiprotozoální, antihypertenzní, anticholinergní, antiarytmickou a protinádorovou aktivitu. Jeden z hlavních alkaloidů, berberin má silnou protizánětlivou a antimikrobní aktivitu a účinně snižuje hladinu cholesterolu v krvi mechanismem odlišným od statinů. Dále experiment dokázal, že čistý berberin stimuluje nejen sekreci inzulínu, ale také modulaci lipidů. (28).

Z frakce monoaminoxidasových (MAO) inhibitorů v metanolovém extraktu oddenku *Coptis chinensis* Franch. byly izolovány tři protoberberinové alkaloidy – jatrorrhizin, berberin a palmatin. Jatrorrhizin vykazoval nekompetitivní inhibici MAO-A i MAO-B mitochondrií mozku potkana při hodnotách IC_{50} 4 μ M a 62 μ M. Berberin kompetitivně inhibuje pouze MAO-A při hodnotě IC_{50} 126 μ M, zatímco palmatin, vystavený hodnotám IC_{50} až do 200 μ M, neinhibuje žádný typ enzymu (29).

V rámci hledání přírodních zdrojů léčebných a preventivních látek pro diabetické komplikace, byl hodnocen inhibiční efekt izolovaných alkaloidů z *Coptis rhizoma* vůči aldose reduktasy (AR) z oční čočky potkanů. Magnoflorin a jatrorrhizin vykazaly okrajovou inhibici AR s 18% a 13% inhibicí v koncentraci 50 μ g/ml. Naopak epiberberin, koptisin a groenlandicin vykazaly dobré inhibiční aktivity s hodnotami IC_{50} 33,6 μ g/ml, 37,9 μ g/ml a 45,2 μ g/ml (19).

Extrakt z *Coptis chinensis* Franch. vykazuje silnou antibakteriální aktivitu a je užíván k léčbě dysenterie, cholery, leukemie, diabetu a rakoviny plic. Ovlivnění růstové teplotní křivky *Escherichia coli* berberinem, koptisinem a palmatinem bylo kvantitativně určeno mikrokalorimetrií (30). Stejnou metodou byl zkoumán také vliv protoberberinových alkaloidů na růst *Staphylococcus aureus*. Nejsilnější inhibiční aktivitu vykazoval berberin a koptisin (31).

Berberin a koptisin vykazovaly také silnou inhibici růstu hepatomů a leukemických buněk s kolísavými hodnotami IC_{50} od 1,4 μ g/ml do 15,2 μ g/ml a od 0,6 μ g/ml do 14,1 μ g/ml (32).

Bylo prokázáno, že berberin, koptisin a palmatin mají ochranný účinek proti peroxonitrem indukovanému poškození a zlepšuje β -amyloidem přivozenou poruchu paměti, což je spojeno

s jejich vlivem při redukování oxidativního stresu. Dále berberrubin vykazuje nejsilnější aktivitu proti hydroxylovému radikálu, následuje koptisin, berberin a palmatin. Tato aktivita isochinolinových alkaloidů těsně souvisí s jejich chelatačním účinkem na železnaté ionty (33).

Rovněž byla u *Coptis chinensis* Franch. zjištěna inhibice hemolýzy erytrocytů potkanů, potlačení peroxidace lipidů, tvorby peroxidových a hydroxylových radikálů v mozku a ledvinách potkanů. Vyvíjí ale jen mírný prooxidační účinek (34).

Surový extrakt z *Corydalis lutea* (L.) byl zkoumán na antispastickou aktivitu proti acetylcholinem indukovaným kontrakcím izolovaného hladkého svalstva ilea potkana. Dále byl podobně zkoumán i koptisin. Vysoké koncentrace koptisinu slabě antagonizovaly acetylcholinem indukované kontrakce (z 16,5 %) zatímco antispastická aktivita extraktu dosáhla 45 % (35).

Extrakty z *Corydalis solida* ssp. *solida* vykazaly silný inhibiční účinek na AChE v závislosti na dávce v mikrotitračním rozboru, methanolové extrakty z hlízy byly více aktivní než z natě (36). Při koncentraci 1 mg/ml vykazují silnou AChE inhibiční aktivitu ($87,56 \pm 1,24$ %) i BuChE inhibiční aktivitu ($93,18 \pm 0,89$ %), ale mají zanedbatelnou aktivitu obou enzymů při 10 µg/ml (37).

Z metanolového extraktu hlíz *Corydalis yanhusuo* izolované alkaloidy berberin, palmatin, jatrorrhizin, koptisin a dehydrokorydalin inhibovaly AChE aktivitu v závislosti na struktuře a IC_{50} hodnoty byly $0,47 \pm 0,01$ µM, $0,74 \pm 0,06$ µM, $2,08 \pm 0,09$ µM, $1,01 \pm 0,03$ µM a $0,62 \pm 0,05$ µM. Analýza naznačila vztah mezi strukturou a aktivitou, aromatizace kruhu C, stejně jako substituce na C-2, C-3, C-9, C-10 a C-13 ovlivňuje AChE aktivitu protoberberinových alkaloidů (38).

Bylo prokázáno, že mezolimbický dopaminergní systém hraje důležitou roli při zneužívání drog. Isochinolonové alkaloidy jsou hlavními aktivními sloučeninami extraktu *C. yanhusuo* pro

vazbu na dopaminový D-receptor. Nejvyšší afinitu vykazuje L-isokorypalmin a je tak slibným kandidátem na lék k léčbě závislosti (39).

Další studie naznačila, že ochranný efekt extraktu z *Corydalis yanhusuo* proti ischemii myokardu je těsně spojena s inhibicí apoptózy myokardu přes modulaci Bcl-2 proteinů (40).

Alkaloidy z *Corydalis yanhusuo* vykazují inhibiční aktivitu na HIV-1 reverzní transkriptasu. V koncentraci 5 mg/ml byly schopny inhibovat reverzní transkriptázu z 50% (41).

Studie formalinem-indukované bolesti u potkanů prokázala, že extrakt celkových alkaloidů z *Corydalis yanhusuo* vlastní silné antinociceptivní účinky (42).

Metanolvý extrakt *Glaucium corniculatum* (L.) vykazoval při koncentraci 1 mg/ml silný inhibiční účinek na AChE ($86,55 \pm 0,67$ %) a BuChE ($81,45 \pm 0,74$ %). Při koncentraci 10 μ g/ml mají zanedbatelnou aktivitu obou enzymů (37).

4. ALZHEIMEROVA CHOROBA

Alzheimerova choroba (AD) je progresivní neurodegenerativní poškození mozku charakterizované pozvolným zhoršováním paměti, kognitivních funkcí, vznikem neuropsychiatrických symptomů a poruch chování, omezením každodenních činností a ztrátou autonomních funkcí (43). Onemocnění začíná typicky pomalými a plíživými subtilními výpadky paměti, nedbalostí při oblékání a osobní hygieně, fázemi zmatenosti a výskytem chybných rozhodnutí. K anterográdní amnézii se přidává s postupujícím onemocněním zhoršování staré paměti a rovněž paměti procedurální. Léze v limbickém systému způsobují na jedné straně neklid, na druhé letargii. Relativně pozdě dochází k motorickým výpadkům (44).

V pokročilém onemocnění dochází k atrofii mozku s rozšířením rýh a zvětšením komor. Mikroskopicky nastane ztráta vybraných populací neuronů. Pokles synapse je v přímém vztahu s poklesem kognitivních funkcí. Klasickým patologickým znakem jsou senilní plaky, složené převážně z β -amyloidu a neurofibrilárních klubek, skládajících se z fosforylovaného τ -proteinu (45).

Úbytek neuronů je nacházen zejména v hipokampu a předním mozku. K dysfunkci neuronů dochází pro narušení jejich metabolické a iontové homeostázy a oxidačním poškozením. Toto je spojené s pozměněnou funkcí řady neurotransmiterových systémů; nejčastěji je poškozena cholinergní aktivita, a to v oblastech mozku významných pro kognitivní a paměťové funkce. Je snížena aktivita acetylcholintransferasy a denzita cholinergních receptorů, zejména v kortexu (46). Lidský mozek obsahuje dvě hlavní formy cholinesterasy: acetylcholinesterasu (AChE) a butyrylcholinesterasu (BuChE). Zatímco aktivita AChE se v mozku pacientů s AD postupně snižuje, aktivita BuChE se zvyšuje (47).

4. 1. Současné terapeutické přístupy

Inhibitory cholinesterasy

Inhibitory cholinesterasy představují první třídu léků schválených ke specifické symptomatické léčbě AD (48). Takrin byl první široce užívaný inhibitor acetylcholinesterasy. Nicméně jeho krátký biologický poločas, hepatotoxicita a cholinergní vedlejší účinky limitovaly užití tohoto léku. Druhá generace cholinergik zahrnuje donepezil, galantamin a rivastigmin. Tyto léky mají méně nežádoucích účinků, delší poločas a větší účinnost (45). Nová zkoumání ukazují, že do odbourávání acetylcholinu v mozku jsou zapojeny AChE i BuChE. Duální inhibice těchto enzymů může zvýšit účinnost léčby a rozšířit indikace (47).

Memantin

Memantin, nekompetitivní *N*-methyl-*D*-aspartat (NMDA) receptorový antagonist, představuje druhou třídu léků schválených ke specifické symptomatické léčbě Alzheimerovy choroby. Sloučenina blokuje chronickou hyperaktivitu NMDA receptorů přispívajících k symptomatice a patogenezy AD (48).

Nootropika

Dále se k léčbě AD mohou užívat nootropika. Např. meclofenoxát, pyritinol, piracetam a jeho deriváty. Jejich význam v léčbě AD ale nebyl zatím potvrzen (46).

Antioxidanty

Mnoho studií naznačuje, že oxidativní stres a akumulace volných radikálů jsou zapojeny do patofyziologie nemoci. Nadbytek volných radikálů je zodpovědný za nadměrnou peroxidaci, která může urychlovat degeneraci neuronů (49). Antioxidanty tak mohou oslabit pokles kognitivních funkcí nebo zpomalit progresy nemoci. Vitamín E v kombinaci s vitamínem C je spojený s poklesem prevalence a incidence AD (45).

Další možnosti léčby

Několik dalších léčebných opatření, které mají ovlivnit léčbu AD, představuje *Gingko biloba*, nesteroidní antiflogistika, estrogeny a statiny (48).

4. 2. Role oxidačního stresu u Alzheimerovy choroby

Zatímco oxidativní stres se vztahuje k nepatřičné oxidaci biomolekul vedoucí k buněčnému poškození, a to nastává působením reaktivních forem kyslíku (reactive oxygen species – ROS), vzrůstají histopatologické a experimentální údaje, které podporují dopad oxidace na patogenezi AD (oxidační stresová hypotéza). Buňky v mozcích AD pacientů ukazují abnormálně vysoké množství oxidačně pozměněných proteinů, lipidů a DNA. Volnými radikály zprostředkované poškození je specificky obzvláště významné v prostředí senilních plaků a neurofibrilárních klubek, což ukazuje na roli ROS v β -amyloidem zprostředkovaném neuronovém poškození a na neurofibrilární patologii. V AD bylo navrhováno několik zdrojů ROS, např. β -amyloid a redoxní kovy jako je Fe^{2+} nebo Cu^+ . Během procesu shromažďování β -amyloidu se tvoří peroxid vodíku, proces vyžaduje přítomnost kyslíku a to značně umocňuje Fe^{2+} a Cu^+ . Peroxidace lipidů indukovaná β -amyloidem narušuje funkci ATPasy, glukózy a glutamátových transportérů a také GTP-vázaných proteinů. Porušením iontové homeostázy a energetického metabolismu buňky může oxidativní stres způsobit zranitelnost neuronů k excitotoxicitě a apoptóze. Dysfunkce a degenerace synapsí v AD může zahrnovat β -amyloidem indukovaný oxidativní stres, protože vystavení synapsí β -amyloidu poškozuje funkci iontových a glutamátových membránových transportérů a ohrožuje mitochondriální funkci oxidativním stresem zprostředkovaným mechanismem (50).

K redukci oxidativního stresu spojeného s AD se používaly různé sloučeniny a antioxidanty. Mnoho z těchto činitelů ukázaly ochranu buněk před β -amyloidem indukovanou neurotoxicitou (50).

5. VOLNÉ RADIKÁLY A ANTIOXIDANTY

5.1. Volné radikály

V organismu běžně vzniká řada reaktivních forem kyslíku (reactive oxygen species – ROS) a reaktivních forem dusíku (reactive nitrogen species – RNS). Tyto látky mají značný fyziologický i patogenetický význam. Reaktivní formy kyslíku se účastní uvolňování a přeměny energie nezbytné pro životní pochody, jsou součástí enzymových mechanismů a některé z nich jsou významnými signálními molekulami v buněčném informačním systému. Za určitých okolností však působí jako toxické látky a jako dezinformační agens, schopní organismus poškodit a dokonce ho i usmrtit (51).

Radikál je jakákoli molekula, atom nebo ion, který má ve valenční sféře jeden nebo více nepárových elektronů. Jako volný radikál (VR) se označuje radikál, který je schopen samostatné existence po jakkoli krátkou dobu. Volný elektron dává radikálům jejich vysokou reaktivitu a tím i nestabilitu (52). Jen některé z ROS a RNS jsou volné radikály, tedy látky s nepárovým elektronem. V molekule některé orbitály tvoří chemické vazby mezi jednotlivými atomy. Volný radikál z těchto „normálních“ molekul vzniká trojím způsobem: homolytickým štěpením kovalentní chemické vazby, přidáním jednoho elektronu k normální molekule – redukce nebo ztrátou jednoho elektronu – oxidace. K homolytickému štěpení je potřeba hodně energie, v biologických systémech VR vznikají energeticky snadnějším způsobem – odejmutím nebo přijetím elektronu. Vznik radikálu může být iniciací celého řetězce dalších reakcí. Pokud radikál reaguje s „normální“ molekulou, nutně ji změní na radikál a radikálová reakce se tím propaguje do okolí. Reakcí dvou radikálů se nepárové elektrony spojí a vzniká „normální“ molekula. Radikálová reakce se tak ukončí – terminace (51).

5. 1. 1 **Reaktivní formy kyslíku a dusíku**

Produktem redukce molekuly kyslíku jedním elektronem je radikál superoxid $O_2^{\cdot-}$. Pokud jsou přeneseny dva elektrony, produktem je peroxid vodíku H_2O_2 , který není radikálem. Ionty železa a mědi jsou schopné přenosu třetího elektronu na peroxid vodíku, způsobují tak rozpad vazby O-O. Jedním redukováným fragmentem je voda, dalším fragmentem reakce je volný hydroxylový radikál HO^{\cdot} , což je jeden z nejsilnějších známých oxidantů. To může iniciovat peroxidaci lipidů, způsobující porušení DNA, a oxidaci prakticky každé organické molekuly (53). Mezi ROS dále patří peroxy (ROO $^{\cdot}$), alkoxy (RO $^{\cdot}$), hydroperoxy (HO $_2^{\cdot}$) a neradikálové formy jako je kyselina chlorná (HOCl), ozon (O_3) a singletový kyslík (1O_2) (51).

Mezi volné radikálové formy dusíku patří oxid dusnatý (NO $^{\cdot}$), oxid dusičitý (NO $_2^{\cdot}$). Mezi látky náležící do skupiny reaktivních forem dusíku, ale které nejsou volnými radikály, řadíme peroxyinitrit (ONOO $^-$), alkylperoxyinitrit (ROONO), nitrosyl (NO $^+$), nitroxid (NO $^-$), nitronium (NO $_2^+$), oxid dusitý (N $_2O_3$), oxid dusičitý (N $_2O_4$), kyselinu dusitou (HNO $_2$) (54).

5. 1. 2 **Fyziologické funkce volných radikálů**

Funkčně poslední enzym dýchacího řetězce ve vnitřní mitochondriální membráně cytochromoxidasu přijímá elektrony pocházející ze živin a předává je na molekulární kyslík. Redukuje ho čtyřmi elektrony za vzniku dvou molekul vody, přičemž se uvolní energie pro syntézu ATP. Monooxygenasy podobným způsobem aktivují kyslík v endoplazmatickém retikulu jater nebo v mitochondriích nadledviny. V tomto případě je dioxygen redukován třemi elektrony na úroveň hydroxylového radikálu, který je použit k hydroxylaci řady endogenních a exogenních látek včetně léků (51).

Neutrofilní leukocyty a makrofágy používají ROS k odstraňování zbytků mrtvých buněk a k zabíjení bakterií. Jejich plazmatická membrána je vybavena enzymovým komplexem NADPH-oxidasou, obsahující flavocytochrom b_{558} . Tento komplex se po pohlcení částice aktivuje a

redukuje dioxygen na superoxid. Ten se pohotově mění na peroxid vodíku. Kyselé prostředí podporuje uvolnění iontů železa, které vede k tvorbě hydroxylového radikálu. U polymorfonukleárních leukocytů po splnutí fagosomu s jinými vakuolami do systému vstoupí ještě myeloperoxidasa, která katalyzuje tvorbu kyseliny chlorné z peroxidu vodíku a chloridového iontu (51).

Buněčné pochody jsou řízeny mnoha extracelulárními a intracelulárními signály, které prostřednictvím buněčné molekulární informační sítě ovlivňují aktivitu enzymů a expresi genů a tím pak i životní program buňky. Stav oxidoredukčního prostředí a RONS se na tomto řízení podílí buď přímo, nebo ovlivněním regulačních molekul. Radikál oxid dusnatý (NO•) je jednou z důležitých signálních molekul, v organismu působí ve třech funkčních oblastech, odpovídajících přítomnosti jeho jednotlivých syntas (NOS I, NOS II, NOS III). V několika oblastech CNS a v autonomním nervovém systému je syntetizována konstitutivní NOS I a plní zde funkci zvláštního neurotransmiteru. Ovlivňuje tak syntézu jiných neurotransmiterů a diferenciaci neuronů, genovou expresi, učení a dlouhodobou paměť, vyvolává relaxaci střevní hladké svaloviny včetně sfinkterů, je nezbytný pro vazodilataci cév corpus cavernosum. NO• produkovaný enzymem NOS III je významným vazodilatátorem, inhibitorem agregace a adheze trombocytů a inhibitorem adheze leukocytů na povrch endotelových buněk a má antiproliferativní účinek na buňky hladké cévní svaloviny (51).

5. 1. 3 Patologické působení volných radikálů

Porušení rovnováhy mezi vznikem a odstraňováním RONS se nazývá oxidační stres. Může být vyvolán nadměrnou produkcí RONS, nedostatečnou funkcí antioxidačního ochranného systému nebo kombinací obou těchto nedostatků. K nadměrné tvorbě ROS dochází při některých metabolických situacích, při reoxygenaci tkáně po ischemii, po příjmu oxidoredukčně aktivních xenobiotik nebo uvolnění železa, mědi či jiných tranzitních prvků do oxidoredukčně aktivních forem. Také nadměrná syntéza NO• je škodlivá (51).

Onemocnění, spojená s významnou účastí radikálových reakcí na jejich patogenezi, jsou chronická pankreatitida, diabetes mellitus, glomerulonefritidy, ateroskleróza, hypertenze, Crohnova choroba, ulcerózní kolitida, poškození jater, neurodegenerativní onemocnění (Parkinsonova choroba, AD) a mnoho dalších patofyziologických stavů (51).

5. 2. Antioxidační systém organismu

Organismus používá tři možné typy ochrany proti RONS. Nejbezpečnějším způsobem je zabránění tvorbě nadměrného množství RONS např. regulací aktivity enzymů, které je tvoří, nebo vychytáváním tranzitních prvků z reaktivních pozic. Druhou možností je záchyt a odstranění radikálů, které se již vytvořily. Na antioxidační ochraně se podílejí též obecné reparační mechanismy poškozených molekul (51).

5. 2. 1 Enzymové antioxidační systémy

Mezi antioxidační enzymy patří superoxiddizmutasy (SOD1 a SOD2), glutathionperoxidasy, glutathiontransferasy (GST) a katalasa. SOD se podílí na dizmutaci superoxidu na dioxygen a peroxid vodíku. Intracelulární hydroperoxydy jsou odstraňovány dvěma glutathionperoxidasami. GST je spotřebována při ochranných redukčních reakcích i při odstraňování produktů peroxidace. Katalasa umožňuje dizmutaci peroxidu na dioxygen a vodu, může také katalyzovat peroxydasové reakce (51).

5. 2. 2 Vysokomolekulární endogenní antioxidanty

Řada proteinů je schopna vázat přechodné prvky (železo a měď) a měnit jejich oxidoredukční vlastnosti tak, že tyto prvky přestanou katalyzovat radikálové reakce. Řadí se

mezi ně transferin, laktoferin, ferritin, ceruloplazmin, albumin, metalothioneiny. Prooxidačně působící hemoglobin vychytává haptoglobin a uvolněný hem váže hemopexin (51).

5. 2. 3 Nízkomolekulární endogenní antioxidanty

K nízkomolekulárním antioxidantům patří askorbát (vitamin C), α -tokoferol a vitamin E, ubichinon/ubichinol (koenzym Q), karotenoidy, β -karoten a vitamin A, thioly a sulfidy (např. glutathion (GSH) a kyselina lipoová), melatonin, kyselina močová (urát), bilirubin (51).

Antioxidační účinek askorbátu spočívá v tom, že redukuje anorganické i organické radikály. Regeneruje také tokoferolový radikál. Při těchto reakcích ztratí elektron a změní se na askorbylový radikál, který je mnohem méně reaktivní než radikály, které redukoval. Regeneruje se speciální dehydrogenasou za účasti NADH zpět na askorbát nebo dizmutuje na askorbát a dehydroaskorbát. α -tokoferol je antioxidační látkou membrán. Při peroxidaci lipidů přeměňuje alkylperoxylové radikály na hydroperoxydy, které jsou odstraněny glutathionperoxidasou. Koenzym Q se vyskytuje ve všech membránách, kde tlumí radikálové reakce ve spolupráci s tokoferolem. Karotenoidy se v antioxidační ochraně uplatňují při odstraňování radikálů centrovaných na uhlík a alkylperoxylových radikálů v lipidech. Glutathion odstraňuje ROS, udržuje v redukované formě sulfhydrylové skupiny proteinů, cysteinu, koenzymu A a regeneruje tokoferol a askorbát. Kyselina lipoová je univerzálním antioxidantem, protože reaguje s alkylperoxylovými radikály, askorbylovými radikály, $\text{HO}\cdot$, $\text{NO}\cdot$, tokoferolovými radikály, $\text{O}_2\cdot^-$ a HClO . Melatonin při farmakologických hladinách vychytává hydroxylové radikály. Antioxidační schopnosti kyseliny močové spočívají ve vychytávání $\text{RO}\cdot$ a HClO a ve vazbě železa a mědi do formy, která nepodporuje radikálové reakce. Bilirubin inhibuje peroxidaci lipidů tím, že regeneruje α -tokoferol obsažený v lipoproteinech (51).

5. 3. Exogenní antioxidanty

5. 3. 1 Syntetické antioxidanty

Mezi syntetické antioxidanty patří např. stobandin, nitekapon, dimethylsulfoxid, ebselen, oltipraz, nitroxidy, thiopronin a přídavné konzervační prostředky do potravin BHA (2-(3)-*terc*-butyl-4-hydroxyanizol) a BHT (3,5-di-*terc*-butyl-4-hydroxytoluen) (51).

Také mnoho léčiv má prokázané antioxidační účinky. Probukol je lapačem hydroxylového radikálu, snižuje hladinu cholesterolu a inhibuje tvorbu oxidativně modifikovaného LDL (low density lipoprotein). Tímto mechanismem působí antiskleroticky. Chelatační látky mohou snižovat tvorbu VR vyvázáním přechodných kovů, především volného železa a mědi. Užívá se např. kyselina etylendiamintetraoctová (EDTA), desferoxamin, penicillamin a dexrazoxan. Dalšími syntetickými antioxidanty jsou inhibitory xantinoxidoreduktasy (XOD) – allopurinol, oxypurinol a dále kyselina listová, pterin-6-aldehyd, amflutizol a wolfram. *N*-acetylcystein je významným zdrojem cysteinu pro syntézu glutathionu, tím působí antioxidačně. Kyselina 5-aminosalicylová a sulfasalazin mají výrazný protizánětlivý účinek. Inhibují totiž tvorbu RONS, cytokinů, prostaglandinů, adhezních molekul, lipoxygenasovou aktivitu, rozkládají kyselinu chlornou a mají též chelatační účinky na železo. Inhibitory tvorby radikálů enzymem NADPH-oxidase v neutrofilech a makrofázích zahrnují nesourodou řadu látek: adenosin, lokální anestetika, blokátory kalciového kanálu, nesteroidní antiflogistika a také monoklonální protilátky proti NADPH-oxidase (52).

5. 3. 2 Přírodní antioxidanty

Mnoho látek rostlinného původu má antioxidační účinky. Nejznámější jsou flavonoidy, silymarin a *Ginkgo biloba*.

Flavonoidy mají aromatický charakter molekuly, odvozený od 2-fenylchromonu. Jsou schopné vázat přechodné kovy, indukovat a ovlivňovat některé enzymy, inhibovat XOD, lipoxygenasu a lipoperoxidaci. Mají protizánětlivý, protisklerotický a protinádorový účinek. Standardizovaný extrakt z *Ginkgo biloba* preventivně působí u psychických poruch, ve stáří, u periferního vaskulárního poškození, zlepšuje reologické vlastnosti krve a snižuje lipoperoxidaci. Silymarin lapá singletový kyslík, inhibuje lipoperoxidaci, chelatuje kovy, zvyšuje syntézu proteinů v hepatocytech a má imunomodulační účinky (52).

IV. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

1. POTŘEBY

1. 1. Chemikálie

2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl radikál (Sigma-Adrich)

5 mM 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina, $\geq 98\%$ (Sigma-Aldrich)

Citrát sodný 3,8% (Hoechst-Biotika, SK)

Dusičnan bismutitý zásaditý č. (Sigma, CZ)

0,1 M fosfátový pufr, pH 7,4 (chemikálie pro přípravu pufru: dihydrát dihydrogenfosforečnanu sodného, p.a. (Lachema); dodekahydrát hydrogenfosforečnanu disodného, p.a. (Lachema))

Galantamin hydrobromid (Changsha Organic Haerb Inc., China)

Huperzin A (TAZHONGHUI – Tai'an zhonghui Plant Biochemical Co., Ltd., China)

Jodid draselný č. (Sigma, CZ)

Kvercetin (Sigma-Adrich)

Kyselina askorbová (Sigma-Aldrich)

Kyselina vinná č. (Sigma, CZ)

Peroxodisíran draselný 99% (Sigma, CZ)

Síran sodný bezvodý č. (Lachema, CZ)

Trolox (Sigma-Adrich)

Uhlíčitan sodný č. (Sigma, CZ)

1. 2. Rozpouštědla

Cyklohexan č. (Penta, CZ)

Diethylamin č. (Penta, CZ)

Ethanol (EtOH) 96% denaturovaný methanolem (Penta, CZ)

Ether p. a. (Penta, CZ)

Ethylacetát p. a. (Penta, CZ)

Chloroform (CHCl₃) (Penta, CZ)

Kyselina chlorovodíková p. a. (Penta, CZ)

Toluen č. (Penta, CZ)

Voda superčistá (voda)

1. 3. Přístrojové vybavení

- Reader SynergyTM HT Multi-Detection Microplate Reader (BioTek, USA)
- Ultrazvuková lázeň SONOREX Super 10P (Bandelin, Německo).
- Vakuová odparka Rotavapor R-114 a vodní lázeň Waterbath B-480 (Büchi, Švýcarsko).

1. 4. Detekční činidlo

Dragendorffovo činidlo podle Muniera

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

Roztok B: 16 g jodidu draselného bylo rozpuštěno ve 40 ml destilované vody.

Zásobní roztok byl připraven smícháním roztoku A a B v poměru 1:1 (v/v), který může být uchováván po několik měsíců v lednici.

Detekční roztok byl připraven rozpuštěním 10 g kyseliny vinné v 50 ml destilované vody a přidáním 5 ml zásobního roztoku. Alkaloidy byly po reakci s detekčním činidlem zbarveny oranžově (55).

1. 5. Vytvářecí soustava pro tenkovrstvou chromatografii

Soustava č. 1: cyklohexan : diethylamin (95 : 5)

Soustava č. 2: toluen : diethylamin (95 : 5)

1. 6. Chromatografický adsorbent

TLC desky - oxid hlinitý 60, F254, neutrální (Merck, Německo)

1. 7. Testované drogy

V rámci této práce byly testovány extrakty z:

Coptis chinensis – oddenek, *Corydalis lutea* – nať, *Corydalis lutea* – kořen, *Corydalis solida* – hlíza, *Corydalis solida* – nať, *Corydalis yanhusuo* – hlíza, *Glaucium corniculatum* – nať, *Papaver argemone* – kořen, *Papaver conifine* – nať, *Papaver conifine* – tobolka, *Papaver orientale* – kořen, *Papaver orientale* – zelené tobolky a 5cm stonek

2. METODY

2. 1. Příprava extraktů

2. 1. 1 Příprava ethanolového extraktu

Do varné baňky byla vsypána odvážená rozmixovaná a usušená droga. Byla přidána polovina odměřeného 96% EtOH (poměr drogy (g) : 96% EtOH (ml) = 1 : 15) a směs se vařila pod zpětným chladičem na vodní lázni 15 minut. Po této době byla baňka vyjmuta z vodní lázně a ponechala se asi 15 minut zchladnout. Droga se nechala zdekantovat a tekutina byla zfiltrována přes křemelinu na filtračním tubusu za sníženého tlaku do varné baňky. Droga byla přelita druhou polovinou 96% EtOH a znovu se vařila pod zpětným chladičem na vodní lázni 15 minut. Po zchladnutí byla baňka převedena do ultrazvukové lázně nastavené na 40 °C, stupeň intenzity 10 a sonikovala se po dobu 10 minut. Extrakt byl zfiltrován přes křemelinu a pevný podíl byl promyt 96% EtOH. Z prvního filtrátu bylo Pasteurovou pipetou převedeno tolik ml tohoto extraktu do třech ampulek o objemu 3 ml, aby konečný odparek v prvních dvou ampulkách vážil alespoň 10 mg a odparek v třetí ampulce vážil alespoň 30 mg. Odpaření EtOH bylo provedeno na vodní lázni (60°C) odfoukáváním Pasteurovou pipetou. Druhý filtrát byl přidán k prvnímu a extrakty se nechaly odpařit na vakuové rotační odparce do malého vodného zbytku. Ten byl poté převeden do 10 ml penicilinky, případná usazenina v baňce byla rozpuštěna v malém množství chloroformu a převedena též do penicilinky. Vše se pak nechalo odpařit na vodní lázni do sucha. Penicilinka a tři ampulky byly sušeny ve vakuovém exikátoru (min. 16 hodin), dobře uzavřené se uchovávaly v lednici.

2. 1. 2 Příprava alkaloidního extraktu

Suchý etanolový extrakt byl rozpuštěn v 2% HCl a převeden do třepací baňky, byl přidán ether a vše se třikrát protřepalo. Vodná fáze byla oddělena, zalkalizována 10% Na₂CO₃ na pH

9 – 10 a třikrát vytřepána s ethylacetátem. Ethylacetátová fáze byla oddělena, bylo přidáno malé množství bezvodého Na_2SO_4 a baňka se protřepávala do vyčechení kapaliny. Poté byl EtOAc roztok alkaloidů zfiltrován a odpařen na vakuové odparce do malého objemu. Tento roztok byl převeden do dvou 3ml ampulek tak, aby konečný odparek vážil alespoň 10 mg, zbytek do penicilinky a za odfoukávání na vodní lázni se extrakt vysušil. Obsah ampulek a penicilinky byl sušen ve vakuovém exsikátoru a poté dobře uzavřen a uchováván v lednici.

2. 2. Rozdělení alkaloidů vybraných vzorků na TLC

Vybrané vzorky pro tenkovrstvou chromatografii (TLC) byly připraveny rozpuštěním 1 mg alkaloidního extraktu v 1 ml 96% EtOH. Tenkovrstvá chromatografie byla prováděna vzestupným způsobem v chromatografické komoře sycené 60 minut parami eluční soustavy.

Adsorbent: TLC desky - oxid hlinitý 60, F254, neutrální (Merck, Německo)

Dráha: 100 mm

Soustava č. 1: cyklohexan : diethylamin (95 : 5)

Soustava č. 2: toluen : diethylamin (95 : 5)

Detekční činidlo: Dragendorffovo činidlo podle Muniera

2. 3. Stanovení inhibiční aktivity ethanolových a alkaloidních extraktů vůči erytrocytární AChE a sérové BuChE

2. 3. 1 Materiál použitý pro stanovení cholinesterasové inhibiční aktivity

Jako zdroj acetylcholinesterasy byla použita pouzdra lidských erytrocytů. Zdrojem butyrylcholinesterasy byla lidská plazma.

Měření bylo prováděno v mikrotitračních destičkách.

2. 3. 2 Přístroj použitý pro stanovení cholinesterasové inhibiční aktivity

Reader SynergyTM HT Multi-Detection Microplate Reader (BioTek, USA)

2. 3. 3 Podmínky měření

Experimenty byly prováděny za těchto podmínek:

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

2. 3. 4 Příprava erytrocytárních pouzder

Erytrocytární pouzdra byla připravena z čerstvě odebrané krve, ke které byl přidán 1 ml citrátu sodného na 10 ml krve podle lehce upravené metody Stecka a Kanta (56). Plazma (HuBuChE) byla odstraněna z plné krve centrifugací při rychlosti 4000 ot./min za použití centrifugy Boeco U-32R s rotorem Hettich 1611. Erytrocyty byly přemístěny do 50ml zkumavek

a třikrát promyté 5mM fosfátovým pufrům (pH 7,4) obsahujícím 150 mM chloridu sodného (12 000 ot./min., Avanti J-301, rotor JA-30.50). Promyté erythrocyty byly míchány s 5mM fosfátovým pufrům (pH 7,4) po dobu 10 minut, čímž došlo k jejich lýze. Následně byly centrifugovány rychlostí 20 000 ot./min a vzniklá pouzdra (HuAChE) byla třikrát promyta fosfátovým pufrům.

2. 3. 5 Stanovení cholinesterasové inhibiční aktivity (hodnoty IC₅₀)

Pro stanovení hodnoty IC₅₀ byla použita Ellmanova spektrofotometrická metoda s použitím 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoové kyseliny (DTNB) (57). Jako substráty se používají estery thiocholinu, které jsou cholinesterasami štěpeny na thiocholin a příslušnou kyselinu. Stanovuje se SH- skupina thiocholinu, která se naváže na DTNB za vzniku žlutě zbarveného produktu, který se stanovuje spektrofotometricky při vlnové délce 436 nm. Sleduje se nárůst absorbance za 1 minutu. Hodnoty IC₅₀ byly vypočítány z naměřených hodnot poklesu aktivity acetylcholinesterasy nebo butyrylcholinesterasy nelineární regresí v programu GraphPad Prism (verze 5.04 pro Windows; výrobce Graph Pad Software, San Diego, CA, USA). % I (inhibice) byla počítána dle vzorce. Výsledky byly porovnány s hodnotami IC₅₀ známých inhibitorů cholinesteras: galataminem (IC₅₀ HuAChE = 2,59 ± 0,065 µg/ml, HuBuChE = 58,02 ± 1,30 µg/ml), huperzinem A (IC₅₀ HuAChE = 0,061 ± 0,001 µg/ml, HuBuChE >1000 µg/ml). %I = 100-(ΔA_{BL}/ΔA_{SA})*100, kde ΔA_{BL} je nárůst absorbance slepého vzorku za 1 minutu a ΔA_{SA} je nárůst absorbance měřeného vzorku.

2. 4. Stanovení antioxidační aktivity ethanolových a alkaloidních extraktů

2. 4. 1 Přístroje použité pro stanovení antioxidační aktivity

Reader SynergyTM HT Multi-Detection Microplate Reader (BioTek, USA)

2. 4. 2 Stanovení antioxidační aktivity (EC₅₀)

Antioxidační aktivita byla testována *in vitro* DPPH testem. Metoda je založena na reakci stabilního 2,2'-difenyl-1-pikrylhydrazylu (DPPH) se vzorkem. Snížení absorbance DPPH měřené při 525 nm je závislé na koncentraci antioxidantu ve sledovaném vzorku. Antiradikálová aktivita vzorků byla vyjádřena jako 50% účinná koncentrace (EC₅₀), která byla vypočítána pomocí programu GraphPad Prism 5.04, a byla porovnána se známými antioxidanty: kvercetinem EC₅₀ = 3,36 ± 0,8 µg/ml, kyselinou askorbovou EC₅₀ = 9,01 ± 0,58 µg/ml a troloxem EC₅₀ = 5,12 ± 0,33 µg/ml.

V. VÝSLEDKY

1. MNOŽSTVÍ ZÍSKANÝCH EXTRAKTŮ

Tabulka č. 3: Výtěžky extrakcí

Druh/část rostliny	Navážka drogy (g)	Ethanolový extrakt (g)	Alkaloidní extrakt (g)
<i>Coptis chinensis</i> /oddenek	2,8588	0,3539	0,0235
<i>Corydalis lutea</i> /kořen	1,8886	0,2273	0,0154
<i>Corydalis lutea</i> /nať	18,6330	2,5541	0,2400
<i>Corydalis solida</i> /hlíza	6,0526	0,7782	0,0331
<i>Corydalis solida</i> /nať	6,3753	1,0539	0,0287
<i>Corydalis yanhusuo</i> /hlíza	8,9908	0,1672	0,0081
<i>Glaucium corniculatum</i> /nať	15,1221	1,5239	0,1605
<i>Papaver argemone</i> /kořen	1,1283	0,0685	--
<i>Papaver confine</i> /kořen	5,3402	0,3289	0,0062
<i>Papaver confine</i> /nať	17,0408	1,3281	0,0151
<i>Papaver confine</i> /tobolka	13,1591	0,6760	0,0061
<i>Papaver orientale</i> /kořen	3,8486	0,6030	0,0308
<i>Papaver orientale</i> /zelené tobolky a	10,4510	0,6257	0,0266

-- - extrakt nebyl připraven pro nedostatek materiálu

2. VÝSLEDKY DETEKCE ALKALOIDŮ NA TLC

Rozdělením alkaloidů na TLC a následující detekcí bylo získáno spektrum alkaloidů některých testovaných rostlin. Pomocí dvou vyvíjecích soustav odlišné polaritě bylo možné na TLC částečně rozlišit počet přítomných alkaloidů v extraktech rostlin. Vyvinuté chromatogramy jsou na obrázcích 9 a 10.

Vysvětlivky k obrázkům 9 a 10:

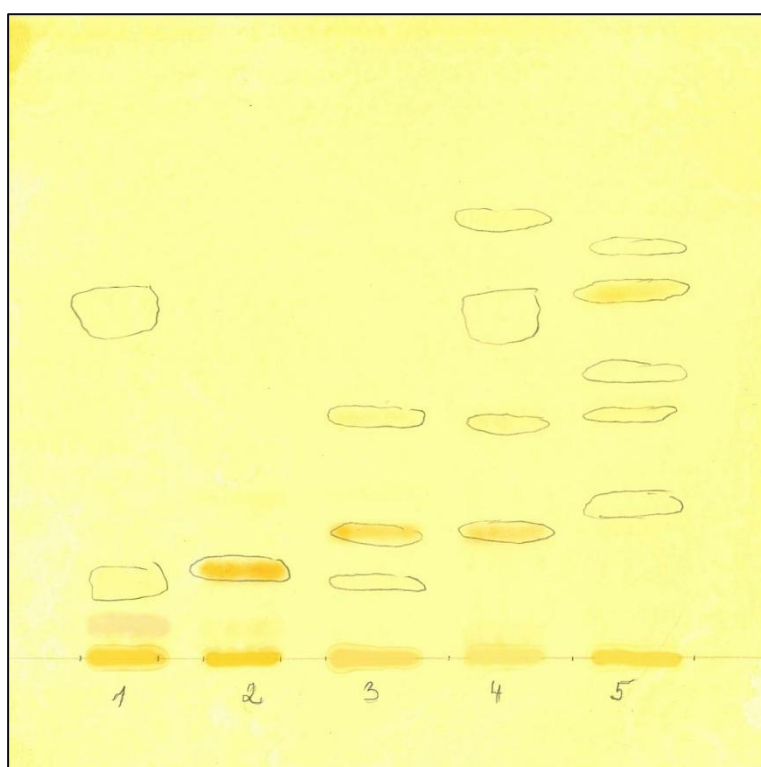
1 = *Coptis chinensis*/oddenek

2 = *Papaver orientale*/zelené tobolky

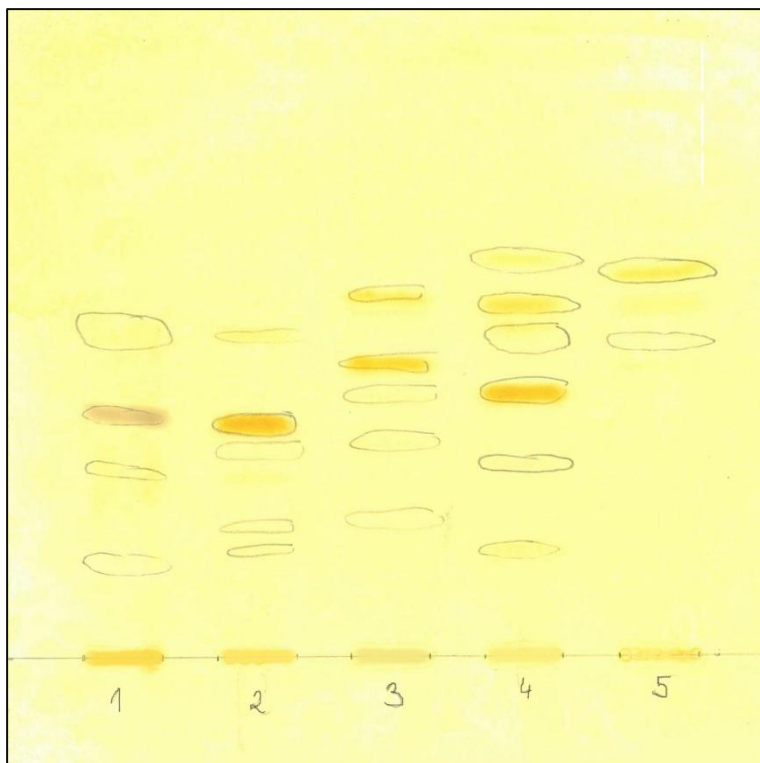
3 = *Glaucium corniculatum*/nať

4 = *Corydalis lutea*/nať

5 = *Corydalis solida*/hlíza



Obr. 9: Detekce alkaloidů – vyvíjecí soustava č. 1



Obr. 10: Detekce alkaloidů – vyvíjecí soustava č. 2

Počet alkaloidů rozlišených z extraktů jednotlivých druhů rostlin:

Coptis chinensis – oddenek: 4

Papaver orientale – zelené tobolky: 5

Glaucium corniculatum – nať: 5

Corydalis lutea – nať: 6

Corydalis solida – hlíza: 5

3. VÝSLEDKY STANOVENÍ INHIBIČNÍ AKTIVITY ETHANOLOVÝCH A ALKALOIDNÍCH EXTRAKTŮ VŮČI ERYTROCYTÁRNÍ ACHE A SÉROVÉ BUCHE

Tabulka č. 4: Výsledky stanovení cholinesterasové inhibiční aktivity – AChE

Druh/část rostliny	ethanолоvý extrakt		alkaloidní extrakt	
	%I 500 µg/ml	IC ₅₀ µg/ml	%I 500 µg/ml	IC ₅₀ µg/ml
<i>Coptis chinensis</i> /oddenek	100	1,46	99,26	2,72
<i>Corydalis lutea</i> /kořen	87,5	30,08	85,54	55,72
<i>Corydalis lutea</i> /nať	82,2	57,42	86,69	36,66
<i>Corydalis solida</i> /hlíza	90,15	17,81	100	11,83
<i>Corydalis solida</i> /nať	95,38	11,47	88,53	5,23
<i>Corydalis yanhusuo</i> /hlíza	99,59	9,87	95,55	13,04
<i>Glaucium corniculatum</i> /nať	99,61	0,39	91,3	17,73
<i>Papaver argemone</i> /kořen	58,5	330,7	nd	nd
<i>Papaver confine</i> /kořen	36,32	> 500	41,83	> 500
<i>Papaver confine</i> /nať	22,05	> 500	61,07	290,7
<i>Papaver confine</i> /tobolka	37,09	> 500	54,15*	212,7
<i>Papaver orientale</i> /kořen	38,34	> 500	56,85	320,1
<i>Papaver orientale</i> /zelené tobolky + 5 cm stonek	47,06	> 500	70,97	126,8

nd - aktivita nebyla stanovena, * %I 250 µg/ml

Tabulka č. 5: Hodnoty cholinesterasové inhibiční aktivity standardů – AChE

standard	galantamin	IC ₅₀ µg/ml	2,59 ± 0,065
	huperzin A	IC ₅₀ µg/ml	0,061 ± 0,001

Tabulka č. 6: Výsledky stanovení cholinesterasové inhibiční aktivity – BuChE

Druh/část rostliny	ethanolvý extrakt		alkaloidní extrakt	
	%I 500 µg/ml	IC ₅₀ µg/ml	%I 500 µg/ml	IC ₅₀ µg/ml
<i>Coptis chinensis</i> /oddenek	100	14,61	100	4,08
<i>Corydalis lutea</i> /kořen	91,69	73,29	91,05	44,08
<i>Corydalis lutea</i> /nať	89,74	105,6	100	14,34
<i>Corydalis solida</i> /hlíza	71,37	201,6	91,61	103,3
<i>Corydalis solida</i> /nať	84,62	128,8	100	7,59
<i>Corydalis yanhusuo</i> /hlíza	98,3	66,84	97,63	68,75
<i>Glaucium corniculatum</i> /nať	99,71	4,27	88,28	31,41
<i>Papaver argemone</i> /kořen	64,98	322,5	nd	nd
<i>Papaver confine</i> /kořen	71,81	159,8	87,26	36,45
<i>Papaver confine</i> /nať	49,12	> 500	89	40,99
<i>Papaver confine</i> /tobolka	59,94	332,6	67,33*	84,85
<i>Papaver orientale</i> /kořen	91,8	34,48	97,57	7,28
<i>Papaver orientale</i> /zelené tobolky + 5 cm stonek	85,12	68,16	100	1,78

nd - aktivita nebyla stanovena, * %I 250 µg/ml

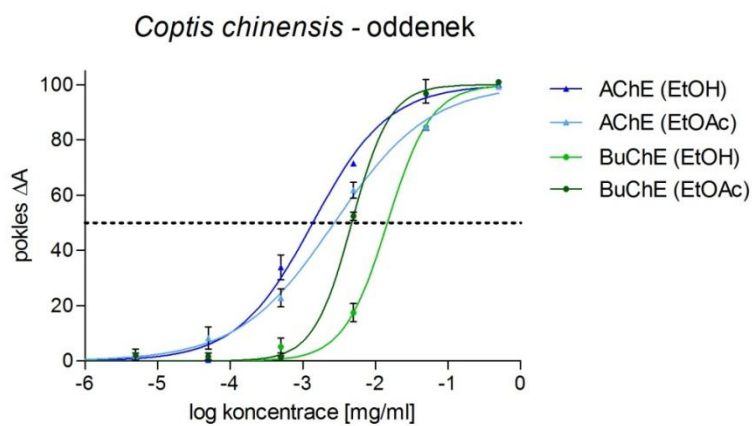
Tabulka č. 7: Hodnoty cholinesterasové inhibiční aktivity standardů – BuChE

standard	galantamin	IC ₅₀ µg/ml	58,02 ± 1,30
	huperzin A	IC ₅₀ µg/ml	--

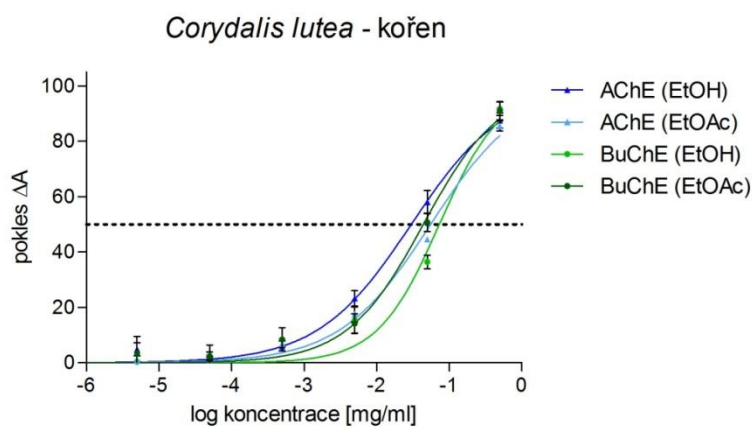
-- - standard nevykazoval žádnou aktivitu

Na obrázcích 11 – 15 je znázorněna závislost inhibiční aktivity vůči erytrocytární AChE a sérové BuChE na koncentraci testovaných extraktů.

A

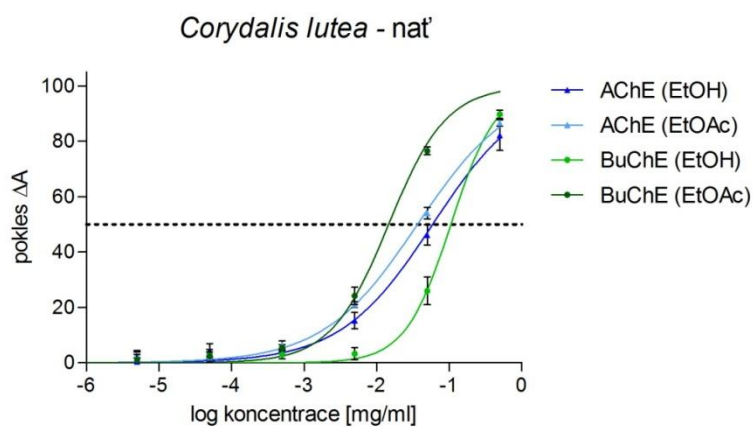


B

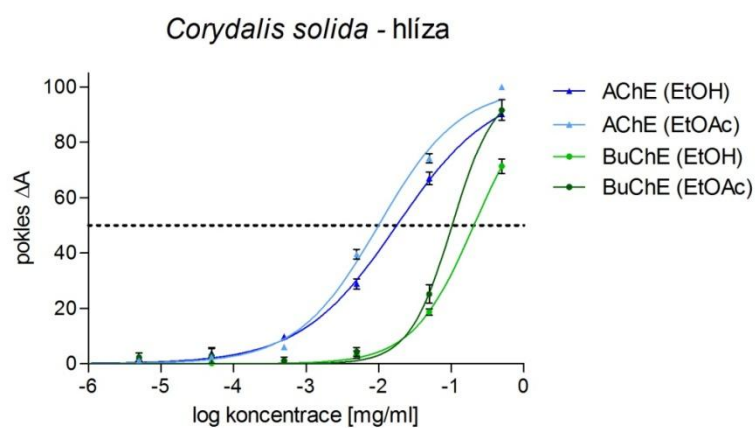


Obrázek č. 11: Závislost inhibiční aktivity vůči HuAChE a HuBuChE na koncentraci testovaného extraktu. A: *Coptis chinensis* – oddenek, B: *Corydalis lutea* – kořen

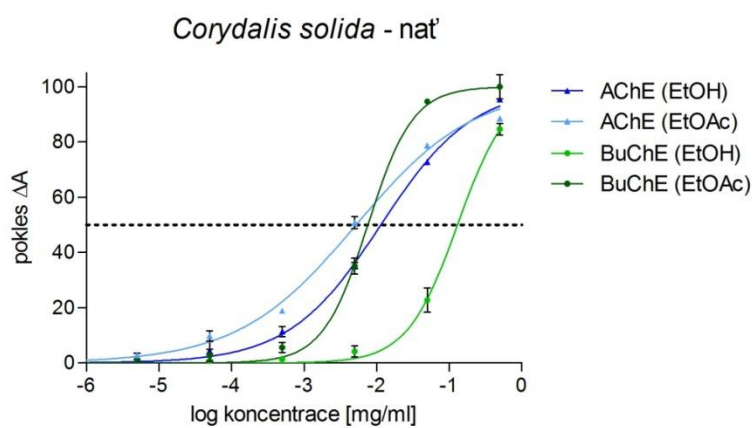
A



B

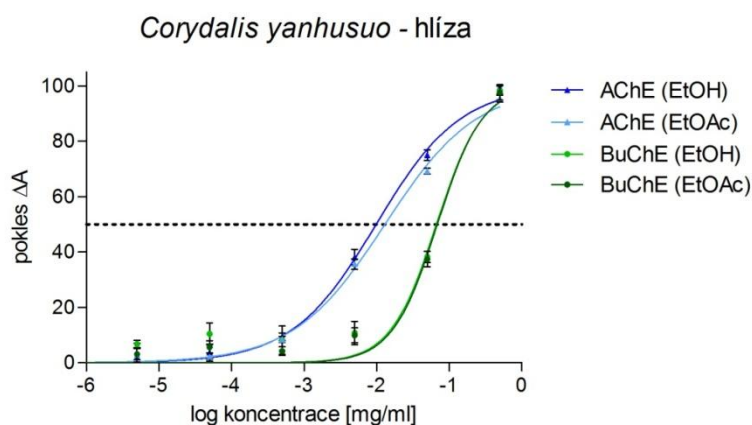


C

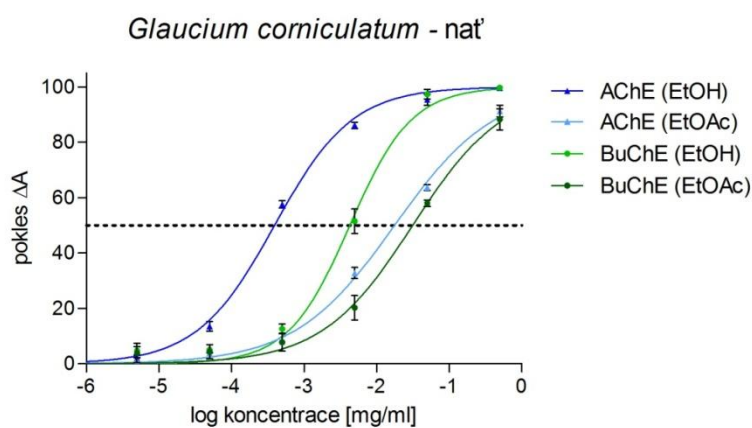


Obrázek č. 12: Závislost inhibiční aktivity vůči HuAChE a HuBuChE na koncentraci testovaného extraktu. A: *Corydalis lutea* – nat', B: *Corydalis solida* – hlíza, C: *Corydalis solida* – nat'

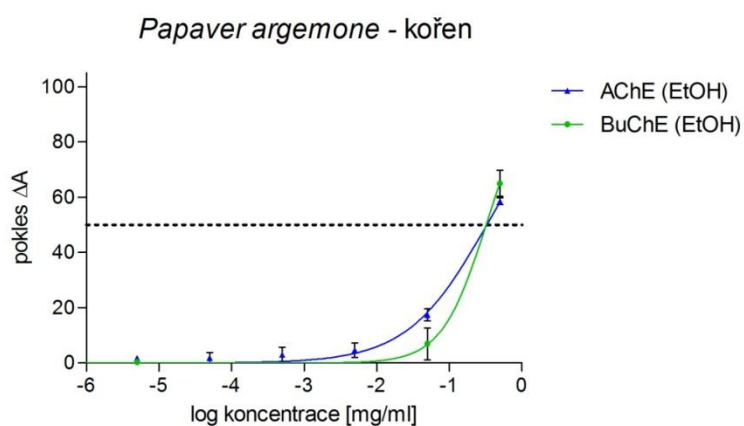
A



B

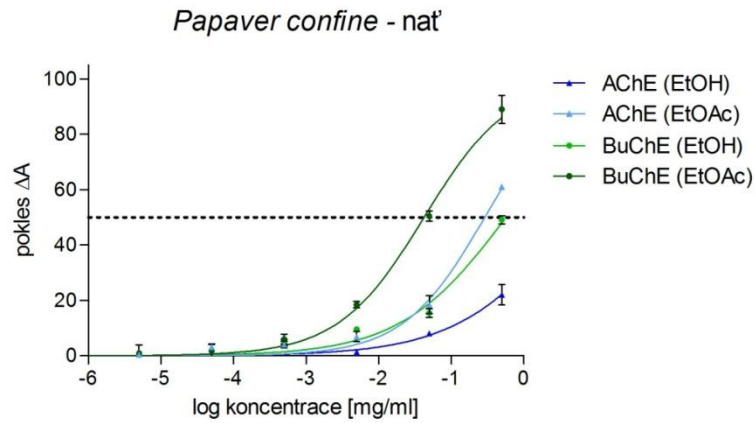


C

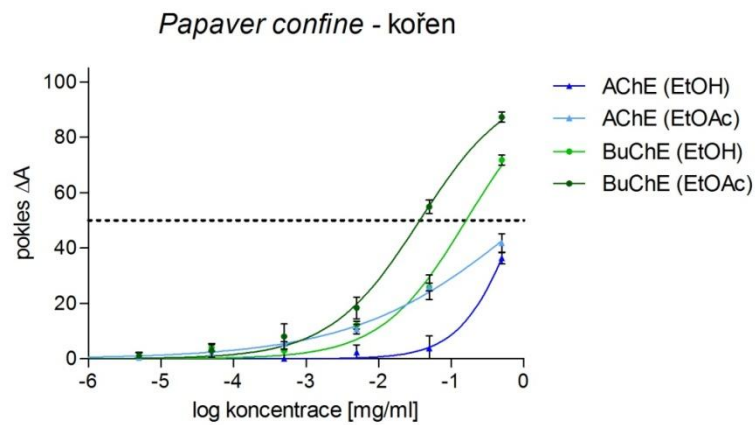


Obrázek č. 13: Závislost inhibiční aktivity vůči HuAChE a HuBuChE na koncentraci testovaného extraktu. A: *Corydalis yanhusuo* – hlíza, B: *Glaucium corniculatum* – nať, C: *Papaver argemone* – kořen

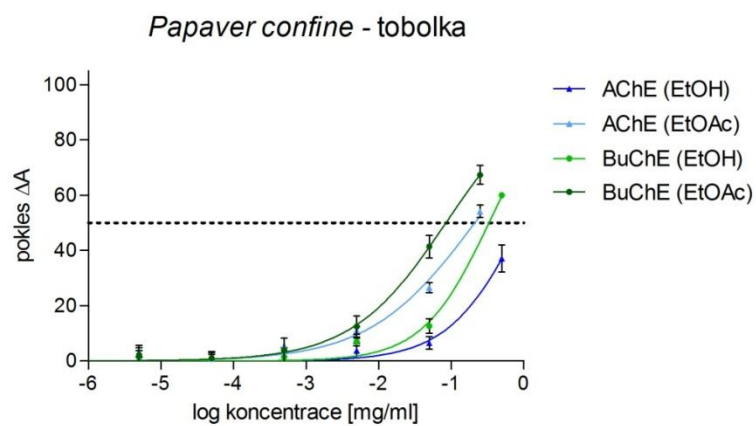
A



B

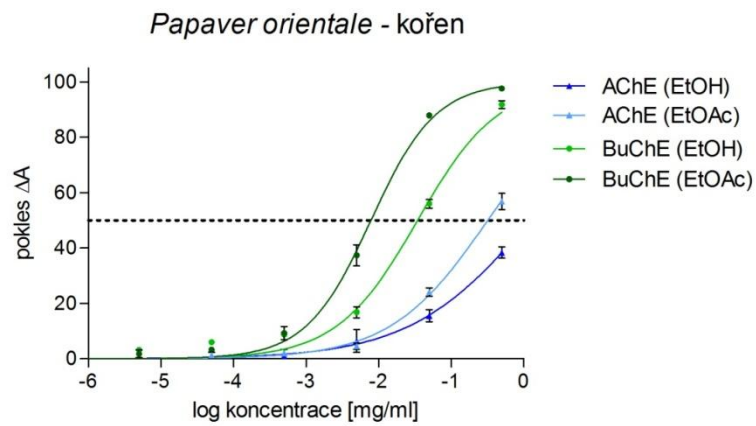


C



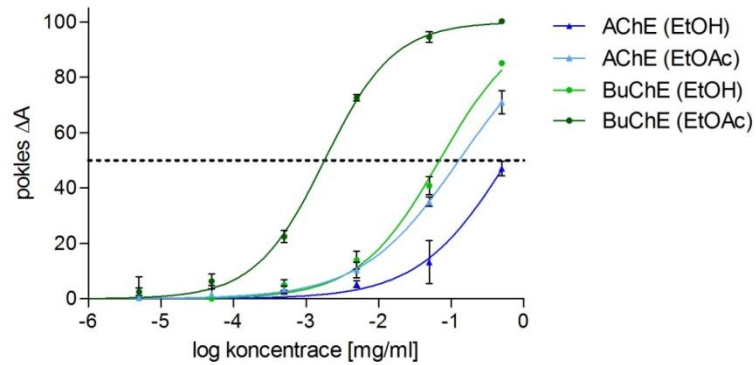
Obrázek č. 14: Závislost inhibiční aktivity vůči HuAChE a HuBuChE na koncentraci testovaného extraktu. A: *Papaver confine* - kořen B: *Papaver confine* – nat', C: *Papaver confine* – tobolka

A



B

Papaver orientale - zelené tobolky a 5 cm stonek



Obrázek č. 15: Závislost inhibiční aktivity vůči HuAChE a HuBuChE na koncentraci testovaného extraktu. A: *Papaver orientale* – kořen, B: *Papaver orientale* – zelené tobolky a 5 cm stonek

4. STANOVENÍ ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITY ETHANOLOVÝCH A ALKALOIDNÍCH EXTRAKTŮ

Tabulka č. 8: Výsledky stanovení antioxidačních aktivit

Druh/část rostliny	ethanолоvý extrakt		alkaloidní extrakt	
	%Q 1 mg/ml	EC ₅₀ μg/ml	%Q 1 mg/ml	EC ₅₀ μg/ml
<i>Coptis chinensis</i> /oddenek	45,98	> 1000	30,7	> 1000
<i>Corydalis lutea</i> /kořen	27,7	> 1000	--	--
<i>Corydalis lutea</i> /nať	38,85	> 1000	12,97	> 1000
<i>Corydalis solida</i> /hlíza	4,38	> 1000	--	--
<i>Corydalis solida</i> /nať	19,15	> 1000	--	--
<i>Corydalis yanhusuo</i> /hlíza	35,66	> 1000	11,17	> 1000
<i>Glaucium corniculatum</i> /nať	39,76	> 1000	--	--
<i>Papaver argemone</i> /kořen	47,96	> 1000	nd	nd
<i>Papaver confine</i> /kořen	19,54	> 1000	5,48	> 1000
<i>Papaver confine</i> /nať	17,88	> 1000	33	> 1000
<i>Papaver confine</i> /tobolka	22,06	> 1000	16,55	> 1000
<i>Papaver orientale</i> /kořen	35,87	> 1000	3,45	> 1000
<i>Papaver orientale</i> /zelené tobolky + 5 cm stonek	24,57	> 1000	5,27	> 1000

nd - aktivita nebyla stanovena, -- - extrakt nevykazoval žádnou aktivitu

Tabulka č. 9: Hodnoty antioxidační aktivity standardů

standard	EC ₅₀ μg/ml
kyselina askorbová	9,01 ± 0,58
trolox	5,12 ± 0,33
kvercetin	3,36 ± 0,08

VI. DISKUZE

Tato diplomová práce byla zpracována za účelem zhodnotit biologické účinky jednotlivých druhů testovaných rostlin. Zjistit inhibiční aktivitu vůči erytrocytární AChE a sérové BuChE a porovnat se známými standardy. Dále bylo účelem stanovit antioxidační aktivitu extraktů.

V rámci této práce byly připraveny extrakty z testovaných druhů rostlin (kapitola IV. 1. 7.). Ethanolové extrakty vykazovaly pozitivní reakci na přítomnost alkaloidů po detekci s využitím Dragendorffova činidla. Některé extrakty byly podrobeny tenkovrstevné chromatografii. Byly použity dvě různé vyvíjecí soustavy s odlišnou polaritou, čímž se docílilo rozdělení jednotlivých alkaloidů. Je ale možné, že se pomocí těchto soustav nepodařilo úplné rozdělení alkaloidů a jednotlivé druhy obsahují více alkaloidů. Již dříve bylo izolováno velké množství alkaloidů z těchto druhů rostlin (tabulka č. 1).

Pro stanovení inhibiční aktivity (IC_{50}) vůči erytrocytární AChE a sérové BuChE byla použita Ellmanova spektrofotometrická metoda s použitím 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoové kyseliny. Při reakci se SH- skupina thiocholinu naváže na DTNB za vzniku žlutě zbarveného produktu, který se stanovuje spektrofotometricky.

Nejvyšší inhibiční aktivitu vůči erytrocytární AChE vykazovaly ethanolové extrakty z natě *Glaucium corniculatum*, z oddenku *Coptis chinensis* a z hlízy *Corydalis yanhusuo* (tabulka č. 4). V případě alkaloidních extraktů vykazovaly nejvyšší aktivitu extrakty z oddenku *Coptis chinensis*, z natě *Corydalis solida* a z hlízy *Corydalis solida* (tabulka č. 4). V porovnání s inhibiční aktivitou standardů vůči AChE (tabulka č. 5), vykazovaly silnější inhibiční efekt než galantamin ethanolové extrakty z natě *Glaucium corniculatum* a oddenku *Coptis chinensis*. Žádný z extraktů nevykazoval silnější aktivitu než huperzin A.

Z ethanolových extraktů vykazovaly nejsilnější inhibiční aktivitu vůči sérové BuChE extrakty z natě *Glaucium corniculatum*, z oddenku *Coptis chinensis* a z kořene *Papaver orientale* (tabulka č. 6). Nejsilnější inhibiční aktivitu z alkaloidních extraktů vykazovaly extrakty z tobolek *Papaver orientale*, z oddenku *Coptis chinensis* a z kořene *Papaver orientale* (tabulka

č. 6). Ve srovnání s hodnotou IC_{50} standardu galantaminu (tabulka č. 7) je inhibiční aktivita silnější u ethanolových i alkaloidních extraktů z oddenku *Coptis chinensis*, natě *Glaucium corniculatum*, kořene *Papaver orientale* a dále z alkaloidních extraktů z kořene a natě *Corydalis lutea*, natě *Corydalis solida*, kořene a natě *Papaver confine* a zelených tobolek *Papaver orientale*.

Již dříve bylo dokázáno, že extrakty z *Glaucium corniculatum* a z hlízy a natě *Corydalis solida* vykazují silný inhibiční účinek na AChE i BuChE (37), srovnatelný s výsledky této práce. Také izolované alkaloidy z extraktu *Corydalis yanhusuo* inhibovaly AChE aktivitu (38).

Antioxidační aktivita byla zkoumána *in vitro* DPPH testem na základě reakce 2,2'-difeny-1-pikrylhydrazylu (DPPH) se vzorkem. Snížení absorbance DPPH je závislé na koncentraci antioxidantu ve sledovaném vzorku. Antiradikálová aktivita vzorků byla vyjádřena jako 50% účinná koncentrace (EC_{50}) a byla porovnána se známými antioxidanty: kvercetinem $EC_{50} = 3,36 \pm 0,8 \mu\text{g/ml}$, kyselinou askorbovou $EC_{50} = 9,01 \pm 0,58 \mu\text{g/ml}$ a troloxem $EC_{50} = 5,12 \pm 0,33 \mu\text{g/ml}$.

Nejvyšší antioxidační aktivitu vykazovaly ethanolové extrakty z kořene *Papaver argemone*, z oddenku *Coptis chinensis* a z natě *Glaucium corniculatum* (tabulka č. 8). Ve srovnání s hodnotami antioxidační aktivity standardů (tabulka č. 9) je antioxidační aktivita extraktů z druhů zkoumaných rostlin nízká a není proto vhodné tyto rostliny považovat za zdroj účinných antioxidantů.

V dřívější studii bylo prokázáno, že berberin, koptisin a palmatin mají ochranný účinek proti peroxonitrem indukovanému poškození, vykazují inhibiční aktivitu proti hydroxylovému radikálu a tím redukuje oxidativní stres (33).

V případě izolování alkaloidů ze sumárního extraktu lze předpokládat, že čistá účinná látka by pak vykazovala silnější antioxidační aktivitu.

VII. ZÁVĚR

V předložené práci byla sledována přítomnost alkaloidů v extraktech rostlinných druhů z čeledí *Fumariaceae*, *Papaveraceae* a *Ranunculaceae*. Dále byla stanovena cholinesterasová inhibiční aktivita a antioxidační aktivita těchto rostlinných extraktů.

Obsah alkaloidů sledovaný již v dřívějších pracích, zabývajících se těmito rostlinnými druhy a jejich biologickou aktivitou, byl potvrzen.

Řada extraktů vykazovala silnou inhibiční aktivitu vůči erytrocytární AChE a sérové BuChE. Nejvýznamnější aktivita byla zjištěna u extraktů z natě *Glaucium corniculatum*, dále pak z oddenku *Coptis chinensis*. Tyto rostlinné druhy lze proto považovat za vhodné pro další zkoumání a v budoucnu by mohly být využity například při léčbě Alzheimerovy choroby.

Nejsilnější antioxidační aktivitu vykazoval extrakt z kořene *Papaver argemone*, dále pak z oddenku *Coptis chinensis*. Bohužel tato aktivita byla v porovnání s aktivitou standardů zanedbatelná. Použití těchto rostlinných druhů a extraktů z nich jako antioxidantů není proto do budoucna příliš významné.

VIII. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

- AChE – acetylcholinesterasa
- AD – Alzheimerova choroba (Alzheimer's disease)
- AR – aldose reductase
- BHA – 2-(3)-*tert*-butyl-4-hydroxyanizol
- BHT – 3,5-di-*tert*-butyl-4-hydroxytoluen
- BuChE – butyrylcholinesterasa
- DNA – deoxyribonukleová kyselina
- DPPH – 2,2'-difenyl-1-pikrylhydrazylu
- DTNB – 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina
- EDTA – kyselina etylendiamintetraoctová
- EtOAc – ethylacetát
- GSH – redukovaný glutathion
- HIV – human imunodeficiency virus
- LDL – low density lipoprotein
- MAO - monoaminoxidasa
- NADH – redukovaný nikotinamidadeninukleotid
- NADPH – nikotinamidadeninukleotid fosfát
- NMDA – *N*-metyl-*D*-aspartát
- NOS – syntasa oxidu dusnatého
- ROS – reactive oxygen species
- RONS – reactive oxygen and nitrogen species
- RNS – reactive nitrogen species
- TLC – tenkovrstvá chromatografie
- VR – volný radikál
- XOD – xantinoxidasa

IX. LITERATURA

1. Felklová, M. *Systematická botanika pro farmaceuty*; Veterinární a farmaceutická univerzita Brno: Brno, 1996; p 212.
2. Jahodář, L. *Farmakobotanika, semenné rostliny*; Karolinum: Praha, 2006; p 258.
3. Mukherjee, P. K.; Kumar, V.; Mal, M.; Houghton, P. J. Acetylcholinesterase inhibitors from plants. *Phytomedicine 14*, 2007, 289 – 300.
4. Prakash, D.; Gupta, K. R. The antioxidant phytochemicals of nutraceutical importance. *The Open Nutraceuticals Journal 2*, 2009, 20 – 35.
5. Medicinal Plant Images Database, 2007.
"http://libproject.hkbu.edu.hk/was40/detail?lang=en&channelid=1288&searchword=herb_id=D00440" (Čerpáno dne 24. 3. 2012).
6. Rak, L. Botany, 2007. "http://botany.cz/cs/corydalis-lutea (Čerpáno dne 24. 3. 2012).
7. Kessler, M. Biolib - Biological Library, 2005.
"http://www.biolib.cz/cz/taxonimage/id19841/?taxonid=3474&type=1" (Čerpáno dne 22. 3. 2012).
8. Krása, P. Botany, 2007. "http://botany.cz/cs/corydalis-solida/" (Čerpáno dne 24. 3. 2012).
9. Opletal, L.; Koula, V. Daidalea Verze 1.0 - internetová databáze.
"http://www.faf.cuni.cz/apps/daidalea/PlantSpecies.asp?id=10118" (Čerpáno dne 20. 3. 2012).
10. Medicinal Plant Images Database, 2007.
"http://libproject.hkbu.edu.hk/was40/detail?lang=en&channelid=1288&searchword=herb_id=D00424" (Čerpáno dne 22. 3. 2012).
11. Baughman, T. A.; Peeper, T. F.; Baker, T. K.; Weeks, D. L. Phenology and Distribution of

- Red Horned Poppy (*Glaucium corniculatum*) in Oklahoma. *Weed Technology* (Vol. 6), 1992, 1004 – 1009.
12. Pálka, M. Biolib - Biological Library, 2008.
"<http://www.biolib.cz/cz/taxonimage/id79992/?taxonid=3512>" (Čerpáno dne 22. 3. 2012).
 13. Mižík, P. Botany, 2007. "<http://botany.cz/cs/papaver-argemone/>" (Čerpáno dne 24. 3. 2012).
 14. Miglio, M. Luirig altervista. "http://luirig.altervista.org/schedeit/pz/papaver_argemone.htm" (Čerpáno dne 22. 3. 2012).
 15. Hejný, S.; Slavík, B. *Květena České socialistické republiky 1*; Academia: Praha, 1988; p 488.
 16. Trnka, F. Biolib - Biological Library, 2008.
"<http://www.biolib.cz/cz/taxonimage/id117946/?taxonid=3509>" (Čerpáno dne 22. 3. 2012).
 17. Medicinal Plant Images Database, 2007.
"http://libproject.hkbu.edu.hk/was40/detail?lang=en&channelid=1288&searchword=herb_id=D00877" (Čerpáno dne 24. 3. 2012).
 18. Vobořil, P. Biolib - Biological Library, 2005.
"<http://www.biolib.cz/cz/taxonimage/id121379/?taxonid=38428&type=1>" (Čerpáno dne 22. 3. 2012).
 19. Jung, H. A.; Yoon, N. Y.; Bae, H. J.; Min, B.-S.; Choi, J. S. Inhibitory activities of the alkaloids from *Coptidis rhizoma* against aldose reductase. *Archives of Pharmacal Research* (Vol. 31), No 11, 2008, 1405 – 1406.
 20. Preininger, V.; Novák, J.; Šimánek, V.; Šantavý, F. Isolation and chemistry of the alkaloids from plants of the *Papaveraceae*. LXXIII: Isolation and identification of alkaloids from *Corydalis lutea* (L.) DC. *Planta Medica* 33, 1978, 396 – 402, Chem. abstr. 1978:576318.
 21. Slavík, J.; Dolejší, L.; Slavíková, L. Alkaloids from *Corydalis solida* (L.)sw. mass

- spectrometry of quaternary benzyloquinoline alkaloids. *Collection Czechoslovak Chem. Commun. (Vol. 50)*, 1985, 2299 – 2304.
22. Junmin, S.; Weili, H.; Wencai, Y.; Xiqiao, C.; Yitao, W.; Qingwen, Z. Phytochemical investigation of *Corydalis yanhusuo*. *Tianran Chanwu Yanjiu Yu Kaifa (Vol. 23)*, 2011, 647 – 651, Chem. abstr. 2011:1677704.
23. Shafiee, A.; Ghanbarpour, A.; Akhlaghi, S. Alkaloids of *Papaveraceae*, XII. Alkaloids of *Glaucium corniculatum* subspecies *refractum*, population Pol-Dokhtar. *Journal of Natural Products*, 1985, 855 – 856.
24. Táborská, E.; Dostál, J.; Bochořáková, H.; Věžník, F. Alkaloids of *Papaver argemone* L. and *Papaver pavoninum* Fisch. et Mey. from the *Argemonorhoeades* Fedde section. *Collection Czechoslovak Chem. Commun. (Vol. 53)*, 1988, 1845 – 1850.
25. Slavík, J.; Slavíková, L.; Bochořáková, J. Alkaloids from *Papaver rhoeas* var. *chelidonioides* O. Kuntze, *P. confine* Jord., and *P. dubium* L. *Collection Czechoslovak Chem. Commun. (Vol. 54)*, 1989, 1118 – 1125.
26. Slavík, J.; Slavíková, L. Polar alkaloids from *Papaver orientale* L. *Collection Czechoslovak Chem. Commun. (Vol. 56)*, 1991, 1534 – 1538.
27. Ziegler, J.; Voigtländer, S.; Schmidt, J.; Kramell, R.; Miersch, O.; Ammer, C.; Gesell, A.; Kutchan, T. M. Comparative transcript and alkaloid profiling in *Papaver* species identifies a short chain dehydrogenase/reductase involved in morphine biosynthesis. *The Plant Journal* 48, 2006, 177 – 192.
28. Yuan, L.; Tu, D.; Ye, X.; Wu, J. Hypoglycemic and hypocholesterolemic effects of *Coptis chinensis* Franch inflorescence. *Plant Foods for Human Nutrition* 61, 2006, 139 – 144.
29. Kong, L. D.; Cheng, C. H. K.; Tan, R. X. Monoamine Oxidase Inhibitors from Rhizoma of *Coptis chinensis*. *Planta Medica* 67, 2001, 74 – 76.

30. Yan, D.; Jin, C.; Xiao, X.-H.; Dong, X.-P. Antimicrobial properties of berberine alkaloids in *Coptis chinensis* Franch by microcalorimetry. *Journal of biochemical and biophysical methods* 70, 2008, 845 – 849.
31. Fan, D.-L.; Xiao, X.-H.; Ma, X.-J. Calorimetric study of the effect of protoberberine alkaloids in *Coptis chinensis* Franch on *Staphylococcus aureus* growth. *Thermochimica Acta* 480, 2008, 49 – 52.
32. Lin, C.-C.; Ng, L. T.; Hsu, F.-F.; Shieh, D.-E.; Chiang, L.-C. Cytotoxic effects of *Coptis chinensis* and *Epimedium sagittatum* extracts and their major constituents (berberine, coptisine and icariin) on hepatoma and leukemia cell growth. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 31, 2004, 65 – 69.
33. Jang, M. H.; Kim, H. Y.; Kang, K. S.; Yokozawa, T.; Park, J. H. Hydroxyl radical scavenging activities of isoquinoline alkaloids isolated from *Coptis chinensis*. *Archives of Pharmacal Research (Vol 32)*, 2009, 341 – 345.
34. Liu, F.; Ng, T. B. Antioxidative and free radical scavenging activities of selected medicinal herbs. *Life Sciences* 8 (Vol. 66), 2000, 725 – 735.
35. Boegge, S. C.; Kesper, S.; Verspohl, E. J.; Nahrstedt, A. Reduction of ACh-induced contraction of rat isolated ileum by coptisine, (+)-caffeoylmalic acid, *Chelidonium majus*, and *Corydalis lutea* extracts. *Planta medica (Vol. 62)*, 1996, 173 – 174, Chem. abstr. 1996293339.
36. Adersen, 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* 104, 2006, 418 – 422.
37. Orhan, I.; Sener, B.; Choudhary, M. I.; Khalid, A. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory activity of some Turkish medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology* 91, 2004, 57 – 60.

38. Hai-Tao, X.; Jiao, P.; Yan, L.; Jie, Y.; Xue, B.; Xiao-Yan, H.; Fu-Mei, Y.; Qian-Yun, S. Acetylcholinesterase inhibitors from *Corydalis yanhusuo*. *Natural product research (Vol. 25)*, 2011, 1418 – 1422, Chem. abstr. 2011840808.
39. Ma, Z.-Z.; Xu, W.; Jensen, N. H.; Roth, B. L.; Liu-Chen, L.-Y.; Lee, D. Y. W. Isoquinoline alkaloids isolated from *Corydalis yanhusuo* and their binding affinities at the dopamine D1 receptor. *Molecules 13*, 2008, 2303 – 2312.
40. Ling, H.; Wu, L.; Li, L. *Corydalis yanhusuo* rhizoma extract reduces infarct size and improves heart function during myocardial ischemia/reperfusion by inhibiting apoptosis in rats. *Phytotherapy Research 20*, 2006, 448 – 453.
41. Wang, H. X.; Ng, T. B. Examination of lecithins, polysaccharopeptide, polysaccharide, alkaloid, coumarin and trypsin inhibitors for activity against Human Immunodeficiency Virus reverse transcriptase and glycohydrolases. *Planta Medica 67*, 2001, 669 – 672.
42. Wang, C.; Wang, S.; Fan, G.; Zou, H. Screening of antinociceptive components in *Corydalis yanhusuo* W. T. Wang by comprehensive two-dimensional liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem 396*, 2010, 1731 – 1740.
43. Salloway, S.; Mintzer, J.; Weiner, M. F.; Cummings, J. L. Disease-modifying therapies in Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia 4*, 2008, 65 – 79.
44. Silbernagl, S.; Lang, F. *Atlas patofyziologie člověka*; Grada: Praha, 2001; p 348.
45. Shah, R. S.; Lee, H.-G.; Xiongwei, Z.; Perry, G.; Smith, M. A.; Castellani, R. J. Current approaches in the treatment of Alzheimer's disease. *Biomedicine & Pharmacotherapy 62*, 2008, 199 – 201.
46. Lincová, D.; Farghali, H. *Základní a aplikovaná farmakologie*; Galén: Praha, 2007; pp 144 – 146.
47. Giacobini, E. Cholinesterase inhibitors: new roles and therapeutic alternatives.

- Pharmacological Research* 50, 2004, 433 – 440.
48. Waldemar, G.; Dubois, B.; Emre, M.; Georges, J.; McKeith, I. G.; Rossor, M.; P.Scheltens; Tariska, P.; Winblad, B. Recommendations for the diagnosis and management of Alzheimer's disease and other disorders associated with dementia: EFNS guideline. *European Journal of Neurology*, 2007, 1 – 26.
 49. Nourhashémi, F.; Gillette-Guyonnet, S.; Andrieu, S.; Ghisolfi, A.; Ousset, P. J.; Grandjean, H.; Grand, A.; Pous, J.; Vellas, B.; Albaréde, J.-L. Alzheimer's disease: protective factors. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 2000, 643 – 649.
 50. Ono, K.; Hamaguchi, T.; Naiki, H.; Yamada, M. Anti-amyloidogenic effects of antioxidants: Implications for the prevention and therapeutics of Alzheimer's disease. *Biochimica et Biophysica Acta* 1762, 2006, 575 – 586.
 51. Štípek, S. *Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a nemoci*; Grada: Praha, 2000; p 320.
 52. Zima, T.; Štípek, S.; Tesařík, V.; Pláteník, J.; Crkovská, J. Volné radikály - reaktivní formy kyslíku, antioxidační látky a antioxidační terapie. *Remedia*. 6, 1996, 35 – 58.
 53. McCord, J. M. The evolution of free radicals and oxidative stress. *The American Journal of Medicine (Vol. 108)*, 2000, 652 – 653.
 54. Kameníková, L. Oxidační stres a možnosti jeho ovlivnění. *Solutio*, 2000/2001, 31 – 49.
 55. Stahl, E. *Thin-Layer Chromatography, A Laboratory Handbook*; Springer Berlin: Berlin-Heidelberg-New York, 1969; p 1042.
 56. Steck, T. L.; Kant, J. A. Preparation of impermeable ghosts and inside-out vesicles from human erythrocyte membranes. *Methods Enzymol* 31, 1974, 172.
 57. Ellman, L. G.; Courtney, D. K.; Andres, J. V.; Feather-Stone, M. R. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol* 7, 1961, 88.

IX. ABSTRAKT

Pšeničková, Jana. Screening alkaloidních rostlin na antioxidační a anticholinesterasovou aktivitu *in vitro* II. Diplomová práce 2012. Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra farmaceutické botaniky a ekologie. 57 str. Vedoucí práce: Ing. Kateřina Macáková, Ph.D.

Klíčová slova: cholinesterasová inhibiční aktivita, antioxidační aktivita, alkaloidy, Alzheimerova choroba, oxidativní stres

V rámci této diplomové práce byly testovány vybrané druhy rostlin čeledí *Fumariaceae*, *Papaveraceae* a *Ranunculaceae*. Hodnocen byl obsah alkaloidů pomocí tenkovrstvé chromatografie (TLC); ethanolové i alkaloidní extrakty byly testovány na cholinesterasovou inhibiční a antioxidační aktivitu.

Všechny testované druhy rostlin byly podrobeny stanovení cholinesterasové inhibiční aktivity za využití Ellmanovy spektrofotometrické metody s použitím kyseliny 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoové. Aktivita extraktů byla porovnána s hodnotami IC_{50} známých inhibitorů cholinesteras: galantaminem (IC_{50} HuAChE = $2,59 \pm 0,065$ $\mu\text{g/ml}$, HuBuChE = $58,02 \pm 1,30$ $\mu\text{g/ml}$) a huperzinem A (IC_{50} HuAChE = $0,061 \pm 0,001$ $\mu\text{g/ml}$, HuBuChE >1000 $\mu\text{g/ml}$). Nejvyšší cholinesterasovou inhibiční aktivitu z testovaných vzorků vykazoval ethanolový extrakt z natě *Glaucium corniculatum* (IC_{50} AChE = $0,39$ $\mu\text{g/ml}$, IC_{50} BuChE = $4,27$ $\mu\text{g/ml}$). Druh *G. corniculatum* lze považovat za vhodný zdroj inhibitorů cholinesteras.

Extrakty jednotlivých rostlinných druhů byly podrobeny stanovení antioxidační aktivity *in vitro* DPPH testem. Nejvyšší antioxidační aktivitu vykazoval extrakt z kořene *Papaver argemone* (47,96 %).

XI. ABSTRACT

Pšeničková, Jana. Screening of alkaloidal plants for antioxidant and anticholinesterase activity *in vitro* II. Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Department of Pharmaceutical Botany and Ecology. 57 pp. Supervisor: Ing. Kateřina Macáková, Ph.D.

Keywords: cholinesterase inhibition activity, antioxidant activity, alkaloids, Alzheimer's disease, oxidative stress

Selected plant species of the families *Papaveraceae*, *Fumariaceae* and *Ranunculaceae* were tested in terms of this thesis. Alkaloid content was evaluated by a thin-layer chromatography (TLC); ethanol and alkaloid extracts were tested for their cholinesterase inhibitory activity and antioxidant activity.

All of the studied species were tested for the cholinesterase inhibition activity by the Ellman's spectrophotometric method using the 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid. The activity of extracts was compared with IC₅₀ values of common inhibitors of cholinesterases: galanthamine (IC₅₀ HuAChE = 2.59 ± 0.065 µg/ml, HuBuChE = 58.02 ± 1,30 µg/ml), and huperzine A (IC₅₀ HuAChE = 0.061 ± 0.001 µg/ml, HuBuChE 1000 µg/ml). The highest cholinesterase inhibitory activity from the tested specimen showed ethanol extract from the aerial part of *Glaucium corniculatum* (IC₅₀ AChE = 0,39 µg/ml, IC₅₀ BuChE = 4,27 µg/ml). The species *G. corniculatum* can be considered to be suitable source of the cholinesterase inhibitors.

Extracts of all studied plant species were tested for the antioxidant activity by *in vitro* DPPH test. The highest antioxidant activity showed extract from the root of *Papaver argemone* (47,96 %).