

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

DIPLOMOVÁ PRÁCE

**Biologická aktivita obsahových látek rostlin XXVII.
Alkaloidy *Fumaria officinalis* L. a jejich účinek na acetylcholinesterasu
a butyrylcholinesterasu**

Vedoucí diplomové práce: Prof. RNDr. Lubomír Opletal, CSc.

Vedoucí katedry: Prof. RNDr. Luděk Jahodář, CSc.

Hradec Králové 2014

Daniela Hulcová

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

DIPLOMA THESIS

**Biological activity of plants metabolites. XXVII.
Alkaloids of *Fumaria officinalis* L. and their effect on
acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase**

Supervisor: Prof. RNDr. Lubomír Opletal, CSc.

Head of the department: Prof. RNDr. Luděk Jahodář, CSc.

Hradec Králové 2014

Daniela Hulcová

PODĚKOVÁNÍ

Děkuji Prof. RNDr. Lubomíru Opletalovi, CSc. za pomoc při vypracování diplomové práce, jak při samotném psaní tak i při práci v laboratoři a za stanovení anticholinesterasových aktivit izolovaných alkaloidů. Děkuji za vstřícnost, trpělivost, rady a za čas mi věnovaný. PharmDr. Jakubovi Chlebkovi, Ph.D. děkuji za čas, který mi věnoval v laboratoři a za rady a materiály, které mi poskytl. Dále bych ráda poděkovala Doc. PharmDr. Jiřímu Kunešovi, CSc. a Mgr. Zdeňkovi Novákovi za změření a interpretaci NMR spekter, Ing. Miroslavu Ločárkovi za MS spektra, Mgr. Nině Benešové a všem pracovníkům katedry farmaceutické botaniky a ekologie za pomoc při práci v laboratoři. Nakonec děkuji i své rodině za podporu během celého studia.

PROHLÁŠENÍ

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

Hradec Králové, 2014

ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické botaniky a ekologie

Kandidát: Daniela Hulcová

Konzultant: Prof. RNDr. Lubomír Opletal, CSc.

Název diplomové práce: Biologická aktivita obsahových látek rostlin XXVII. Alkaloidy *Fumaria officinalis* L. a jejich účinek na acetylcholinesterasu a butyrylcholinesterasu.

Z natě *Fumaria officinalis* L. byl připraven sumární ethanolový extrakt, z něhož byl běžným způsobem připraven diethyletherový extrakt. Z tohoto extraktu, zpracovaného sloupcovou chromatografií na neutrálním oxidu hlinitém, bylo získáno celkem 201 frakcí. Spojené frakce 68-76 byly dále zpracovány preparativní tenkovrstvou chromatografií a v čistém stavu získány 3 látky DH-1, DH-2 a DH-3, které byly podle výsledků MS a NMR a porovnání výsledků s literaturou identifikovány jako protopin, (+)-fumarilin a N-methylkorydaldin. Tyto alkaloidy byly následně testovány na inhibiční aktivitu vůči lidské erytrocytární acetylcholinesterase a plazmatické butyrylcholinesterase Ellmanovou metodou. Izolované alkaloidy nevykázaly v těchto testech při srovnání s galanthaminem (IC₅₀, μM; AChE 1,710 ± 0,065, BuChE 42,30 ± 1,30) významnou inhibiční aktivitu (IC₅₀, μM: protopin: AChE: 345,42 ± 31,12, BuChE: 239,66 ± 20,89, (+)-fumarilin: AChE: 2939,2 ± 309,41, BuChE: 330,62 ± 34,12 a N-methylkorydaldin AChE: 680,06 ± 130,49, BuChE: 1382,3 ± 332,26).

Klíčová slova: *Fumaria officinalis*, protopin, (+)-fumarilin, N-methylkorydaldin, acetylcholinesterasa, butyrylcholinesterasa

ABSTRAKT

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmaceutical Botany and Ecology

Candidate: Daniela Hulcová

Consultant: Prof. RNDr. Lubomír Opletal, CSc.

Title of Diploma Thesis: Biological activity of plants metabolites. XXVII.

Alkaloids of *Fumaria officinalis* L. and their effect on acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase

The summary ethanolic and diethylether extract were prepared from the herbs of a plant *Fumaria officinalis* L. We have obtained 201 fractions from this extract by column chromatography on the neutral Al₂O₃ (aluminium oxide). Joined fraction 68-76 were processed by thin layer chromatography, and 3 substances were obtained in pure state: DH-1, DH-2, DH-3. These 3 compounds were identified as protopine, (+)-fumariline and *N*-methylcorydaldine by the comparison with the literature and results of MS and NMR. These alkaloids were tested for the inhibitory activity against human erythrocytic acetylcholinesterase and plasmatic butyrylcholinesterase by Ellman`s method. The isolated alkaloids did not show any significant inhibitory activity (IC₅₀, μM) compared with the standard galanthamine (IC₅₀, μM; AChE 1,710 ± 0,065, BuChE 42,30 ± 1,30): protopin: AChE: 345,42 ± 31,12, BuChE: 239,66 ± 20,89, (+)-fumarilin: AChE: 2939,2 ± 309,41, BuChE: 330,62 ± 34,12 a *N*-methylkorydaldin AChE: 680,06 ± 130,49, BuChE: 1382,3 ± 332,26).

Key words: *Fumaria officinalis*, protopin, *N*-methylkorildaldin, (+)-fumarilin, acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase

Obsah

Seznam použitých zkratek.....	4
1 Úvod	5
2 Cíl práce.....	8
3 Teoretická část	9
3.1 <i>Fumaria officinalis</i> L. (Fumariaceae).....	9
3.1.1 Vznik názvu	9
3.1.2 Taxonomické zařazení	9
3.1.3 Botanická charakteriska.....	9
3.1.3.1 Čeleď Fumariaceae	9
3.1.3.2 Rod <i>Fumaria</i>	10
3.1.3.3 Druh <i>Fumaria officinalis</i> L. – zeměděm lékařský.....	10
3.1.3.3.1 Morfologický popis	10
3.1.3.3.2 Stanoviště a rozšíření	11
3.1.4 Historie a lidové léčitelství	11
3.1.5 <i>Fumariae herba</i>	12
3.1.6 Obsahové látky	13
3.1.6.1 Alkaloidy	13
3.1.6.2 Další látky	16
3.1.6.3 Biologická aktivita obsahových látek rodu <i>Fumaria</i>	16
3.2 Alzheimerova choroba.....	19
3.2.1 Epidemiologie.....	19
3.2.2 Rizikové faktory	20
3.2.3 Klinický obraz	21
3.2.4 Patofyziologie	23
3.2.4.1 Cholinergní hypotéza.....	23
3.2.4.2 Neurony	24
3.2.4.3 Senilní plaky	24
3.2.4.4 Neuronální klubka	25
3.2.4.5 Apolipoprotein E	25
3.2.4.6 Zánět a oxidační stres	26
3.2.5 Terapie Alzheimerovi choroby	26
3.2.5.1 Působení na kognitivní funkce.....	26

3.2.5.1.1	Prekurzory acetylcholinu	26
3.2.5.1.2	Inhibitory cholinesteras (kognitiva).....	27
3.2.5.1.3	Ovlivnění muskarinových a nikotinových receptorů.....	28
3.2.5.1.4	Další látky.....	28
3.2.5.2	Působení na nekognitivní funkce.....	28
4	Experimentální část	29
4.1	Materiál a vybavení pro izolaci	29
4.1.1	Rozpouštědla a chemikálie	29
4.1.2	Detekční činidla	29
4.1.3	Pomocné látky	29
4.1.4	Vyvíjecí soustavy pro TLC.....	29
4.1.5	Absorbenty pro chromatografii.....	30
4.1.6	Přístroje a pomůcky	30
4.1.7	Rostlinný materiál.....	30
4.2	Materiál a vybavení pro stanovení cholinesterasové aktivity.....	30
4.2.1	Chemikálie.....	30
4.2.2	Pufry	31
4.2.3	Biologický materiál	31
4.3	Obecné metody	31
4.3.1	Příprava a čištění rozpouštědel	31
4.3.2	Odpařování rozpouštědel z extraktů a jejich uchovávání	31
4.3.3	Detekce na chromatografických deskách	32
4.3.4	Sloupcová chromatografie	32
4.3.5	Příprava preparativních litých TLC desek.....	32
4.4	Izolace alkaloidů.....	32
4.4.1	Příprava sumárního diethyletherového extraktu.....	32
4.4.2	Rozdělení sumárního extraktu na frakce	33
4.4.3	Izolace alkaloidů z frakce 68 - 76 pomocí preparativní TLC.....	35
4.4.3.1	Výběr vhodné mobilní fáze	35
4.4.3.2	Preparativní TLC	37
4.5	Stanovení cholinesterasové inhibiční aktivity (IC ₅₀).....	38
5	Výsledky	40
5.1	Identifikace izolovaných látek.....	40
5.1.1	Stanovení struktury DH-1	40

5.1.1.1	MS studie	40
5.1.1.2	¹ H NMR studie	41
5.1.1.3	¹³ C NMR studie	42
5.1.2	Stanovení struktury DH-2.....	43
5.1.2.1	MS studie	43
5.1.2.2	¹ H NMR studie	44
5.1.2.3	¹³ C NMR studie	45
5.1.3	Stanovení struktury DH-3.....	46
5.1.3.1	MS studie	46
5.1.3.2	¹ H NMR studie	47
5.1.3.3	¹³ C NMR studie	48
5.2	Stanovení inhibice AChE a BuChE	49
6	Diskuze	50
7	Literatura.....	52

Seznam použitých zkratek

AD	Alzheimerova choroba
AChE	Acetylcholinesterasa
Apo E	Apolipoprotein E
APP	Amyloidový prekurzorový protein
ATChI	Acetylthiocholin jodid
BuChE	Butyrylcholinesterasa
BuTChI	Butyrylthiocholin jodid
CNS	Centrální nervový systém
CYP	Cytochrom P
ČFK	Český farmaceutický kodex
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTNB	5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina
GABA	Kyselina γ -aminomáselná
IC ₅₀	Inhibiční aktivita
MS	Hmotnostní spektrometrie
NMR	Nukleární magnetická rezonance
R _f	Retenční faktor
TLC	tenkovrstvá chromatografie
WHO	Světová zdravotnická organizace

1 Úvod

Průměrná délka lidského života se neustále prodlužuje, jak uvádí i Světová zdravotnická organizace (WHO). V polovině 20. století byla průměrná délka lidského života asi 65 let, dnes je to přes 75 let a za 50 let to bude kolem 85 let¹. Proč tomu tak je? Hlavním důvodem je rozvoj zdravotnických oborů a to hlavně nových lékařských technologií a vývoje léčiv. Dříve velké množství lidí umíralo na nemoci v nízkém, ba dokonce v dětském věku, a to zejména na infekční nemoci. Objev antibiotik zachránil mnoho lidských životů, a tak se zvýšila i průměrná délka života. Je krásné žít déle, ale se vzrůstajícím věkem a s tím vším moderním pohodlím se rozšířily takzvané civilizační choroby.

Jako civilizační choroby neboli chronické neinfekční choroby, jsou označovány nemoci, které vznikají v důsledku určitého životního stylu a to zejména ve státech moderního světa. Mezi tyto nemoci se dají zařadit kardiovaskulární choroby, jako například vysoký krevní tlak a ateroskleróza, obezita, nádorová onemocnění, diabetes mellitus 2. typu, nemoci pohybového aparátu, zubní kaz, ale i demence různého původu. Na jejich vzniku se podílí hlavně rizikové faktory související s životními návyky, jako jsou stravovací návyky, kouření a pohybová aktivita. Zvyky se dají změnit, a tak se můžeme postarat, aby nám zdraví vydrželo dodržováním správné životosprávy a preventivních opatření. Všeobecně jsou doporučována pravidla, kam patří dostatek fyzické aktivity, vysoký přísun ovoce a zeleniny, jíst pravidelně malá množství vyvážené stravy, nekouřit, alkohol pít v omezené míře a další. Jsou ale i věci, které samy neovlivníme jako je čistota ovzduší, věk, pohlaví, genetika a mnoho dalších faktorů, které se také podílejí na rozvoji civilizačních nemocí².

Civilizační choroby jsou multifaktoriální onemocnění, které nemají většinou jen jednu příčinu. Příčiny mohou vycházet z rizikových faktorů, ale často bývají neznámé. I díky tomu mnoho z těchto nemocí ještě dnes neumíme vyléčit, a proto se snažíme alespoň zmírnit důsledky a zlepšit kvalitu života nemocných a zpomalit průběh nemoci. Terapie se skládá z léčby nefarmakologické a farmakologické. Základem nefarmakologické léčby je hlavně změna životního stylu, kam lze zařadit například rehabilitace a fyzické cvičení, dietní režimy, odvykání kouření a jiné. Farmakologická léčba je založena na podávání léčivých přípravků, které ovlivňují dané onemocnění. Podávání léčiv je často doživotní. S dlouhodobým užíváním léčiv, ale souvisí vyšší

riziko nežádoucích účinků někdy až riziko poškození organismu. Proto je velmi důležité, aby léčiva byla účinná a bezpečná. Účinnost a bezpečnost jsou jedny z hlavních důvodů výzkumu nových léčiv. Cesta k objevu nového léčiva není vůbec jednoduchá. Existuje několik možností jak cíle dosáhnout. První z nich je syntéza nových chemických látek. Avšak z tisíců a tisíců nových molekul je vhodná jen malá hrstka a i ta po dalších testech nemusí vyhovovat účinnosti a bezpečnosti. Tato metoda je velmi náročná na suroviny, materiál i čas. Další možností je hledání nového využití již známých chemických látek nebo modifikace jejich chemické struktury. Často stačí jen malá obměna molekuly a vlastnosti látky se pozmění. Poslední z možností je využití látek rostlinného původu³. Suroviny rostlinného původu se používaly již od pravěku a hledáme v nich inspiraci dodnes. Rostlinná i živočišná říše oplývají nepřeberným množstvím čeledí a druhů, které skrývají látky, jež ovlivňují řadu biologických procesů, a pomáhají nám tak při léčbě některých nemocí. Z nejznámějších, které lze jmenovat jsou to rutin, atropin, vinkristin, námelové alkaloidy, galanthamin, heparin a inzulin. Farmacie stále hledá nové a nové látky a proto se dnes stále častěji obrací na rostlinné zdroje, které by se dali využít jako potencionální léčivé látky.

Jednou z čeledí, která by mohla být přínosná při hledání nových léčiv, je i čeleď Fumariaceae. Rostliny patřící do této čeledi obsahují farmakognosticky zajímavé látky, u nichž byly prováděny zkoušky na biologickou aktivitu v různých oblastech. Pro příklad jsou to studie zabývající se hypoglykemickou aktivitou *Fumaria parviflora*⁴, anxiolytickou aktivitou *Fumaria indica*⁵, antivirovou a antibakteriální aktivitou rodů *Fumaria* a *Corydalis*⁶ nebo studie na inhibiční aktivitu acetylcholinesterasy^{7,8}.

Právě acetylcholinesterasa (AChE) je jedním z míst, které lze ovlivnit pro oddálení nástupu Alzheimerovy demence, jedné z civilizačních nemocí. Tato nemoc úzce souvisí s prodlužující se délkou života, a proto se procento nemocných touto chorobou neustále zvyšuje s přirůstajícím průměrným věkem obyvatel. Lidé sice žijí déle, ale často na úkor kvality. Lidé trpící Alzheimerovou chorobou (AD) se dožívají i 90 let, ale jsou nesoběstační a odkázáni na pomoc druhých. O nemocné se často starají jejich rodina a přátelé a pozorují jak se osoba, kterou znali celý život, mění v někoho úplně jiného. Lidé se v těchto chvílích upínají na vědu, která hledá způsoby jak nemocným pomoci, jak je vyléčit nebo alespoň zlepšit a zkvalitnit jejich život. Takovouto činností se zabírají ve výzkumných ústavech i na univerzitách. Výjimkou není ani farmaceutická fakulta v Hradci Králové, kde na katedře organické chemie syntetizují nové molekuly, na katedře farmaceutické chemie zkoumají obměny již

známých léčivých látek a na katedře farmaceutické botaniky hledají, izolují a testují látky rostlinného původu.

2 Cíl práce

1. Zpracování spojených frakcí 68-76, vzniklých chromatografií diethyletherového výtřepku z nati zemědělného léčiva (*Fumaria officinalis*), pomocí TLC s cílem získání alespoň jednoho alkaloidu v čistém stavu.
2. Příprava izolované látky, pro určení struktury (se stanovením základních fyz.-chem. charakteristik).
3. Stanovení inhibiční aktivity alkaloidů na acetylcholinesterasu a butyrylcholinesterasu.

3 Teoretická část

3.1 *Fumaria officinalis* L. (Fumariaceae)

Český název: Zemědým lékařský

Synonyma: *Fumaria media* Loisel, *Fumaria sturmii* Opitze⁹

3.1.1 Vznik názvu

Název *Fumaria* je odvozen z latinského *fumus*, což znamená kouř⁹.

3.1.2 Taxonomické zařazení¹⁰

Oddělení:	Magnoliophyta
Třída:	Magnoliopsida
Podtřída:	Ranunculidae
Řád:	Papaverales
Čeleď:	Fumariaceae
Rod:	<i>Fumaria</i>
Druh:	<i>Fumaria officinalis</i> L.

3.1.3 Botanická charakteristika

3.1.3.1 Čeleď Fumariaceae

↓ ♀ **K2 C2 + 2 A4 G(2)**

Obr. 1 - Květní vzorec čeledi Fumariaceae¹⁰

Do čeledi Fumariaceae patří převážně vytrvalé byliny se střídavými, řapíkatými listy bez palistů. Listy jsou trojčetné nebo zpeřené. Květy těchto bylin jsou oboupohlavné, zygomorfní s dvoubratrymi tyčinkami. Kalich je tvořen dvěma opadavými lístky anebo chybí. Korunu tvoří čtyři okvětní plátky ve dvou kruzích. Jednotlivé květy se skládají do hroznů nebo lat. Plody jsou tobolky nebo nažky¹⁰.

Fumariaceae patří do stejného řádu jako Papaveraceae, ale na rozdíl od této čeledi nemá mléčnice. Mléčnice jsou zde nahrazeny trubicovitými idioblasty, které obsahují isochinolinové alkaloidy a fumarovou kyselinu.

Rostliny této čeledi se především vyskytují v mírném pásu severní polokoule. Z farmakognostického hlediska jsou významné rostliny *Corydalis cava* L., která obsahuje hlavně bulbokapnin. Bulbokapnin inhibuje jaterní enzymy CYP 3A4¹¹, má antimikrobní a antivirové účinky⁶ a inhibuje AChE⁷. *Corydalis turtschaninovii* Bess, která obsahuje hlavně protoberberinové alkaloidy, jež mají analgetický účinek. Zajímavé obsahové látky obsahuje také *Fumaria officinalis*¹⁰.

3.1.3.2 Rod *Fumaria*

Do tohoto rodu patří asi 50 druhů. V České republice se můžeme setkat s těmito pěti: *Fumaria carpeolata* L.¹², *Fumaria vaillantii* Loisel¹³, *Fumaria schleicheri* Soi.-Will.¹⁴, *Fumaria rostellata* Knaf¹⁵, *Fumaria officinalis* L.¹⁶. Jsou to jednoleté rostliny, které se vyskytují především v mírném pásu Evropy a Asie. Tyto byliny mají šedomodré zbarvení a jsou lysé. Listy se liší v horní a spodní části rostlin. Spodní listy jsou dlouze řapíkaté na rozdíl od krátce řapíkatých či přisedlých horních listů. Krátce stopkaté květy jsou oboupohlavné a souměrné. Plody jsou nažky, které obsahují jedno semeno. Jednotliví zástupci se liší květem.



Obr. 2 - *Fumaria carpeolata* L.¹², *Fumaria vaillantii* Loisel¹³, *Fumaria schleicheri* Soi.-Will.¹⁴, *Fumaria rostellata* Knaf¹⁵, *Fumaria officinalis* L.¹⁶ (zleva)

3.1.3.3 Druh *Fumaria officinalis* L. – zemědělný lékařský

3.1.3.3.1 Morfologický popis

Zemědělný lékařský je asi 10-40 cm vysoká, sivozelená, jednoletá bylina s tenkým kořenem, která vytváří husté porosty. Má lysou hranatou lodyhu, která je dutá a rýhovaná. Lodyha je přímá nebo vystoupavá a je hustě pokrytá listy. Zelenošedé listy

jsou řapíkaté, peřenodílné až dlanitě dělené. Jednotlivé listy jsou tvořeny z klínovitých, dvojklaných až trojklaných lístků. Květy jsou drobné, až 8 mm dlouhé. Jednotlivé oboupohlavné květy se skládají do souměrných bohatých hroznů. Koruna má čtyři purpurově červené korunní plátky. Horní, větší plátky jsou dozadu vakovitě duté a přecházejí v ostruhu, kde je uložen medník. Spodní vpředu srůstají. Prchavý kalich je tvořen dvěma zoubkovitými lístky. Tyčinky jsou dvě a srůstají nitkami. Semeník je svrchní a vzniká srůstem dvou plodolistů. Plody jsou asi 2 mm velké ledvinovité nažky. Zemědým kvete od května do září^{9,12,17}.



Obr. 3 - Porost, plod, květ *Fumaria officinalis* L.¹⁸

3.1.3.3.2 Stanoviště a rozšíření

Zemědým je plevelná rostlina, která se vyskytuje na zahradách, polích, rumišťích, úhorech, v houštinách, Evropských a Asijských nížin až hor^{9,12,17}.

3.1.4 Historie a lidové léčitelství

Zemědým byl znám již starořeckým a arabským lékařům. Ti ho používali k čištění krve¹⁹. Ve středověku se používal proti svrabu ve formě obkladů. V té době také věřili, že vyháání zlé duchy²⁰. V klášterním léčitelství se zemědým používal k léčbě kožních

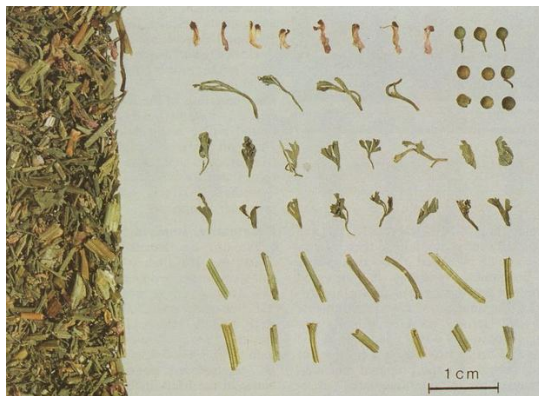
chorob a také jako prostředek k posílení jater, žaludku a jako močopudná droga. V lidovém léčitelství se říká, že kdo ho užívá celý život, dožije se sta let. Dnes se lidově používá k čištění krve, což souvisí s kožními nemocemi, a proto zlepšuje ekzémy, akné, vyrážku a lupenku. Také upravuje srážlivost krve, krevní tlak a posiluje organismus. Používá se ve formě nálevu¹⁹. Doporučená terapeutická dávka podle Českého farmaceutického kodexu (ČFK) je 1,5 g ve formě nálevu, a to k použití jako stomachikum a cholagogum²¹.

3.1.5 Fumariae herba

Synonymum: Herba fumariae

Dle ČFK je to usušená kvetoucí nať druhu *Fumaria officinalis* L. Tato droga je bez zápachu a má nahořklou a trochu slanou chuť.

Mikroskopie: Pokožka na svrchní straně listu se skládá z mnohohranných buněk, někdy se sférokrystaly. Na spodní straně jsou buňky s vlnitými stěnami a na špičce listu jsou buňky protaženy v tuhé papily. Průduchy se nalézají na obou stranách bifaciálního listu. Uvnitř listu se nachází jednořadý palisádový parenchym a úzký houbovitý parenchym s velkými intracelulárními prostory. Květy nemají výrazné charakteristické znaky. Kulatá pylová zrna mají jemně zrnitý povrch a šest velkých klíčných pórů. Pokožku oplodí tvoří mnohohranné buňky s rovnými stěnami, které kryje jemně bradavčitá kutikula. Pod buňkami pokožky se nachází několik řad tenkostěnného parenchymu a vrstva kamenných buněk, které jsou bohatě tečkované a bez intracelulár. Poslední vrstvu tvoří ploché, ztlustlé buňky se silně vlnitými stěnami. Hnědé osemení tvoří tenkostěnné buňky. V endospermu se nacházejí olej a aleuronová zrna²¹.



Obr. 4 - Fumariae herba²²

3.1.6 Obsahové látky

Hlavními obsahovými látkami této rostliny jsou isochinolinové alkaloidy. Dále obsahuje organické kyseliny, flavonoidy, hořčiny, třísloviny, pryskyřičné látky, sliz, minerální látky, stopy silic^{9,23}.

3.1.6.1 Alkaloidy

V rodu *Fumaria* bylo nalezeno kolem 137 isochinolinových alkaloidů. Jednotlivé rody se však liší spektrem alkaloidů (tab.1)²³.

Tab. 1 - Výskyt jednotlivých strukturních typů alkaloidů v druzích rodu *Fumaria*

Rod <i>Fumaria</i>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<i>Fumaria agrafa</i> Lag	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-
<i>Fumaria asepala</i> Boiss.	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>Fumaria bella</i> P. D. Sell	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-
<i>Fumaria bracteosa</i> Pomel	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
<i>Fumaria capreolata</i> L.	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-
<i>Fumaria cilicia</i> Hausskn.	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>Fumaria densiflora</i> DC.	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-
<i>Fumaria gaillardotii</i> Boiss.	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-
<i>Fumaria indica</i> Hausskn.	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-
<i>Fumaria kralikii</i> Jord.	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-
<i>Fumaria macrocarpa</i> Parl.	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-
<i>Fumaria macrosepala</i> Boiss.	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-
<i>Fumaria micrantha</i> Lag.	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-
<i>Fumaria microcarpa</i> Pugsley	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
<i>Fumaria muralis</i> Green.	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-
<i>Fumaria officinalis</i> L.	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
<i>Fumaria parviflora</i> Lam.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
<i>Fumaria petteri</i> Rchb.	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-
<i>Fumaria rostellata</i> Knaf	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-
<i>Fumaria schleicheri</i> Soy. – Will.	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-
<i>Fumaria schramii</i> Velen	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-
<i>Fumaria spicata</i> L.	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-
<i>Fumaria vaillantii</i> Loisel.	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-

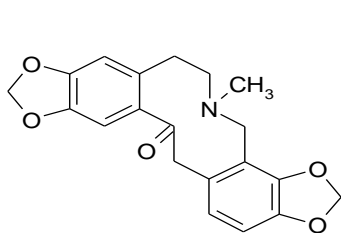
1 typ isochinolinový, 2 benzylisochinolinový, 3 aporfinový, 4 protoberberinový, 5 benzofenanthridinový, 6 protopinový, 7 ftalidisochinolinový, 8 sekoftalidisochinolinový, 9 indenobenzazepinový, 10 spirobenzylisochinolinový, 11 promorfinanový, 12 rhoeadinový

Fumaria officinalis L. obsahuje tyto alkaloidy: protopin, kryptopin, sinaktin, parfumin, fumarilin, fumarofycin, adlumin, fumaritin, dihydrosanguinarin, koptisin, korytuberin, adlumicein, fumaricin, *O*-metylfumarofycin, *N*-metylstylopin, stylopin^{23,24}, bulbokapnin, bulgaramin, fumarilicin, fumaritridin, fumaritrin, fumaritrilin, fumaroficinalin, fumarolin, cheilanthifolin, kanadin, korydaldin, korydamin, *N*-methylhydrastein, skoulerin²³.

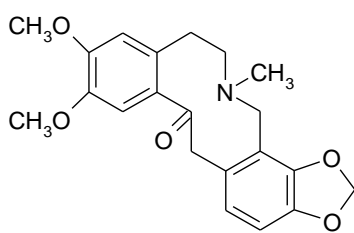
Tab. 2 - Zařazení alkaloidů dle strukturního typu²³

typ	alkaloid
isochinolinový	korydaldin
aporfinový	bulbokapnin
protoberberinový	sinaktin, koptisin, stylopin, metylstylopin, cheilanthifolin, kanadin, skoulerin
benzofenanthridinový	dihydrosanguinarin, korydamin
protopinový	kryptopin, protopin
secoftalidisochinolinový	<i>N</i> -methylhydrastein, adlumicein
indenobenzazepinový	bulgaramin, fumaritrin
spirobenzylisochinilinový	parfumin, fumaritin, fumarofycin, fumarilin, fumaritrilin, fumaricin, fumarilicin, <i>O</i> -metylfumarofycin
alkaloidy neznámé struktury	fumaroficinalin, fumarolin

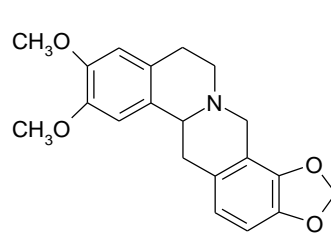
Tab. 3 - Příklady vzorců některých alkaloidů



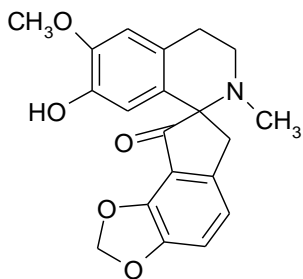
protopin



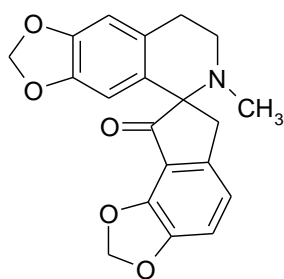
kryptopin



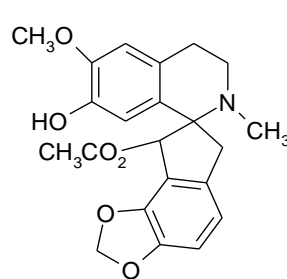
sinaktin



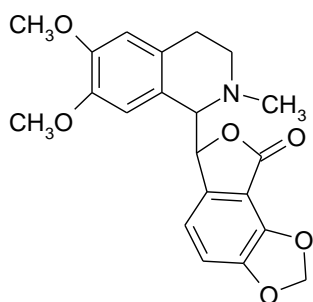
parfumin



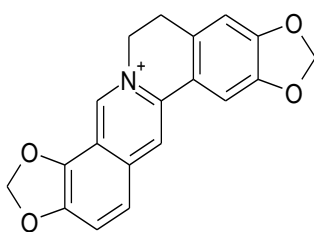
fumarilin



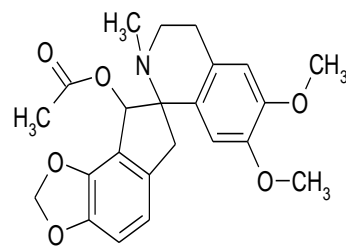
fumarofycin



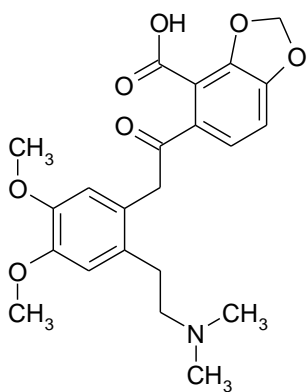
adlumin



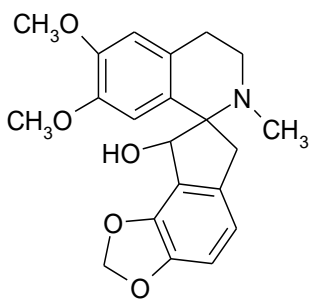
koptisin



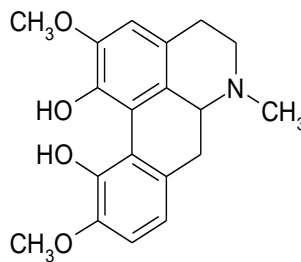
O-metylfumarofycin



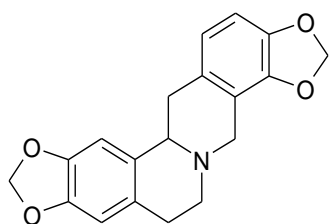
adlumicein



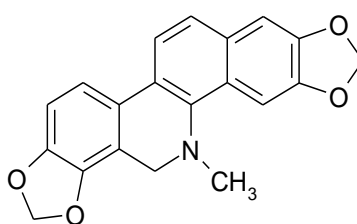
fumaricin



korituberin



stylopin



dihydrosanguinarin

3.1.6.2 Další látky

Zastoupení organických kyselin v jednotlivých rodech *Fumaria* se opět liší. Ve *Fumaria officinalis* jsou následovné kyseliny: kyselina *p*-kumarová, kyselina ferulová, kyselina fumarová, kyselina protokatechová a kyselina kávová²⁴ (Tab. 4).

Z flavonoidů zde byly nalezeny isokvercetin, kvercetin-3,7-diglukosid, kvercetin-3-arabinosid, rutin, kampferol-arabinosid²³.

Tab. 4 - Zastoupení organický kyselin v rostlinách rodu *Fumaria*²⁴

organická kyselina	F. agraria	F. preolata	F. densiflora	F. muralis	F. officinalis	F. parviflora	F. spicata	F. vaillantii
kyselina kávová	+	+	+	+	+	+	+	+
methylester kys. kávové	-	+	-	-	-	-	-	-
kyselina citronová	-	-	-	-	-	-	-	-
kys. <i>p</i> -kumarová	+	+	+	-	+	-	-	-
kyselina ferulová	+	+	-	-	+	-	-	-
kyselina fumarová	+	+	+	+	+	+	+	+
kyselina jablečná	+	+	+	+	-	-	+	+
3-hydroxybenzoová kyselina	-	-	-	-	-	-	-	-
kyselina protokatechová	+	+	+	-	+	-	-	-

3.1.6.3 Biologická aktivita obsahových látek rodu *Fumaria*

Obsahové látky rostlin rodu *Fumaria* jsou velice atraktivní pro výzkum biologické aktivity, jak dokazuje i množství prací zkoumající celé rostliny nebo jen konkrétní látky z nich izolované. Na univerzitě v Iránu, na katedře farmakognózie, zjistili hypoglykemickou aktivitu extraktu z *F. parviflora* na diabetických krysách⁴. Turečtí kolegové objevili antivirovou a antifungální aktivitu alkaloidů z rodu *Fumaria* a *Corydalis*⁶. Podle výsledků další práce má ethanolový extrakt *F. parviflora*, účinky proti střevním křečím, významné kardioinhibiční, antiarytmické, hypotenzivní a antipyretické účinky²⁵. Studie z indické National Botanical Research Institute dokládá hepatoprotektivní účinky *F. indica* i samotného protopinu²⁶. Sanguinarin má antiagregační účinky²⁷. Alkaloidy tohoto rodu mají i antioxidační účinky²⁸. Zkoušena byla i inhibiční aktivita na AChE a BuChE, v různých rostlinách rodu *Fumaria*, která

se, v množství 1mg/ml metanolového extraktu, ukázala velmi silná (Tab. 5)²⁹. I další práce prokázaly alespoň slabou inhibiční aktivitu vůči AChE a BuChE (Tab. 6, 7)^{7,8}.

Tab. 5 - Anticholinesterasová aktivita některých rostlin čeledi Fumariaceae²⁹

rostlinný druh	inhibice v %			
	AChE (10 µg/ml)	BChE (10 µg/ml)	AChE (1 mg/ml)	BChE (1 mg/ml)
<i>Corydalis solida</i> subsp. <i>solida</i>	8.05 ± 0.98	29.08 ± 0.88	87.56 ± 1.24	93.18 ± 0.89
<i>Fumaria vaillantii</i>	12.00 ± 1.07	6.43 ± 0.77	94.23 ± 0.47	99.32 ± 0.25
<i>Fumaria capreolata</i>	33.99 ± 0.68	13.44 ± 0.32	96.89 ± 0.17	89.24 ± 0.83
<i>Fumaria kralikii</i>	5.09 ± 0.99	0	84.98 ± 1.07	75.43 ± 0.98
<i>Fumaria asepala</i>	9.76 ± 0.89	14.65 ± 1.61	91.99 ± 0.70	93.12 ± 0.28
<i>Fumaria densiflora</i>	17.43 ± 0.73	0	93.42 ± 0.92	85.66 ± 1.24
<i>Fumaria flabellata</i>	23.05 ± 0.11	2.51 ± 0.40	92.14 ± 1.01	87.91 ± 0.61
<i>Fumaria petteri</i> subsp. <i>thuretii</i>	15.33 ± 0.67	4.00 ± 0.97	89.45 ± 0.86	87.32 ± 0.76
<i>Fumaria macrocarpa</i>	25.02 ± 0.35	16.62 ± 0.43	93.43 ± 0.64	88.74 ± 0.34
<i>Fumaria cilicica</i>	13.09 ± 0.13	2.01 ± 0.55	88.03 ± 0.65	80.03 ± 0.28
<i>Fumaria parviflora</i>	14.05 ± 0.78	10.76 ± 0.33	87.02 ± 0.31	87.09 ± 1.45
<i>Fumaria judaica</i>	54.44 ± 0.56	3.00 ± 0.12	96.47 ± 0.63	98.43 ± 0.39
Standard				
Galanthamin	5.08 ± 0.34	11.23 ± 0.87	48.80 ± 0.31	80.31 ± 1.14

Tab. 6 - Inhibiční aktivita alkaloidů izolovaných z *Fumaria officinalis* L. vůči AChE a BuChE⁸

alkaloid	IC ₅₀ (µM)	
	AChE	BuChE
protopin	345,4±6,9	239,6±7,2
kryptopin	477,7±47,3	270,8±39,1
(-)-fumaricin	>1000	>1000
(+)-bikukulin	626,1±122,7	329,0±90,2
galanthamin ¹	1,71±0,07	42,3±1,3
huperizin A ¹	0,03±0,001	>1000
fysostigmin ¹	0,063±0,001	0,130±0,004
¹ referenční látka jako zdroj enzymů byly použity lidské erytrocyty a lidská plazma		

Tab. 7 - Anticholinesterasová aktivita některých rostlin⁷

druh	inhibice AChE (%)		galantamin mg/ml
	0,1 µg/ml	10 µg/ml	
<i>Galanthus nivalis</i>	5,9 ± 0,8	43,5 ± 2,0	
<i>Galanthus eluvesii</i>	4,8 ± 2,2	78,0 ± 0,4	1,4
<i>Leucojum aestivum</i>	21,3 ± 1,4	86,3 ± 0,4	3,5
<i>Zephyranthes concolor</i>	20,2 ± 3,5	88,0 ± 0,2	2,6
<i>Sternbergia colchiciflora</i>	0	18,4 ± 3,7	
<i>Pancrttum maritimum</i>	0	22,4 ± 3,1	<0,01
<i>Corydalis solida</i>	0	6,9 ± 0,7	
<i>Chelidonium majus</i>	0	11,8 ± 0,7	
<i>Coridalis bulbosa</i>	0	47,0 ± 0,8	
<i>Fumaria officinalis</i>	0	13,7 ± 2,5	
<i>Fumaria vaillantii</i>	0	12,2 ± 1,8	
<i>Glaucium flavum</i>	0	30,6 ± 5,9	

I další obsahové látky mají zajímavé biologické účinky. U některých derivátů kyseliny kávové byl prokázán inhibiční efekt na replikaci viru hepatitidy typu C³⁰. Kyselina kávová má také spasmolytické účinky na hladkou svalovinu orgánů potkanů³¹. Kyselina *p*-fumarová má protizánětlivé účinky³², je terapeuticky účinná v léčbě lupenky³³ a má potenciál při hledání léčby u roztroušené sklerózy³⁴. Kyselina *p*-kumarová společně s kyselinou kávovou mají také protizánětlivý účinek³⁵. Při studii na krysách bylo dokázáno, že kyselina *p*-kumarová má protektivní účinky na ledviny, kdy bylo podávané nefrotoxické kadmium³⁶. Fenolové kyseliny, jako jsou kyselina kávová, *p*-kumarová a ferulová, vykazují i antitimikrobní a antioxidační aktivitu³⁷. Další z kyselin, které se nacházejí ve *Fumaria officinalis*, je kyselina protokatechová, u které byl zjištěn antiapoptický efekt na srdce zatížené hypertenzí a dále antioxidační efekt³⁸. Byla prokázána i antibakteriální účinnost s možným využitím v potravinářství³⁹. Jedna studie doložila účinek antihyperglykemický na diabetických krysách⁴⁰. Dalším významným účinkem kyseliny protokatechové je neuroprotektivní efekt u buněk, kde byla vyvolána apoptóza oxidačním stresem, čehož by se dalo využít v léčbě neurodegenerativních onemocnění jako je například Parkinsonova choroba⁴¹.

Podle studií vykazoval sumární extrakt *Fumaria officinalis* určitou inhibiční aktivitu vůči AChE a BuChE a tedy má potenciální využití v léčbě AD.

3.2 Alzheimerova choroba

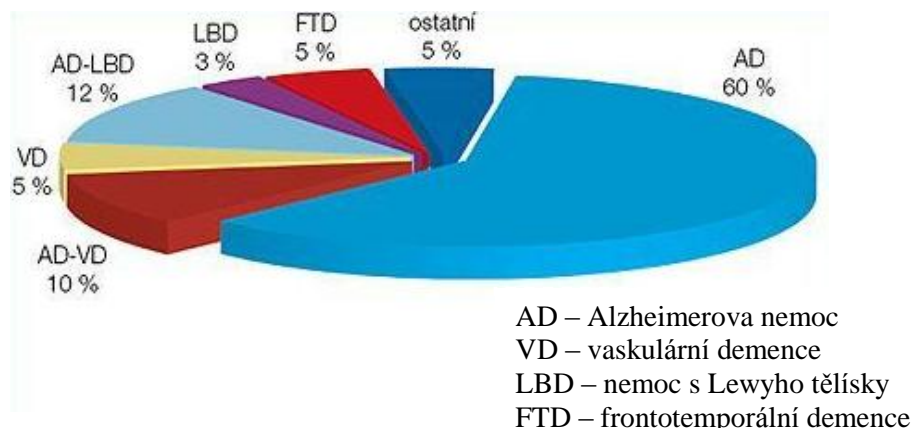
Alzheimerova choroba byla známa již v 1. polovině 20. století. Tehdy byla tato nemoc vzácná, ale dnes je to nejčastější příčina demence⁴². Lékař Alois Alzheimer, po kterém byla tato nemoc pojmenována, popsal a přednesl, v roce 1906, případ paní Auguste D. Tento případ je považován za oddělení Alzheimerovy demence od ostatních demencí. V té době byly objeveny senilní plaky a neuronální klubka, což jsou typické histologické znaky této nemoci. Při AD dochází k úbytku mozkové tkáně. Důsledkem toho dochází k nedostatku neuromediátorů, jako jsou acetylcholin, noradrenalin, dopamin a serotonin, a k poruchám mozkových funkcí. Dochází k poškození kognitivních i pohybových funkcí, ztrátě motivace a zájmu o dřívější záliby, snížení intelektu a poruchám chování. Počet nemocných v populaci stále roste s prodlužující se délkou života, jelikož výskyt nemoci souvisí s věkem^{43,44,45}. V roce 2010 bylo v České republice asi 120 tisíc lidí trpících AD a očekává se, že do roku 2050 se toto množství nemocných zdvojnásobí. V celé EU pak žije asi 7,3 milionů lidí s demencí⁴⁶. AD je čtvrtou příčinou úmrtí v západních zemích. Tato nemoc je velmi náročná jak z hlediska sociálního, pro nemocné i jejich rodiny, tak z hlediska ekonomického, jelikož léčba a péčování o nemocné jsou velmi nákladné⁴⁷.

3.2.1 Epidemiologie

Incidence je počet nových případů onemocnění, které jsou zjištěny v určitém časovém období v populaci, kde existuje riziko, že se nemoc vyskytne. Prevalence je počet onemocněných v celé zkoumané populaci⁴³. AD je nejčastěji se vyskytující forma demence, tvoří až 60 % případů onemocnění demencí⁴⁸. Studie ukázaly, že prevalence i incidence AD roste s věkem a to velmi strmě.

AD se vyskytuje v několika formách. Raná forma je ta, u které se příznaky objeví ještě před 60. rokem života. U pozdní formy se příznaky objeví až po 60 roce života. Dále rozeznáváme formu familiární, která tvoří asi 5-10 % nemocných AD, a formu sporadickou, která činí zbylých 90-95 %. Incidence AD presenilní formy u skupiny 40-60 let činí asi kolem 2,4/100 000 osob/rok. U formy pozdní to je asi kolem 120-130/100 000 osob/rok. Prevalence je zhruba v 62,5 roce asi 0,7 % a každých 4,5 roku se zdvojnásobuje. Toto zjištění vysvětluje, proč kolem 65. roku života trpí AD

asi 10 % populace, kdežto ve skupině 85 let je to již téměř polovina populace. Ve vyšším věku onemocní ženy 2-3krát častěji než muži⁴⁵.



Obr. 5 - Výskyt jednotlivých typů demence⁴⁸

3.2.2 Rizikové faktory

Již z epidemiologie vyplývá, že AD souvisí s věkem. S rostoucím věkem se zvyšuje výskyt a tedy i riziko AD. Další velmi významný faktor je familiární výskyt, který je podmíněn genetickými vlivy společně s vlivy zevního prostředí. Pro pozdní formu AD je rizikový faktor nosičství alely ϵ -4 genu pro apolipoprotein E, locus na 12. chromozomu a mutace mitochondriální DNA. U rané formy AD jsou rizikové faktory mutace v genu pro amyloidový prekurzorový protein (APP), která se nachází na chromozomu 21, mutace genu pro presenilin 1 na chromozomu 14 a mutace genu pro presenilin 2 na chromozomu 1. Ale nejenom dědičnost se podílí na vzniku a rozvoji této nemoci. Z dalších faktorů, které mohou hrát roli při rozvoji AD, jsou to úrazy hlavy, nižší vzdělání, kouření, hliník, zinek a pohlaví^{43,45,44}.

Vliv úrazu hlavy na rozvoj AD je sporný, několik studií toto tvrzení vyvrací a naopak existují i studie, které jej potvrzují. Jedna z nich říká, že u pacientů, kteří utrpěli poranění hlavy a navíc mají nosičství ϵ -4-alely, je až desetinásobně vyšší riziko, že onemocní AD⁴⁹. I další studie potvrzuje možnou souvislost mezi poraněním hlavy a rozvojem AD⁵⁰.

Studie zkoumající vliv výše vzdělání na AD opět nejsou jednotné. Některé studie uvádějí, že vzdělání má minimální vliv na rozvoj AD. Jiné práce říkají, že u lidí, kteří mají vyšší vzdělání, a tedy „trénovaný mozek“, je pomalejší rozvoj a nižší riziko AD⁴³.

Kouření je jedno z nejrizikovějších chování pro rozvoj různých civilizačních nemocí, jako je rakovina plic, bronchitidy, sklerotizace tepen a jiné. Ve studiích zkoumající vliv kouření na rozvoj AD, se ale objevily i názory, že kouření má naopak protektivní účinky. Avšak v poslední době převládají názory, že kouření je významným rizikovým faktorem i při vzniku AD⁵¹.

Je prokázáno, že hliník je neurotoxická látka. Byl zjišťován vliv neurotoxicity hliníku na rozvoj AD. V některých studiích bylo popsáno zvýšené množství hliníku v mozku nemocných. Hliník může ovlivňovat tvorbu abnormálního τ -proteinu a přispívat k tvorbě neuronálních klubek a neuritických plak. Novodobé studie se však přiklánějí k názoru, že hliník nemá přímý vliv na rozvoji AD^{43,45,52}.

Dalším neurotoxickým prvkem je zinek. V nízkých dávkách je pro organizmus důležitý, ale ve vysokých může působit škodlivě. Studie dokládají, že se zinek může podílet na rozvoji AD. Zinek se pravděpodobně podílí na vzniku amyloidových plak a oxidačním stresu, který má za následek poškození nervové tkáně a apoptózu. Zinek se pak kumuluje v poškozených neuronech. Dnes se uvažuje i o možnosti léčby AD pomocí chelatačních látek, které by vychytávaly zinek a mohly by rozpustit amyloidové plaky^{43,53}.

Jak už bylo výše zmíněno, ženy trpí AD častěji, ale nejsou jasné důkazy, že by pohlaví mělo vliv na rozvoji AD. Byl zkoumán i vliv podávání estrogenů ženám v menopauze. Závěry jsou opět velmi sporné. Jedny studie tvrdí, že podávání estrogenů může snížit riziko AD, ale jiné to popírají⁴⁵. Terapeuticky se však estrogény používají⁵⁴.

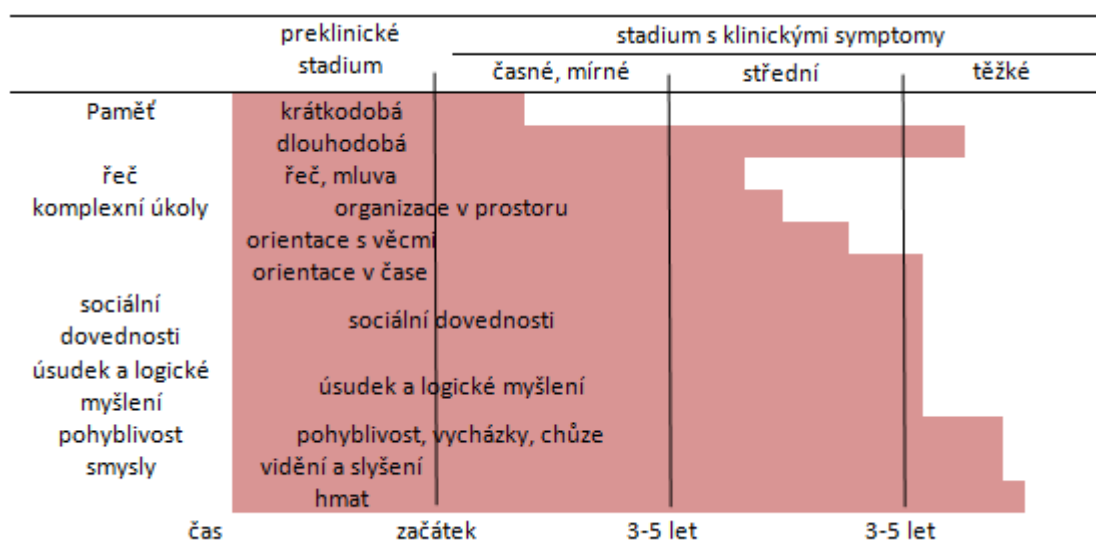
3.2.3 Klinický obraz

Vývoj této nemoci může trvat až desítky let. Udává se 8-20 let v závislosti na životním stylu a zdravotním stavu jednotlivce. Projevy u jednotlivých pacientů bývají podobné, ale nemusí být vždy stejné. Každý pacient svou nemoc vnímá odlišně.

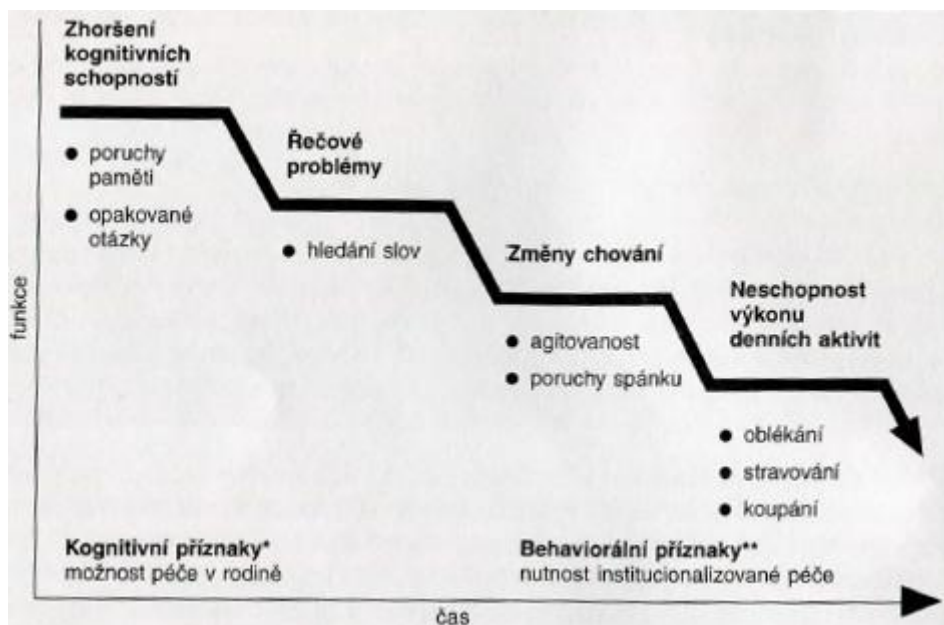
AD se dělí na několik stádií. První stadium je preklinické. Toto stadium je bezpříznakové a trvá do objevení prvních příznaků, pravděpodobně několik let. Dochází k progresivnímu odumírání nervových buněk, což se poté projevuje určitými příznaky, které se stupňují s postupující chorobou. S prvními příznaky nastupuje rané období. Nástup nemoci bývá velmi pozvolný a téměř nepostřehnutelný, ale s jejím postupem nemocní ztrácí jednotlivé mozkové funkce a nemoc se více projevuje⁵⁵.

První příznaky se projevují poruchami krátkodobé paměti, dlouhodobá je zachována. Paměť je jedno z prvních center, jež je postiženo při odumírání neuronů. Pacient začíná zapomínat, co měl k obědu, co má nakoupit, kam si položil brýle, koho potkal, co četl a podobně. Okolí si těchto příznaků nemusí vůbec všimnout, jelikož zapomnětlivost ke stáří patří. Postupně se přidávají poruchy řeči. Řeč bývá sice plynulá, ale nemocní těžko hledají slova a nemohou se vyjádřit. Nastává třetí stádium nemoci (mírné stádium). Postupně se zhoršují další funkce jako schopnost plánovat, logické myšlení, úsudek, sociální dovednosti, orientace. Pacient se ztrácí nejprve na neznámých a později i na známých místech, kde se každý den pohybuje. V tomto stádiu se mohou objevit i deprese, halucinace, agresivita a nespavost, které většinou nepřetrvávají. Často se objevuje i tzv. anozognozie, která ztěžuje léčbu. Pacient si neuvědomuje, že je nemocný a je přesvědčen, že mu vůbec nic není, a proto odmítá léčbu. Při dalším vývoji nemoci se objevují poruchy chování, blouznění a někdy i paranoia. Pacient přechází do středního stádia nemoci a nakonec do pozdního. V pozdní fázi se pacient nedovede sám obléci, nevybaví si, jak se používají věci denní potřeby. Nakonec pacient přestává reagovat, nepoznává příbuzné a známé a je plně odkázaný na pomoc ostatních. Nemocný nepřichází jen o kognitivní funkce, ale také o pohyblivost. Neudrží se vsedě a často dochází i k inkontinenci moči a stolice a oněmění. V některých případech se objevuje i hubnutí^{43,45,55}.

Střední délka přežití je u rané i pozdní formy této nemoci stejná. Při rané dochází k dřívějšímu nástupu příznaků, ale i dřívější smrti. Má rychlejší průběh. U pozdní formy je to naopak⁴³.



Obr. 6 - Zachované dovednosti v různých stádiích AD⁵⁵



Obr. 7 - Progrese Alzheimerovy choroby⁴⁷

3.2.4 Patofyziologie

Příčinu vzniku AD neznáme, ale byly zjištěny patologické změny, jak na orgánové tak i na buněčné a biochemické úrovni, na které můžeme působit, a tak ovlivnit průběh nemoci. Změny, které probíhají v mozku při AD, jsou velmi podobné jako při stárnutí, ale probíhají s mnohem větší intenzitou a rychleji. Snižuje se hmotnost i objem mozku a ztenčuje se tloušťka mozkové kůry. Mozkové komory se naopak rozšiřují⁴³. Dochází k odumírání neuronů a to zejména v mozkové kůře a hippocampu. Z odumřelých částí nervových buněk, které mají jádro tvořené β -amyloidem, se tvoří senilní plaky a společně s neuronálními klubky se akumulují. Neurální klubka jsou vlákna, které spojuje τ -protein. Z důvodu poškození neuronálních spojení dochází k poškození systémů neurotransmise. Nejvíce se projevuje poškození cholinergního systému. Klesá hladina acetylcholinu a naopak stoupá množství AChE, která způsobuje jeho rozklad. Dále klesají hladiny serotoninu, noradrenalinu, dopaminu, somatostatinu, GABA, vasopresinu a dalších⁴⁷.

3.2.4.1 Cholinergní hypotéza

Acetylcholin je jeden z nejdůležitějších neuromediátorů v centrálním nervovém systému (CNS). Je syntetizován enzymem cholinacetyltransferasou, v neuronech z cholinu

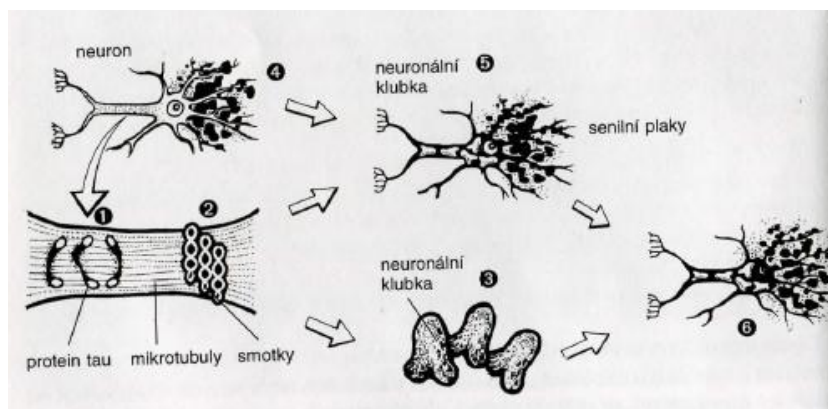
a acetyl-CoA, a odbouráván AChE v CNS a na periférii BuChE. Má řadu důležitých funkcí, které uskutečňuje vazbou na muskarinové a nikotinové receptory, jak presynaptické tak postsynaptické. Funguje jako neurotransmiter, který ovlivňuje paměť, učení a další kognitivní funkce, i jako neuromodulátor, který má inhibiční nebo excitační účinek na vzdálenější neurotransmiterové systémy. U nemocných s AD dochází k poklesu cholinergních neuronů i cholinacetyltransferasy a v důsledku toho i tvorby acetylcholinu. Následky se projeví na chování pacienta. Cholinergní hypotéza předpokládá, že se acetylcholin podílí na ovlivnění tvorby APP, a proto při snížené aktivitě receptorů acetylcholinem dochází k vyšší fosforylaci a chybnému zpracování APP, což vyústí v tvorbu nerozpustného β -amyloidu a následně i senilních plaků⁴⁷.

3.2.4.2 Neurony

U neuronů dochází k numerické atrofii, početnímu úbytku. Neurony produkují neurotransmitery, jako je acetylcholin, noradrenalin, somatostatin a jiné. Důsledkem atrofie se snižuje počet receptorů i produkce těchto nervových přenašečů a dochází k určitým biochemickým změnám. Tyto změny se následně projevují jako poškození určité části mozku. Přesný důvod proč dochází k neurální smrti, není jistý. Možnými důvody apoptózy jsou ukládání β -amyloidu či oxidační stres⁴³.

3.2.4.3 Senilní plaky

Senilní plaky jsou oválné útvary velké 10-200 μm , které tvoří masivní jádro z nerozpustného β -amyloidu a zbytky z odumřelých nervových buněk. β -Amyloid je vytvořen štěpením transmembránového APP, který je běžně přítomen ve stěnách nervových buněk. APP je štěpen α -sekretasou a γ -sekretasou na rozpustný produkt. Za určitých podmínek se může štěpit také β - a γ -sekretasami, které štěpí APP v jiném místě, a tak vzniká nerozpustný β -amyloid. Jednotlivé β -amyloidy se shlukují a oligomerují. Tyto oligomery jsou neurotoxické a poškozují synapse, mitochondrie i jiné části neuronů. Shluky β -amyloidu, tvořící se v extracelulárních prostorech, tvoří jádro amyloidového (senilního) plaku. Na toto jádro adherují poškozené neurity, gliové elementy a někdy i části kapilár a dendritů. Následkem vzniku plaků se uvolňují volné radikály, zánětlivé cytokiny a enzymy a dochází k tvorbě sterilního zánětu. Společně s dalšími procesy to vede ke zvýšení apoptózy neuronů^{44,56}.



Obr. 8 - Vznik senilních plaků a neuronálních klubek⁴⁷

3.2.4.4 Neuronální klubka

Neuronální klubka jsou shluky hrubších vláken, které mají tvar jako plamének. Hlavní složkou těchto klubek jsou párová spirální vlákna, která jsou spojena τ -proteinem. τ -Protein, je strukturální bílkovina, která stabilizuje neurotubuly. Za fyziologických podmínek se váže na tubulin mikrotubulů, kde je následně defosforylován, a tak se podílí na jejich stabilizaci⁴⁵. U AD je τ -protein hyperfosforylován a má jednodušší formu než obvykle. Při hyperfosforylaci dochází k polymerizaci τ -proteinu a tvorbě párově spirálovitých vláken. Klubka poškozují neurony a ty ztrácejí funkčnost a zanikají. Existuje teorie, která tvrdí, že za degeneraci τ -proteinu mohou toxické shluky β -amyloidu, ale není potvrzena^{44,56}.

3.2.4.5 Apolipoprotein E

Apolipoprotein E je protein, který se stará o redistribuci tuků v těle. Apo E se v těle nachází ve třech formách, jako Apo E1, Apo E2 a Apo E4. Nejběžnější formou je Apo E3, který se vyskytuje až u 78 % obyvatel. Apo E2 je naopak velmi vzácný a najdeme ho jen asi u 8 % obyvatel. Z pohledu AD je významný Apo E4. Tato forma Apo E se vyskytuje asi u 17 % obyvatel. U lidí postižených AD se objevuje gen, kódující Apo E4, častěji než pro ostatní isoformy. Nosičství genu pro Apo E4 je rizikovým faktorem pro vznik AD. Podílí se na vzniku senilních plaků a neuronálních klubek, kde se ukládá. Společně s amyloidem se ukládá i do stěn cév, kde způsobují amyloidovou angiopatii. Takto postižené cévy ztrácí svojí funkci a je to jedna z příčin neúrazového mozkového krvácení^{43,44}.

3.2.4.6 Zánět a oxidační stres

Jak již bylo řečeno dříve, při tvorbě senilních plak dochází k uvolňování zánětlivých mediátorů a volných radikálů. Tyto látky pak způsobují zánět a poškozují buněčné proteiny, membránové lipidy buněk i nukleové kyseliny, a tak způsobují další umírání neuronů a poškození mozku⁴⁴.

3.2.5 Terapie Alzheimerovi choroby^{43,44,45,47,54}

Nejlepší způsob léčby je odstranit příčinu, tedy léčba kauzální, ale u AD příčinu nemoci neznáme, a proto se terapie snaží ovlivnit symptomy nemoci a oddálit zhoršení stavu nemocného. Neléčí se pouze farmakologicky, ale používají se i nefarmakologické metody. Velmi důležitou součástí terapie je proto socioterapie, psychoterapie, trénink kognitivních funkcí a podpora od rodiny a přátel nemocného.

Farmakoterapie se zaměřuje na dva okruhy léčby. Jednak na terapii poruch kognitivních funkcí a dále na léčbu poruch nekognitivních funkcí, které vznikají progresí nemoci.

3.2.5.1 Působení na kognitivní funkce

Tato léčba je zaměřená na zlepšení kognitivních funkcí, paměti, motivace, orientace aj. a na oddálení jejich degradace. Za hlavní důvod poruch kognitivních funkcí je považováno poškození cholinergního systému v mozku, a proto se strategie léčby zaměřuje na jeho ovlivnění ve smyslu zvýšení funkce. Je možno působit na několika úrovních: substituce neurotransmiteru, ovlivnění receptorů a zabránění degradace neurotransmiteru.

3.2.5.1.1 Prekurzory acetylcholinu

Dodání samotného acetylcholinu je nemožné kvůli jeho velmi krátkému poločasu. Ani cholin není vhodný k substituci, jako prekurzor, jelikož neprostupuje přes hematoencefalickou bariéru. Běžně se v mozku syntetizuje cholin z látek, které ho po rozštěpení uvolní, jako jsou fosfatidylcholin, fosfatidylinositol a fosfatidylserin.

Terapeuticky se využívá lecitin, nejčastěji sojový lecitin, což je glycerol substituovaný fosfatidylcholinem a mastnými kyselinami. Nevýhodou této léčby je, že

při AD klesá množství enzymu, který syntetizuje acetylcholin z jeho prekurzorů. V klinické praxi nejsou výsledky podávání lecitinu příliš uspokojivé. Nejčastěji je podáván jen jako kombinovaná léčba s inhibitory cholinesterasy.

3.2.5.1.2 Inhibitory cholinesteras (kognitiva)

U AD dochází k zvýšené aktivitě a množství enzymů, které rozkládají acetylcholin na cholin a kyselinu octovou. Hlavními enzymy jsou AChE a BuChE. Tyto enzymy můžeme blokovat, a tak zabránit degradaci acetylcholinu a zvýšit jeho nabídku k vazbě na receptor. Tento způsob je zatím nejlepší a nejdůležitější v terapii lehké a střední formy AD. Existuje několika možností, jak blokovat cholinesterasy. První způsob je reverzibilní blokáda, kdy cholinesterasa je inhibována tak dlouho, dokud je přítomný inhibitor, po odbourání je opět cholinesterasa aktivní. Druhý způsob je ireverzibilní blokáda, kdy se inhibitor naváže na cholinesterasu pevnou vazbou, kterou jí inaktivuje a poté se odbourají jako komplex. Třetí formou blokády je pseudoireverzibilní blokáda. Inhibitor vytěsňuje acetylcholin z vazby na cholinesterasu a naváže se na jeho místo. Cholinesterasa odbourává inhibitor místo acetylcholinu. Působení blokády je delší než přítomnost inhibitoru.

Dle chemické struktury lze inhibitory cholinesteras rozdělit do několika skupin. Akridinové přípravky patří mezi reverzibilní inhibitory. Do této skupiny patří tetrahydroaminoakridin, který je znám pod názvem takrin. Tato látka má velmi dobrou účinnost, ale je také vysoce hepatotoxická, a proto byla stažena z klinického užití.

Piperidinové deriváty jsou čisté inhibitory AChE. Právě zástupce této skupiny je jeden z nejpoužívanějších přípravků pro léčbu AD. Jedná se o donepezil. Donepezil má dlouhý eliminační poločas, což umožňuje podávání jedenkrát denně. Je účinný, velmi dobře snášen a má jen minimální nežádoucí účinky.

Karbamátové deriváty jsou odvozeny od přírodní látky fysostigminu, která se používá pouze experimentálně. Má velmi krátký poločas a mnoho nežádoucích účinků. Postupnými obměnami a prodlužováním postranního řetězce se přišlo na látky s lepšími vlastnostmi. Mezi tyto látky patří i terapeuticky využívaný rivastigmin.

Mezi další přírodní látky, které mají význam při léčbě AD, patří galanthamin a huperzin A. Galanthamin je alkaloid izolovaný z cibulí sněženky a jiných rostlin čeledi Amarillidaceae. Tento alkaloid reverzibilně inhibuje AChE a alostericky moduluje nikotinové receptory. Modulace zvyšuje přenos na receptorech, a brání tak

hyposenzitivitě muskarinových receptorů a zvyšuje výdej acetylcholinu⁵⁷. Huperzin A je lykodinový alkaloid, který se vyskytuje v čeledích Huperziaceae, Lycopodiaceae (rody *Huperzia* a *Selaginella*). V čínské medicíně se používá rostlina *Huperzia serrata* a další rostliny z této čeledi jako prostředek snižující teplotu, k léčbě pohmožděnin a krevních ztrát a při schizofrenii. Huperzin A prostupuje přes hematoencefalickou bariéru do mozku, kde vykazuje vysokou afinitu k AChE. Působí zde jako reverzibilní inhibitor. Dále studie ukázaly, že má i antioxidační účinky a zmírňuje toxicitu β -amyloidu. V klinickém zkoušení vykazuje slibné výsledky, a proto se dá očekávat, že huperzin A bude přínosem v léčbě AD⁵⁸.

Organofosfáty patří mezi ireverzibilní inhibitory cholinesteras. Zástupcem z této skupiny je metrifonát, který se již klinicky užíval s dobrými výsledky.

3.2.5.1.3 Látky ovlivňující muskarinové a nikotinové receptory

Látky z této skupiny jsou zatím jen ve fázi zkoušení. Nadějně vyhlíží xanemolin, což je agonista postsynaptických M₁ receptorů.

3.2.5.1.4 Další látky

K dalším látkám patří vitamín E, který prokázal značné antioxidační účinky, nootropika piracetam a pyritinol. Piracetam u zvířat zlepšuje uvolňování acetylcholinu a pyritinol kromě nootropních účinků likviduje volné kyslíkové radikály.

3.2.5.2 Působení na nekognitivní funkce

Do této skupiny patří léčba paranoie, halucinací, poruch spánku, úzkostí a deprese, emočních poruch a dalších^{45,47}. Ze skupin léčivých přípravků jsou používány antidepressiva, léčiva při poruchách spánku, zejména zolpidem a zopiklon, anxiolytika a neuroleptika⁴⁷.

4 Experimentální část

4.1 Materiál a vybavení pro izolaci

4.1.1 Rozpouštědla a chemikálie

lékařský benzín lékopisné kvality ČL 2009 (Penta) (Bz)

chloroform p. a. (Penta) (CHCl_3)

diethylether p. a. (LachNer, CZ) (Et_2O)

ethanol 95%, denaturovaný methanolem p. a. (Penta) (EtOH)

Kyselina chlorovodíková p. a. (LachNer) (HCl)

uhličitan sodný, bezvodý (Penta)

diethylamin p. a. (LachNer) (Et_2NH)

cyklohexan p. a. (Penta) (C_6H_{12})

toluen p. a. (Penta) ($\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_3$)

4.1.2 Detekční činidla

Dragendorffovo činidlo

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

roztok B: 16 g jodidu draselného se rozpustí ve 40 ml vody

zásobní roztok: roztoky A a B se smísí v objemu 1:1

detekční roztok: 5 ml zásobního roztoku se přidá k roztoku 10 g kyseliny vinné v 50 ml vody

4.1.3 Pomocné látky

Křemelina Celite 535 John's Manville (Sigma-Aldrich, CZ)

Argon (5.0)

4.1.4 Vytvájecí soustavy pro TLC

S₁: cyklohexan+toluen+diethylamin (10:10:1)

S₂: cyklohexan+toluen+diethylamin (65:30:5, 55:40:5)

S₃: toluen+diethylamin (97:3, 9:1)

S₄: toluen+chloroform+diethylamin (45:45:10).

S₅: cyklohexan+diethylamin (9:1)

4.1.5 Absorbenty pro chromatografii

Komerční desky se silikagelem Merck: TLC Silicagel 60 F₂₅₄ (Merck, CZ)

Nalévané desky se silikagelem: Kieselgel 60 GF₂₅₄ (Merck, CZ)

Al₂O₃ neutrální (fa ACROSS, velikost zrn 40-200 µm) deaktivovaný 6 % vody, stupeň aktivity Brockmann III

silikagel L 0,04-0,08 mm, vyčištěný (Lachema)

4.1.6 Přístroje a pomůcky

Vakuová odparka Büchi Rotavapor R-114

4.1.7 Rostlinný materiál

Fumaria officinalis L. (Fumariaceae) sušená nat' od firmy Megafyt s. r. o., (Vrané nad Vltavou). Vertifikace provedena Prof. RNDr. L. Opletalem, CSc. Dokladové vzorky rostliny jsou uloženy v herbáři na FaF UK HK.

4.2 Materiál a vybavení pro stanovení cholinesterasové aktivity

4.2.1 Chemikálie

Dihydrogenfosforečnan sodný, bezvodý, p. a. (Penta)

Acetylthiocholin jodid (ATChI) (Sigma-Aldrich)

Butyrylthiocholin jodid (BuTChI) (Sigma-Adrich)

Dimethylsulfoxid (DMSO) p. a. (Sigma-Adrich)

5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina (DTNB) ≥ 98% (Sigma-Adrich)

Galanthamin hydrobromid (Changsha Organic Haerb Inc., China)

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

4.2.2 Pufry

5mM Fosfátový pufr pH 7,4

5mM Fosfátový pufr pH 7,4 obsahující 150 mM chloridu sodného

100mM Fosfátový pufr pH 7,4

4.2.3 Biologický materiál

Zdrojem AChE byl hemolyzát erytrocytů a zdrojem BuChE byla lidská plazma po odstranění erytrocytů⁵⁹.

Enzymové preparáty byly podrobeny analýze na aktivitu použitím substrátů (ATChI pro AChE, BuTChI pro BuChE). Inhibiční aktivita látek může být měřena pouze na takových preparátech, které mají po proběhnuté Ellmannově reakci absorbanci $A = 0,08-0,15$ pro hemolyzát erytrocytů a $A = 0,15-0,20$ pro plazmu. Jestliže je aktivita preparátů vyšší, musí se zředit vhodným množstvím 5mM fosfátového pufru pH 7,4. Aktivita se zjišťuje stejným způsobem jako v případě měření izolovaných látek s tím rozdílem, že místo roztoku sledovaných látek se přidá pouze DMSO.

4.3 Obecné metody

4.3.1 Příprava a čištění rozpouštědel

Všechna použitá rozpouštědla byla před použitím přečištěna destilací⁶⁰. Z důvodu možného znečištění vodou bylo prvních 5 % zachyceno a odstraněno. Zbývá vydestilovaná frakce rozpouštědla (cca. 90 %) byla uchovávána v hnědých nádobách chráněných před světlem.

4.3.2 Odpařování rozpouštědel z extraktů a jejich uchování

Extrakty získané z frakcí kapalinové chromatografie či preparativní TLC byly odpařeny pomocí rotační vakuové odparky za sníženého tlaku na vodní lázni o teplotě 40 °C. Roztoky jednotlivých alkaloidů v ampulkách, získaných ze sumárního extraktu, byly odpařeny na vodní lázni o teplotě 60 °C proudem vzduchu. Úplné dosušení bylo provedeno ve vakuovém exsíkátoru, odkud byl odčerpán vzduch (10 mmHg),

nad silikagelem asi 24 hodin. Odparky byly uchovávány pod argonem a uloženy při -22°C než se použily k dalším zkouškám.

4.3.3 Detekce na chromatografických deskách

Na chromatografických deskách byla zjišťována přítomnost alkaloidů detekcí pomocí UV lampy při vlnové délce 254 a 366 nm a následně postříkem Dragendorffovým činidlem (oranžově zbarvené skvrny).

4.3.4 Sloupcová chromatografie

Chromatografický sloupec byl připraven obvyklým způsobem naléváním suspenze silikagelu v mobilní fázi.

4.3.5 Příprava preparativních litých TLC desek

Na skleněnou desku, určenou pro preparativní TLC, byla nalita suspenze silikagelu ve vodě, kde na 1 cm^2 bylo použito 0,03 g silikagelu v 0,1 ml vody. Takto vytvořené desky se nechaly schnout nejméně 24 hodin.

4.4 Izolace alkaloidů

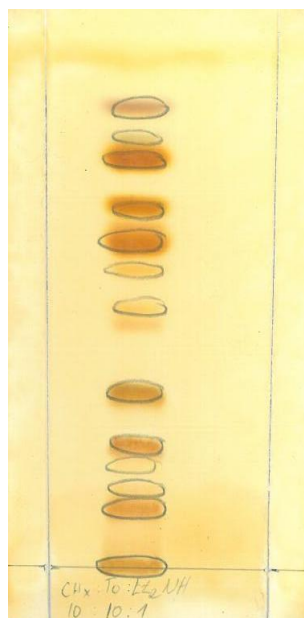
4.4.1 Příprava sumárního diethyletherového extraktu⁸

Tato část práce byla provedena mimo rámec mé diplomové práce.

Pro přípravu extraktu bylo použito 25,15 kg suché drobně řezané nati zemědělu lékařského. Extrakt byl získán pomocí perkolace za použití 95% EtOH v poměru 1:8,15. Poté byl zahuštěn na asi 7 litrů. Extrakt byl zahřát na 70°C , byly přidány 3 litry vody a 2 litry 2% kyseliny chlorovodíkové (pH~1,5). Poté byl zředěn ještě 5 litry vody, zchlazen na 30°C a zfiltrován přes vliselin. Filtr byl promyt ještě 3 litry 0,1% kyseliny chlorovodíkové a nakonec 2 litry vody. Získaný extrakt byl doplněn na objem 20 litrů. Filtrát byl zalkalizován 10% uhličitanem sodným na pH~9,5 (asi 3 litry). Vzniklá suspenze byla vytřepána po částech 5krát 5 litry Et₂O. Bylo získáno 99 g tmavě hnědě zbarveného extraktu viskózní konzistence. Z důvodu lepšího čištění byl extrakt rozdělen na dvě části, které se rozpustily v CHCl₃ (47,6 g a 48,2 g). Ke každé části se přidalo

400 ml 2% kyseliny chlorovodíkové (pH~1-2) a celkové množství bylo doplněno do 1 litru vodou. Následovala filtrace přes křemelinu. Filtráty poté byly zalkalizovány 10% uhličitanem sodným na pH 9-10 a 6krát vytřepány 200 ml CH₃Cl. Výtřepky byly podrobeny zkoušce Mayerovým činidlem, která prokázala nepřítomnost dalších alkaloidů ve vodné fázi. Obě části, byly přečištěny a poté opět spojeny. Celková hmotnost extraktu byla 87,5 g.

Pomocí TLC byl zjištěn obsah 10 alkaloidů v sumárním diethyleterovém extraktu. Nalezeny byly ještě 2 látky, které však nereagovaly charakteristickým oranžovým zbarvením po detekce Dragendorffovým činidlem. TLC bylo provedeno za následujících podmínek: Adsorbent Komerční desky se silikagelem fy Merck: TLC Silica gel 60 F₂₅₄ (Merck), komora nasycená, mobilní fáze: S₁, dráha 8,5 cm, počet vyvíjení 2krát, detekce UV 254, Dragendorffovo. činidlo.



Obr. 9 - Chromatogram – sumární diethyletherový výtřeppek *Fumariae officinalis*
Adsorbent Komerční desky se silikagelem Merck: TLC Silica gel 60 F₂₅₄ (Merck, CZ), komora nasycená, MF: S₁ 8,5 cm, počet vyvíjení 2x, detekce UV 254 a Dragendorffovo činidlo.

4.4.2 Rozdělení sumárního extraktu na frakce

Extrakt byl rozdělen pomocí sloupcové chromatografie na frakce, z kterých byly dále izolovány jednotlivé alkaloidy. Eluce byla provedena gradientovým způsobem.

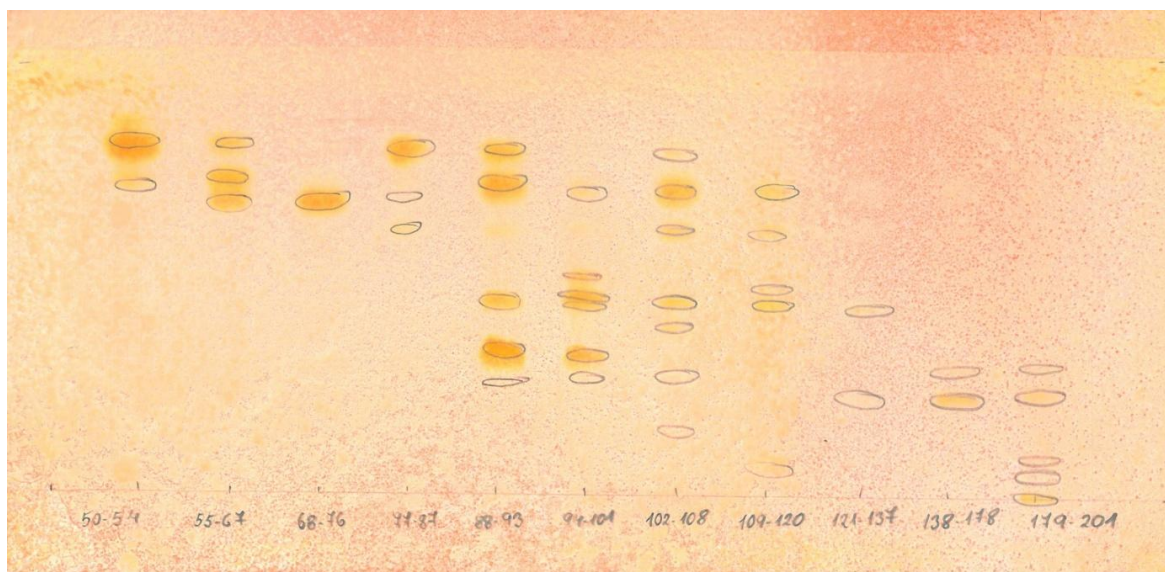
Tab. 8 - Podmínky sloupcové chromatografie diethyletherového extraktu *F. officinalis*

odparek	87,5 g
adsorbent na roztěr	350 g
adsorbent	Al ₂ O ₃ neutrální (fa ACROSS, velikost zrn 40-200 μm) deaktivovaný 6 % vody, množství adsorbentu 2625 g (poměr 30:1 k množství roztěru)
průměr kolony	9,5 cm
výška sloupce adsorbentu	34 cm
mrtvý objem	1760 mL
průtok	1500 mL/hod
mobilní fáze	směs lékařského benzínu a chloroformu v poměrech (9:1, 17:3, 4:1, 7:3, 3:2, 1:1, 2:3, 1:4)
	chloroform
	směs chloroformu a ethanol uv poměrech (3:1, 1:1)

Kvalitativní složení jednotlivých frakcí bylo sledováno pomocí kontrolní TLC. Jako mobilní fáze byly použity S₁, S₂ a S₃ podle polaritý jednotlivých frakcí. Eluáty, které obsahovaly stejné alkaloidy, byly spojeny a vzniklo tak celkově 11 frakcí.

Tab. 9 - Frakce získané ze sumárního diethyletherového extraktu

Spojené frakce	Mobilní fáze	Hmotnost frakcí (g)
50-54	Bz+CHCl ₃ (3:2)	0,30
55-67		13,89
68-76		6,30
77-87	Bz+CHCl ₃ (3:2, 1:1)	9,60
88-93	Bz+CHCl ₃ (1:1)	13,59
94-101		7,70
102-108		1,00
109-120		1,46
121-137	Bz+CHCl ₃ (1:1, 2:3)	2,00
138-178	Bz+CHCl ₃ (2:3, 1:4), CH Cl ₃	8,75
179-201	CHCl ₃ , CHCl ₃ +EtOH (3:1, 1:1)	10,90
celková hmotnost extraktu		75,49



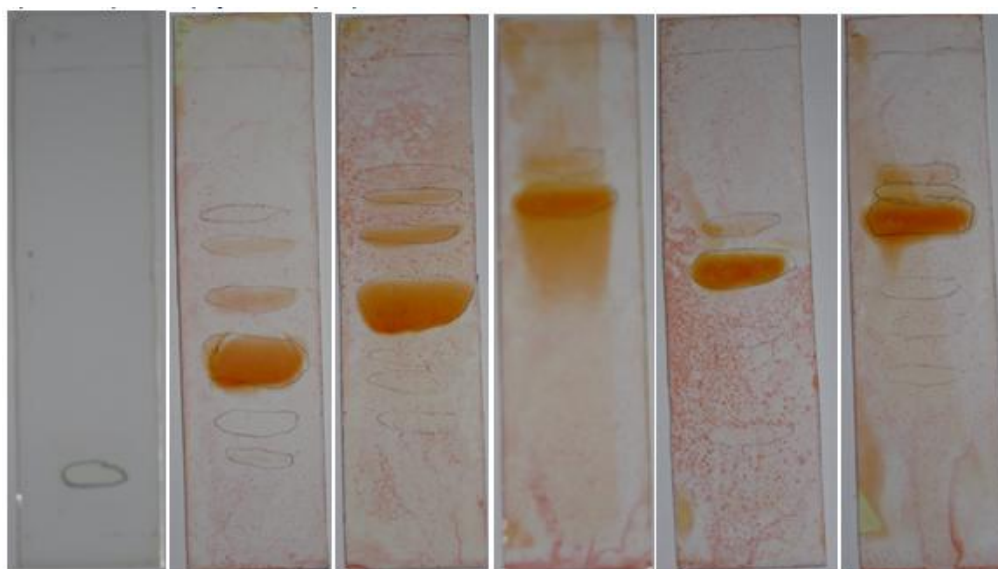
Obr. 10 - Chromatogram – 11 frakcí vzniklých ze sumárního extraktu

Adsorbent Komerční desky se silikagelem Merck: TLC Silica gel 60 F₂₅₄ (Merck, CZ), komora nasycená, MF: toluen a diethylamin 9:1, dráha 7,5 cm, počet vyvíjení 1x, detekce UV 254 a Dragendorffovo činidlo.

4.4.3 Izolace alkaloidů z frakce 68 - 76 pomocí preparativní TLC

V mé práci jsem pokračovala ve zpracování frakce 68-76.

4.4.3.1 Výběr vhodné mobilní fáze



Obr. 11 - Chromatogramy použitých jednotlivých mobilních fází: z leva A₁, A₂, A₃, A₄, A₅, A₆

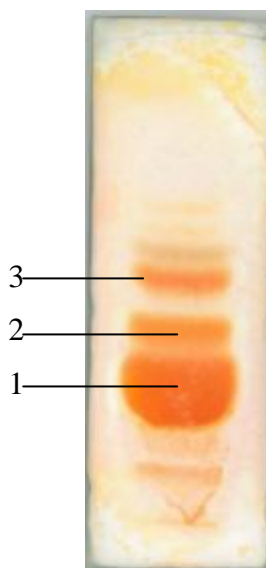
Tab. 10 - Podmínky pro analytické TLC

odparek	10 mg z frakce 68-76	
směs CHCl_3 a EtOH (1:1)	0,5 ml	
adsorbent chromatografické desky	Komerční desky se silikagelem Merck: TLC Silica gel 60 F ₂₅₄ (Merck, CZ), o velikosti 10x2,5 cm, nanášení v čáře	
délka dáhy	7,5 cm	
mobilní fáze	C_6H_{12} + Et_2NH v poměru	M ₁ : 95:5
		M ₂ : 90:10
		M ₃ : 85:15
	$\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_3$ + Et_2NH v poměru	M ₄ : 92:8
		M ₅ : 95:5
		M ₆ : 90:10
A ₁	M ₁ , vyvíjeno 2×	
A	M ₂ , vyvíjeno 2×	
A	M ₃ , vyvíjeno 2×	
A	M ₄ , vyvíjeno 2×	
A	M ₅ , vyvíjeno 2×	
A	M ₆ , vyvíjeno 2×	
detekce	UV lampa o vlnové délce 254 a 366 nm, Dragendorffovo činidlo	

4.4.3.2 Preparativní TLC

Na základě TLC výše byla k preparativní TLC pro rozdělení frakcí vybrána mobilní fáze M₂. Skvrny by měly mít retenční faktor (R_f) ideálně mezi 0,2-0,8.

Adsorbent z jednotlivých zón byl separátně shromážděn, eluován potřebným množstvím směsi CHCl₃ + EtOH (1:1) a odpařen na vakuové odparce. Získané frakce byly dále zpracovány.



Obr. 12 - Chromatogram na skleněné lité TLC destičce

Adsorbent Kieselgel 60 GF₂₅₄ (Merck, CZ), komora nasycená, MF: Et₂NH + EtOH (9:1), dráha 7,5 cm, počet vyvíjení 2x, detekce UV 254 a Dragendorffovo činidlo.

Tab. 11- Podmínky preparativní TLC spojených frakcí 68-76 diethyletherového extraktu

frakce	6,76 g; rozpuštěno v 84,5 ml směsi CHCl ₃ + EtOH (1:1)
adsorbent	Kieselgel 60 GF ₂₅₄ (Merck, CZ)
chromatografické desky	15×12 cm, nanáška v pruhu, délka dráhy 10,5 cm
počet desek	122
chromatografická soustava	C ₆ H ₁₂ + Et ₂ NH (9:1)
vyvíjení	2,5×
detekce	UV 254 nm
1-R _f 0,27	(DH-1)
2-R _f 0,40	(DH-2)
3-R _f 0,60	(DH-3)

Čistota látek byla stanovena kontrolní TLC za následujících podmínek: Kieselgel 60 GF₂₅₄ (Merck, CZ), komora nasycená, MF: C₆H₁₂ + Et₂NH (9:1) dráha 8,5 cm, počet vyvíjení 2x, detekce UV 254, Dragendorffovo. činidlo.

Po vyvinutí a vysušení chromatografických desek byl adsorbent s jednotlivými zónami separován, smíchán s křemelinou Celite 535 (3:1) a eluována směsí CHCl₃ + EtOH (1:1). Eluáty (kromě látky DH-2) byly odpařeny, krystalizovány ze směsi CHCl₃ + EtOH, krystaly odfiltrovány, promyty malým množstvím EtOH + CHCl₃ (9:1) a vysušeny ve vakuovém exsikátoru.

Tab. 12 - Čisté látky získané ze zón

látka	eluce	hmotnost	popis	hmotnost čisté látky
DH-1	250 ml	2,984 g	šedé, drobné krystaly	2,010
DH-2	100 ml	0,653 g	nahnědlá pěna	0,145
DH-3	100 ml	0,083 g	nažloutlá, práškovitá látka	0,012

Látku DH-2 se nepodařilo krystalizovat, odparek byl proto rozpuštěn v 6,5 ml směsi CHCl₃ + C₆H₅CH₃ (9:1) vlit na sloupeček vyčištěného silikagelu L 0,04-0,08 mm, po vsáknutí byla provedena eluce 15 ml směsi CHCl₃ + C₆H₅CH₃ (9:1). Po odpaření eluátu a vysušení odparku ve vakuovém exsikátoru byl použit pro další analýzu.

4.5 Stanovení cholinesterasové inhibiční aktivity (IC₅₀)

IC₅₀ byla stanovena pomocí Ellmanovy spektrofotometrické metody za použití 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoové kyseliny (DTNB)⁶¹. Estery thiocholinu slouží jako substráty, které jsou štěpeny cholinesterasami na thiocholin a příslušnou kyselinu.

Při měření aktivity u látek bylo napipetováno 8,3 plazmy nebo lyzátu erytrocytů do jamek v mikrotitračních destičkách. Poté bylo přidáno 283 μl DTNB a 8,3 μl roztoku látek v DMSO o klesající koncentraci (40,0; 10,0; 4,0; 1,0; 0,4 mM případně i nižší). Jako slepý roztok byl použit DMSO (8,3 μl). Vše bylo promícháno 1 minutu na třepačce a destička byla inkubována v přístroji reader Bio Tek 2 po dobu 5 minut při 37 °C. Poté bylo přidáno do každé jamky 33,3 μl roztoku substrátu (5mM ATChI nebo 5mM BuTChI) a po 2 minutách se měřil žlutý barevný produkt, vzniklý navázáním

SH- skupiny z thiocholinu na DTBN, při příslušné vlnové délce (pro hemolyzát a ATChI při 436 nm, pro plazmu a BuTChI při 412 nm). Každá koncentrace zaujímala 3 jamky, každá látka byla měřena v 6 opakováních. Inhibice se přepočítala na procenta pomocí vzorce:

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

kde: ΔA_{BL} – nárůst absorbance slepého vzorku za 1 min

ΔA_{SA} – nárůst absorbance měřeného vzorku

Pomocí programu GrapfPad byla stanovena hodnota IC_{50} , která byla porovnána s referenčními látkami (galanhtamin a huperzin A). Směrodatné odchylky byly vypočítány pomocí Microsoft Excel.

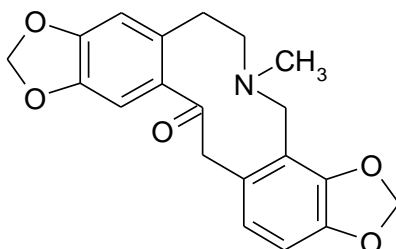
5 Výsledky

5.1 Identifikace izolovaných látek

Pomocí výsledků získaných z hmotnostní spektrometrie (MS) a nukleární magnetické rezonance (NMR) a po srovnání s literaturou byly izolované látky identifikované jako protopin, N-methylkorydaldin a (+)-fumarilin.

5.1.1 Stanovení struktury DH-1

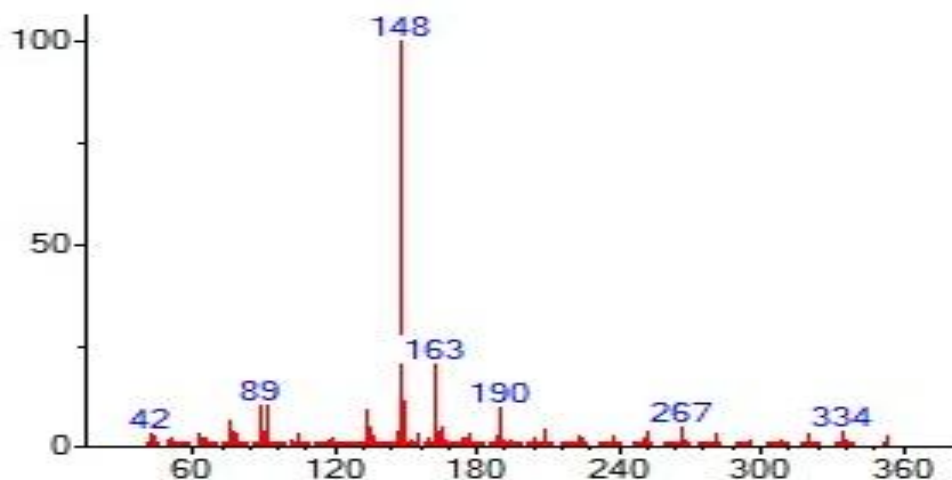
Bílá, drobně krystalická látka, bez zápachu, teplota tání 206-208 °C. Izolovaná látka byla určena jako protopin.



Obr. 13 - Strukturální vzorec protopinu

5.1.1.1 MS studie

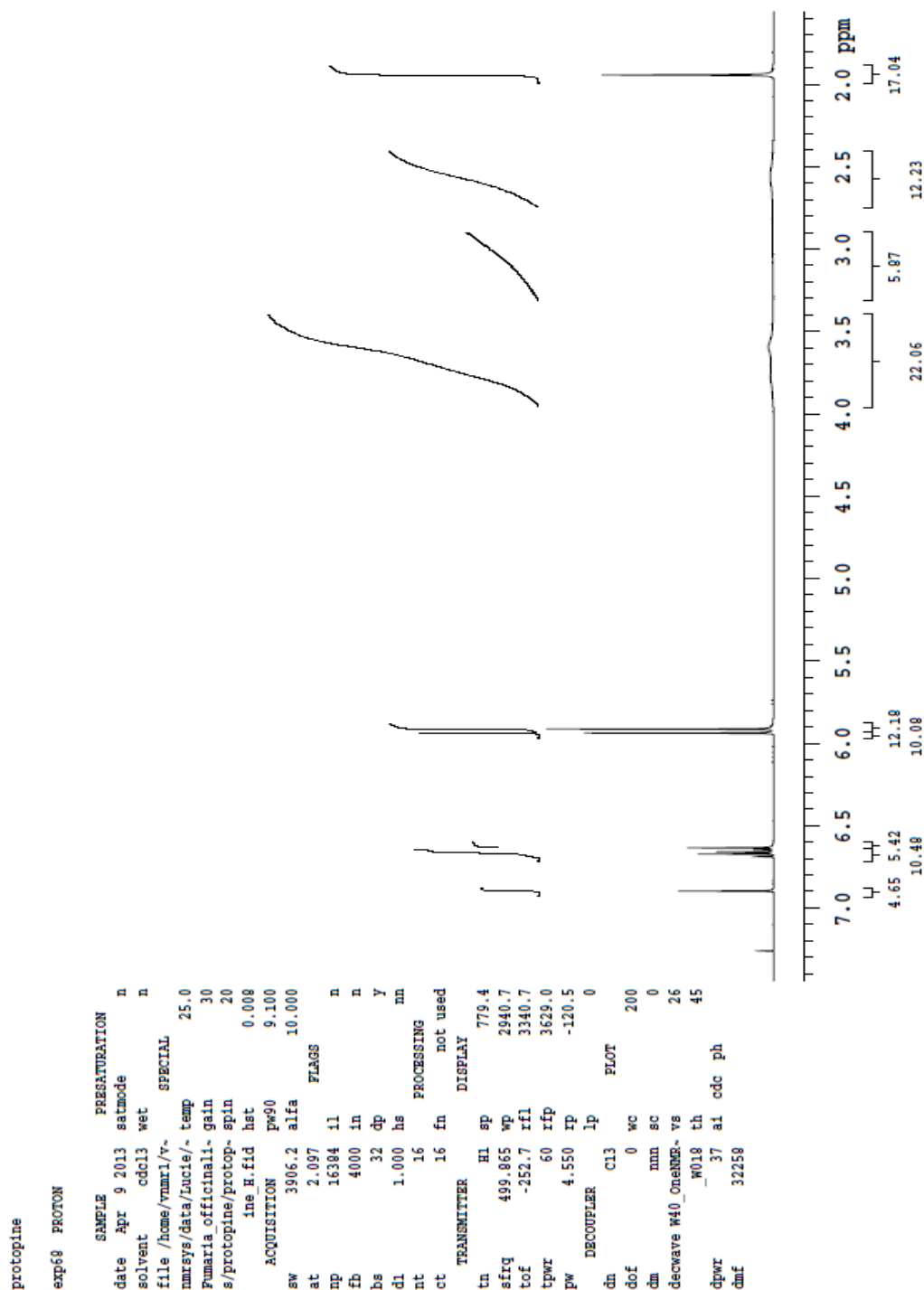
I-MS (m/z) 353(4), 334(5), 320(4), 267(6), 209(5), 190(10), 163(22), 148(100), 134(9).



Obr. 14 - MS spektrum protopinu

5.1.1.2 ¹H NMR studie

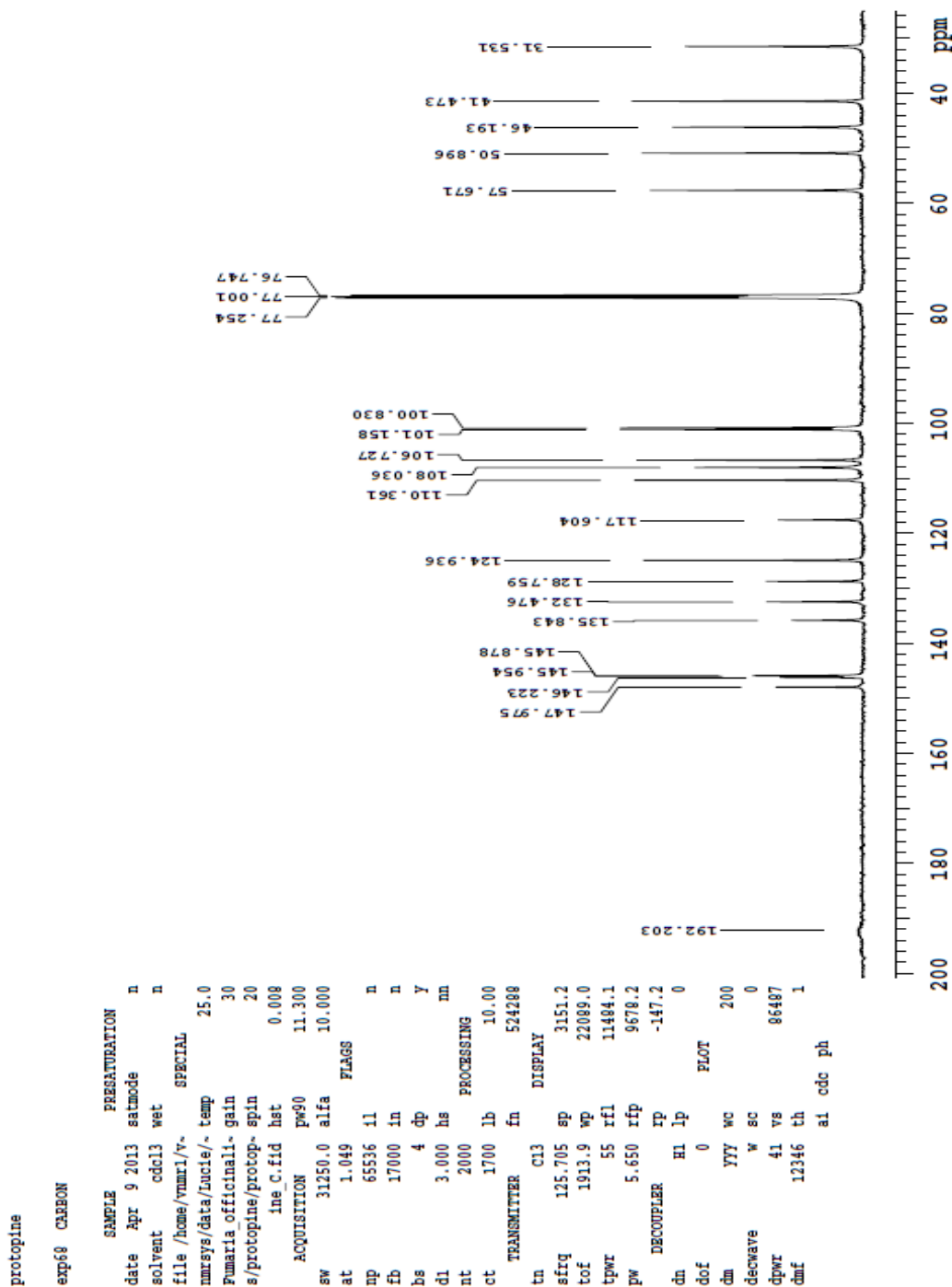
¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): 6.90 (1H, s, H1), 6.68 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H11), 6.65 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H12), 6.63 (1H, s, H4), 5.94 (2H, s, H15), 5.91 (2H, s, H16), 3.96-3.69 (2H, m, H13), 3.69-3.45 (2H, m, H8), 3.23-2.84 (1H, m, H5), 2.76-2.40 (3H, m, H5, H6, H6), 1.95 (3H, s, N - CH₃).



Obz. 15 - ¹H NMR spektrum protopinu

5.1.1.3 ¹³C NMR studie

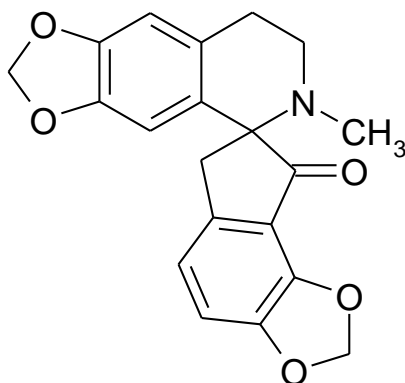
¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): 192.4 (C14), 148.0 (C3), 146.2 (C9), 146.0 (C10), 145.9 (C2), 135.8 (C14a), 132.5 (C4a), 128.8 (C12a), 124.9 (C12), 117.6 (C8a), 110.4 (C4), 108.0 (C1), 106.7 (C11), 101.2 (C15), 100.8 (C16), 57.7 (C6), 50.9 (C8), 46.2 (C13), 41.5 (N - CH₃), 31.5 (C5).



Obz. 16 - ¹³C NMR spektrum protopinu

5.1.2 Stanovení struktury DH-2

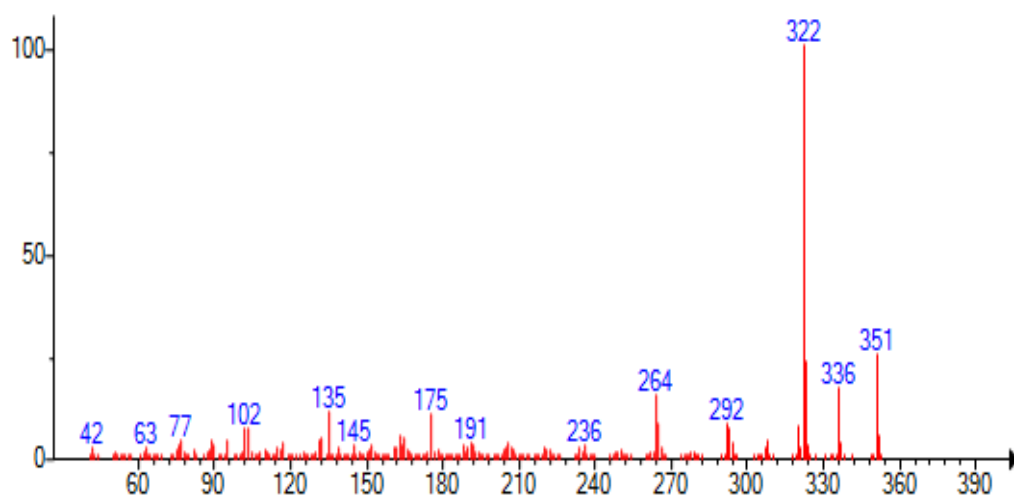
Světle žlutá látka, charakteru pěny, optická otáčivost byla změřena $[\alpha]_D^{25} = +77$ st., C 0,09 (měřeno v CHCl_3). Izolovaná látka byla určena jako (+)-fumarilinu.



Obr. 17 - Strukturální vzorec (+)-fumarilinu

5.1.2.1 MS studie

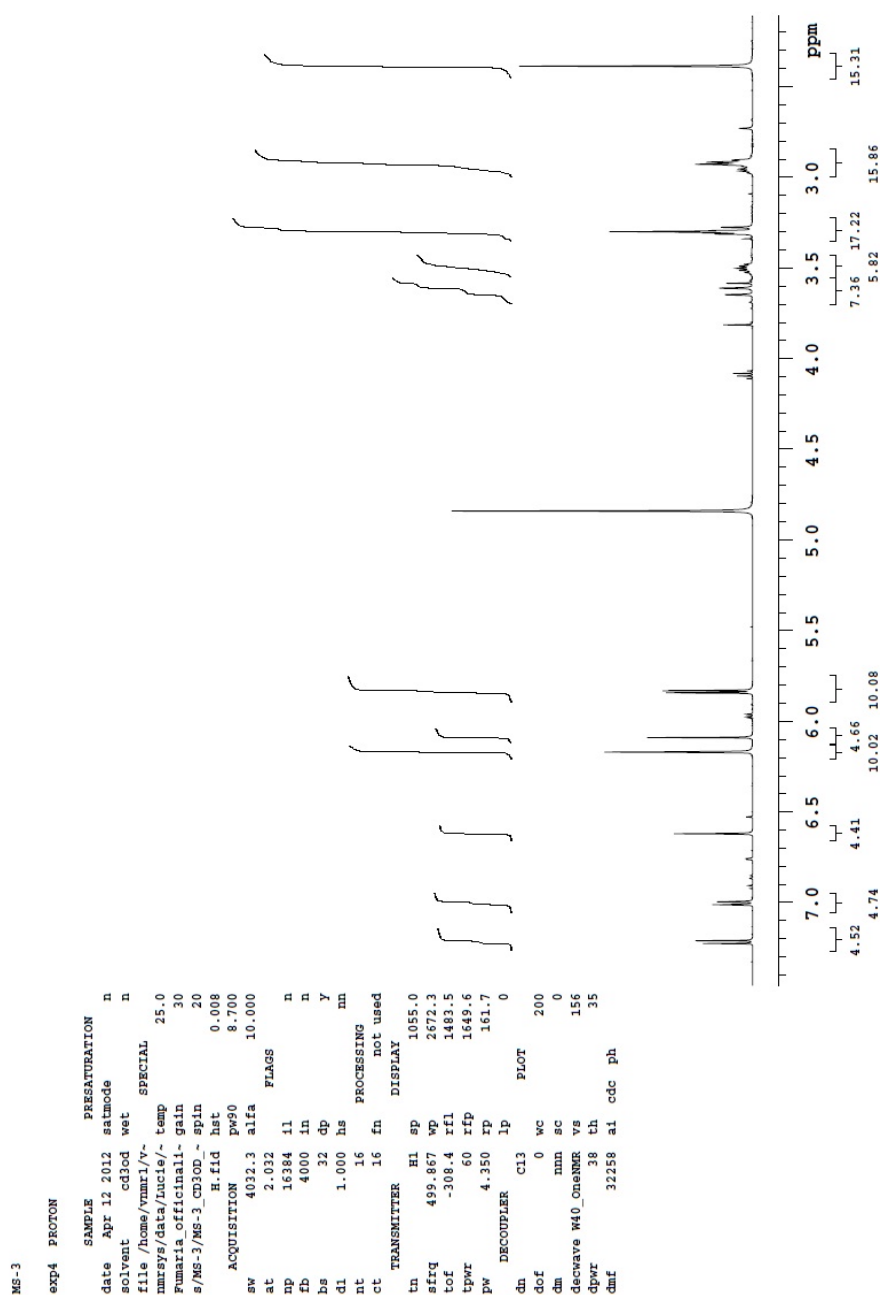
EI-MS (m/z) 351(38), 336(14), 322(100), 320(10), 264(156), 175(13), 135(18).



Obr. 18 - MS spektrum (+)-fumarilinu

5.1.2.2 ¹H NMR studie

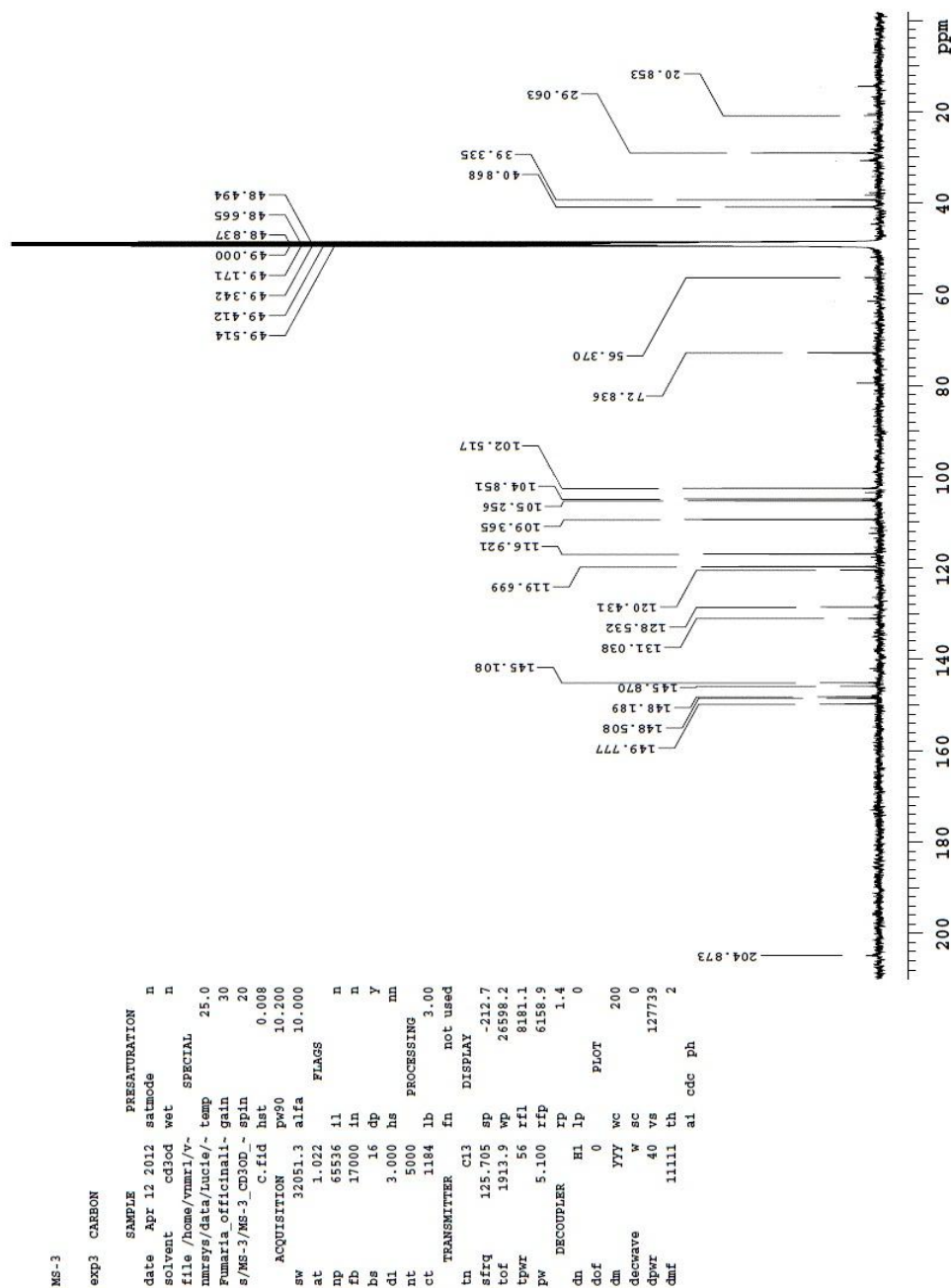
¹H NMR: (500 MHz, CD₃OD) δ 7.22 (1H, d, *J*=8.0 Hz, H10), 7.00 (1H, d, *J*=8.0 Hz, H9), 6.62 (1H, s, H4), 6.17 (2H, s, 11,12-OCH₂O-), 6.09 (1H, s, H1), 5.84 (2H, dd, *J*=6.5, 1.0 Hz, 2,3-OCH₂O-), 3.63 (1H, d, *J*=18.5 Hz, H8), 3.54-3.47 (1H, m, H6), 3.29 (1H, d, *J*=18.5 Hz, H8), 2.98-2.94 (1H, m, H6), 2.94-2.90 (2H, m, H5), 2.39 (3H, s, NCH₃).



Obz. 19 - ¹H NMR spektrum (+)-fumarilinu

5.1.2.3 ¹³C NMR studie

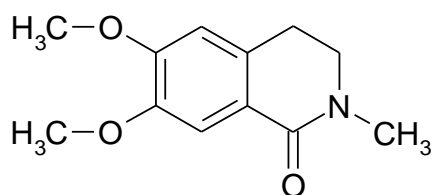
¹³C NMR: (125 MHz, CD₃OD) δ 204.9 (C13), 149.8 (C11), 148.5 (C3), 148.2 (C2), 145.9 (C12), 145.1 (C8a), 131.0 (C14a), 128.5 (C4a), 120.4 (C12a), 119.7 (C9), 116.9 (C10), 109.4 (C4), 105.3 (C1), 104.9 (11,12-OCH₂O-), 102.5 (2,3-OCH₂O-), 72.8 (C14), 49.4 (C6), 40.9 (C8), 39.3 (NCH₃), 29.1 (C5).



Obz. 20 - ¹³C NMR spektrum (+)-fumarilinu

5.1.3 Stanovení struktury DH-3

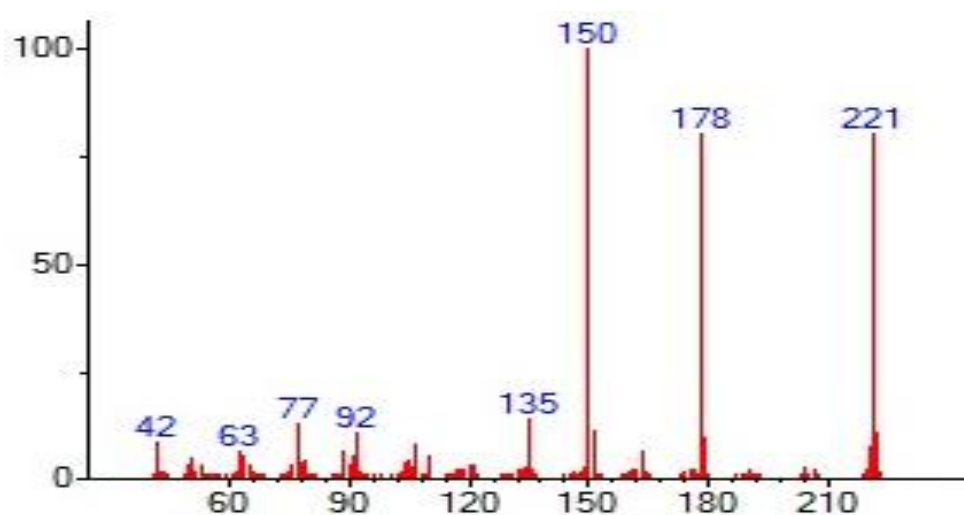
Našedlá, práškovitá látka, teplota tání 122-123°C. Izolovaná látka byla určena jako *N*-methylkorydalin.



Obr. 21 - Strukturální vzorec *N*-methylkorydalinu

5.1.3.1 MS studie

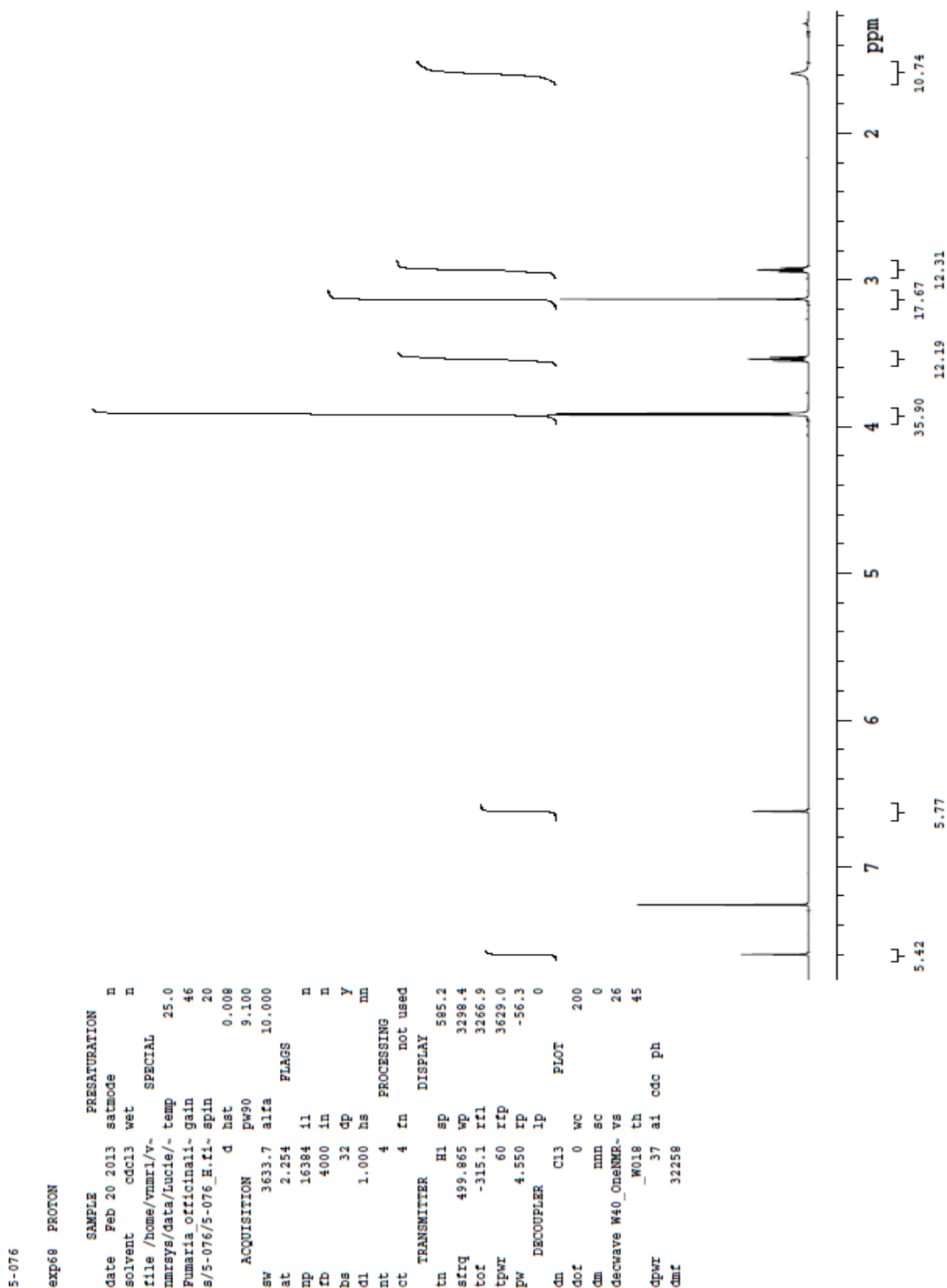
EI-MS (m/z) 221(81), 178(81), 150(100), 135(14), 92(11), 77(13), 63(8), 42(10)



Obr. 22 - MS spektrum *N*-methylkorydalinu

5.1.3.2 ¹H NMR studie

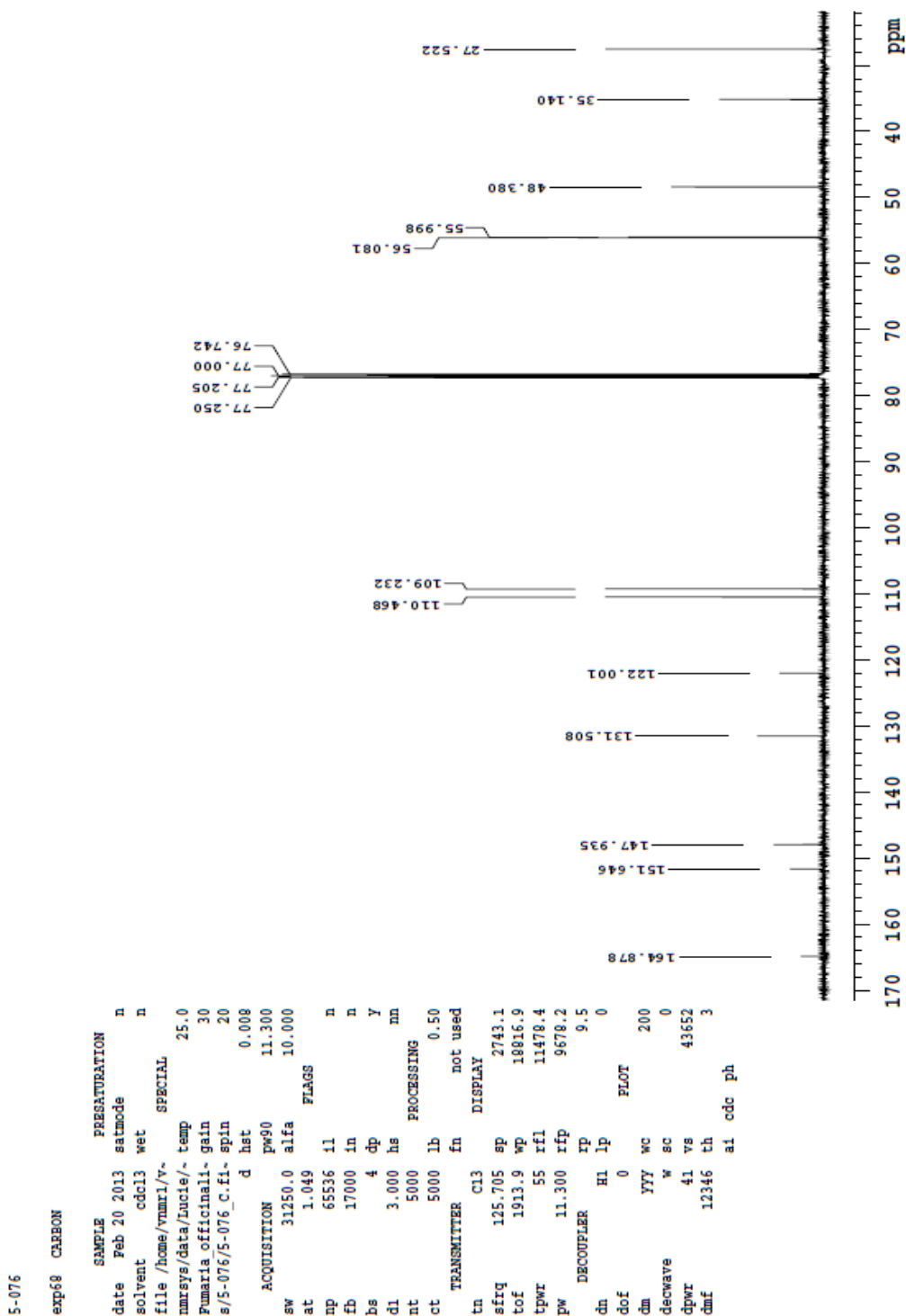
¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): 7.60 (1H, s, H8), 6.62 (1H, s, H5), 3.92 (3H, s, C7 - OCH₃), 3.91 (3H, s, C6 - OCH₃), 3.54 (2H, t, *J* = 6.4 Hz, H3), 3.13 (3H, s, N2 - CH₃), 2.93 (2H, t, *J* = 6.4 Hz, H4).



Obz. 23 - ¹H NMR spektrum *N*-methylkorydaldinu

5.1.3.3 ¹³C NMR studie

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): 164.9 (C1), 151.6 (C6), 147.9 (C7), 131.5 (C4a), 122.0 (C8a), 110.5 (C8), 109.2 (C5), 56.1 (C7 - OCH₃), 56.0 (C6 - OCH₃), 48.4 (C3), 35.1 (N2 - CH₃), 27.5 (C4).



Obr. 24 - ¹³C NMR spektrum *N*-methylkorydaldinu

5.2 Stanovení inhibice AChE a BuChE

Tab. 13 - In vitro IC₅₀ izolovaných alkaloidů a standardů na lidské cholinesterasy

označení	látka	IC ₅₀ (μM)	
		AChE	BuChE
DH-1	protopin	345,42 ± 31,12	239,66 ± 20,89
DH-2	(+)-fumarilin	2939,2 ± 309,41	330,62 ± 34,12
DH-3	<i>N</i> -methylykorydaldin	680,06 ± 130,49	1382,3 ± 332,26
Standardy pro ChE	galanthamin	1,710 ± 0,065	42,30 ± 1,30
	huperzin A	0,033 ± 0,001	>1000

6 Diskuze

V rámci mé diplomové práce, byla zpracována frakce 68-76 sumárního alkaloidního extraktu *Fumaria officinalis* L., v kterém byly detekovány terciární isochinolinové alkaloidy. Z uvedené frakce jsem izolovala tři látky (DH-1, DH-2 a DH-3), které dále byly identifikovány a testovány na inhibiční aktivitu vůči lidským cholinesterasám. Na základě fyzikálně-chemických vlastností a pomocí spektrálních metod MS a NMR, byly látky určeny jako DH-1: protopin, DH-2: (+)-fumarilin a DH-3: *N*-methylkorydaldin.

Protopin se nachází v rostlinách čeledi Papaveraceae (rody: *Argemone*, *Bocconia*, *Chelidonium*, *Eschscholtzia*, *Glaucium*, *Hunnemannia*, *Hylomecon*, *Macleaya*, *Meconella*, *Meconopsis*, *Papaver*, *Roemeria*, *Romneya*, *Sanguinaria*, *Stylomecon*), Fumariaceae (rody: *Corydalis*, *Dactylicapnos*, *Dicentra*, *Fumaria*), Berberidaceae (rod: *Berberis*) a Sapindaceae (rod: *Pteridophyllum*). Protopin byl již v minulosti izolován, jak z *Fumaria officinalis*⁶², tak i jiných rostlin jako například *Chelidonium majus*⁶⁴ a *Corydalis crista*⁶⁵, a podroben zkouškám na biologickou aktivitu. Byla prokázána účinnost jako mikrotubuly stabilizující antimitotické agens⁶³. Alkaloidní extrakt z *Chelidonium majus*, jehož součástí byl i protopin, má schopnost překonat mnohočetnou rezistenci různých nádorových buněčných linií⁶⁴ (je jisté, že v případě alkaloidní směsi z vlaštovičnicku se na účinku podílejí i další alkaloidy). U protopinu byl zjištěn i protizánětlivý účinek⁶⁵. Jsou popsány také antivirové, antibakteriální, antifungální, antiparazitární, hepatoprotektivní, neuroprotektivní a antioxidační, antiarytmické, antihypertenzní, negativní inotropní a vazodilatační a látka má slabou protinádorovou aktivitu⁶⁶. Dále vykazuje *in vitro* inhibici aminopyrine *N*-demethylasy, zapojené v metabolismu cizorodých látek⁶⁷. Protopin byl již v minulosti testován na inhibiční aktivitu vůči AChE a BuChE. Výsledky jsou, však nejednotné: jedny studie dokazují dobrou inhibiční aktivitu^{68,69,70}, ale v jiných tato výrazná aktivita prokázána nebyla⁷¹. S největší pravděpodobností záleží na modelu esteras, který byl použit.

(+)-Fumarilin je alkaloid, který se nachází v rostlinách čeledi Fumariaceae (*Fumaria officinalis*, *Fumaria parviflora*, *Fumaria schrammii*, *Fumaria vaillantii*, semena *Fumaria indica*, listy *Fumaria muralis* var. *boraei*, a květy a nezralé plody *Fumaria rostellata* aj.)⁷². U (+)-Fumarilinu byly prokázány sedativní a antikonvulzivní

účinky⁷³. Látka byla již dříve testována na inhibiční aktivitu vůči AChE a BuChE, ale významná inhibiční aktivita nebyla zjištěna⁷⁴.

N-methylkorydaldin je alkaloid, který se nachází v čeledích Hernandiaceae, Papaveraceae, Ranunculaceae a Annonaceae (např. *Hernandia ovigera*, *Papaver bracteatum*, *Papaver urbanianum*, *Hypecoum erectum*, *Thalictrum fendleri*, *Mitrephora maingayi*, *Annona squamosa*)^{75,76,77,78}. Z *Fumaria. officinalis* byl tento alkaloid izolován poprvé v mé diplomové práci. Tento alkaloid vykazuje antibakteriální účinky⁷⁷ a antisekreční účinky na žaludek (snížení sekrece kyseliny chlorovodíkové a pepsinu) využitelné jako gastroprotektivum⁷⁸. *N*-methylkorydaldin zatím nebyl v žádné předchozí práci zkoušen na inhibiční aktivitu vůči AChE a BuChE.

Z výsledků inhibiční aktivity vůči AChE a BuChE v mé diplomové práci nebylo prokázáno výrazné ovlivnění AChE a BuChE ve smyslu inhibice. Izolované alkaloidy nejsou atraktivní pro použití jako potenciální látky pro syntézu parciálních derivátů, které by se mohly uplatnit ve studiu sloučenin případně využitelných při ovlivňování průběhu AD.

7 Literatura

-
- ¹ <http://www.euro.who.int/en/health-topics/Health-systems/public-health-services/data-and-statistics> staženo 8. ledna 2014
- ² <http://www.pharmanews.cz/vydani/clanek3.html> staženo 8. ledna 2014
- ³ <http://www.lf2.cuni.cz/info2lf/ustavy/fu/nov.pdf> staženo 9. ledna 2014
- ⁴ Fathiazad F., Hamedeyazdan S., Khosropanah M. K., Khaki A.: Hypoglycemic Activity of *Fumaria parviflora* in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Adv. Pharm. Bull.* 3, 207–210 (2013).
- ⁵ Singh G. K., Chauhan S. K., Rai G., Chatterjee S. S., Kumar V.: Potential antianxiety activity of *Fumaria indica*: A preclinical study. *Pharmacogn. Mag.* 9, 14-22 (2013).
- ⁶ Orhana I., Ozçelik B., Karaoğlu T., Sener B.: Antiviral and antimicrobial profiles of selected isoquinoline alkaloids from *Fumaria* and *Corydalis* species. *Z. Naturforsch. C.* 62, 19-26 (2007).
- ⁷ Berkov S., Bastida J., Nikolova M., Viladomat F., Codina C.: Rapid TLC/GC-MS identification of acetylcholinesterase inhibitors in alkaloid extracts. *Phytochem. Anal.* 19, 411-9 (2008).
- ⁸ Kassemová D.: *Diplomová práce*. Univerzita Karlova, Hradec Králové 2013.
- ⁹ <http://www.henriettesherbal.com/eclectic/madaus/fumaria.html> staženo 11. ledna 2014
- ¹⁰ Jahodář L.: *Farmakobotanika: semenné rostliny*. Karolinum, Praha 2006.
- ¹¹ Salmine K. A., Meyer A., Jerabkova L., Korhonen L. E., Rahnasto M., Juvonena R. O., Imming P., Raunio H.: Inhibition of human drug metabolizing cytochrome P450 enzymes by plant isoquinoline alkaloids. *Phytomedicine* 18, 533-538 (2011).
- ¹² <http://botany.cz/cs/fumaria-capreolata/> staženo 11. ledna 2014
- ¹³ <http://botany.cz/cs/fumaria-vaillantii/> staženo 11. ledna 2014

-
- ¹⁴ <http://botany.cz/cs/fumaria-schleicheri/> staženo 11. ledna 2014
- ¹⁵ <http://botany.cz/cs/fumaria-rostellata/> staženo 11. ledna 2014
- ¹⁶ <http://botany.cz/cs/fumaria-officinalis/> staženo 11. ledna 2014
- ¹⁷ <http://www.kvetenacr.cz/detail.asp?IDdetail=227> staženo 12. ledna 2014
- ¹⁸ <http://apps.faf.cuni.cz/daidalea/PlantSpecies.asp?id=10119> staženo 11. ledna 2014
- ¹⁹ Mayer J. G., Uehleke B., Saum K.: *Bylinky z klášterní lékárny*. Euromedia Group, Knižní klub v Praze 2004.
- ²⁰ Dugas D.: *500 nejlepších receptů lidové medicíny: Bylinkový receptář od nejstarších časů po současnost*. Knižní expres, s.r.o., Ostrava 2007.
- ²¹ Komise pro lékopis vědecké rady ministerstva zdravotnictví České republiky se spolupracovníky: *Český farmaceutický kodex: Fumariae herba*. X-EGEM, Praha 1994.
- ²² Wichtl M., (ed.): *Fumariae Herba* in: *Herbal Drugs and Phytopharmaceuticals*. MedPharm. Sci. Publ., Stuttgart 2004, s. 229.
- ²³ Soušek J., Valešová M.: Obsahové látky rostlin rodu *fumaria*. *Chem. listy* 89, 489 (1995).
- ²⁴ Soušek J., Guédon D., Adam T., Bochořáková H., Táborská E., Válka I., Šimánek V.: Alkaloids and Organic Acids Content of Eight *Fumaria* Species. *Phytochem. Anal.* 10, 6-11 (1999).
- ²⁵ Hilal S. H., Aboutabl E. A., Youssef S. A. H., Shalaby M. A., Sokkar N. M.: Alkaloidal content and certain pharmacological activities of *Fumaria parviflora* Lam. growing in Egypt. *Plantes Med. Phytoter.* 23, 109–123 (1989).
- ²⁶ Rathi A., Srivastava A. K., Shirwaikar A., Singh Rawat A. K., Mehrotra S.: Hepatoprotective potential of *Fumaria indica* Pugsley whole plant extracts, fractions and an isolated alkaloid protopine. *Phytomedicine* 15, 470–477 (2008).

-
- ²⁷ Jeng J. H., Wu H. L., Lin B. R., Lan W. H., Chang H. H., Ho Y. S., Lee P. H., Wang Y. J., Wang J. S., Chen Y. J., Chang M. C.: Antiplatelet effect of sanguinarine is correlated to calcium mobilization, thromboxane and cAMP production. *Atherosclerosis* *191*, 250-258 (2007).
- ²⁸ Maiza-Benabdesselam F., Khentache S., Bougoffa K., Chibane M., Adach S., Chapeleur Y., Max H., Laurain-Mattar D.: Antioxidant activities of alkaloid extracts of two Algerian species of *Fumaria* : *Fumaria capreolata* and *Fumaria bastardii*. *Rec. Nat. Prod.* *1*, 28-35 (2007).
- ²⁹ Orhan I., Sener B., Choudhary M. I., Khalid A.: Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory activity of some Turkish medicinal plants. *J. Ethnopharmacol.* *91*, 57–60 (2004).
- ³⁰ Shen H., Yamashita A., Nakakoshi M., Yokoe H., Sudo M., Kasai H., Tanaka T., Fujimoto Y., Ikeda M., Kato N., Sakamoto N., Shindo H., Maekawa S., Enomoto N., Tsubuki M., Moriishi K.: Inhibitory effects of caffeic Acid phenethyl ester derivatives on replication of hepatitis C virus. *PLoS ONE* *8*, (2013).
- ³¹ Ortiz de Urbina J. J., Martin M. L., Sevilla M. A., Montero M. J., Carron I. R., San Roman L.: Antispasmodic activity on rat smooth muscle of polyphenol compounds caffeic and protocatechic acids. *Phytother. Res.* *4*, 71–76 (1990).
- ³² Schilling S., Goelz S., Linker R., Luehder F., Gold R.: Fumaric acid esters are effective in chronic experimental autoimmune encephalomyelitis and suppress macrophage infiltration. *Clin. Exp. Immunol.* *145*, 101–107 (2006).
- ³³ Kokelj F., Plozzer C., Avian A., Trevisan G.: Fumaric Acid and Its Derivatives in the Treatment of Psoriasis Vulgaris: Our Experience in Forty-One Patients. *Acta Dermatovenerol. Croat.* *17*, 170-175 (2009).
- ³⁴ Lee D. H., Gold R., Linker R. A.: Mechanisms of Oxidative Damage in Multiple Sclerosis and Neurodegenerative Diseases: Therapeutic Modulation via Fumaric Acid Esters. *Int. J. Mol. Sci.* *13*, 11783-11803 (2012).
- ³⁵ Seo C. S., Lim H. S., Jeong S. J., Ha H., Shin H. K.: HPLC-PDA analysis and anti-inflammatory effects of Mori Cortex Radicis. *Nat. Prod. Commun.* *8*, 1443-6 (2013).

-
- ³⁶ Navaneethan D., Rasool M.: *p*-Coumaric acid, a common dietary polyphenol, protects cadmium chloride-induced nephrotoxicity in rats. *Ren. Fail.* 36, 244-51 (2013).
- ³⁷ Barbosa-Pereira L., Bilbao A., Vilches P., Angulo I., LLuis J., Fité B., Paseiro-Losada P., Cruz J. M.: Brewery waste as a potential source of phenolic compounds: Optimisation of the extraction process and evaluation of antioxidant and antimicrobial activities. *Food Chem.* 145, 191–197 (2014).
- ³⁸ Deng J. S., Lee S. D., Kuo W. W., Fan M. J., Lin Y. M., Hu W. S., Huang Y. C., Velmurugan B. K., Tsai F. J., Tsai C. H., Huang C. Y.: Anti-apoptotic and pro-survival effect of protocatechuic acid on hypertensive hearts. *Chem.-Biol. Interact.* 209, 77–84 (2014).
- ³⁹ Stojković D. S., Zivković J., Soković M., Glamočlija J., Ferreira I. C., Janković T., Maksimović Z.: Antibacterial activity of *Veronica montana* L. extract and of protocatechuic acid incorporated in a food system. *Food Chem. Toxicol.* 55, 209–213 (2013).
- ⁴⁰ Harini R., Pugalendi K. V.: Antihyperglycemic effect of protocatechuic acid on streptozotocin-diabetic rats. *J. Basic Clin. Physiol. Pharmacol.* 21, 79-91 (2010).
- ⁴¹ An L. J., Guan S., Shi G. F., Bao Y. M., Duan Y. L., Jiang B.: Protocatechuic acid from *Alpinia oxyphylla* against MPP + -induced neurotoxicity in PC12 cells. *Food Chem. Toxicol.* 44, 436–443 (2006).
- ⁴² <http://www.alzheimer.cz/alzheimerova-choroba/> staženo 11. února 2014
- ⁴³ Koukolík F., Jiráček R.: *Alzheimerova nemoc a další demence*. Grada, Praha 1998.
- ⁴⁴ Koukolík F., Jiráček R.: *Diagnostika a léčení syndromu demence*. Grada, Praha 1999.
- ⁴⁵ Jiráček R., Koukolík F.: *Demence: Neurobiologie, klinická obraz, terapie*. Galén, Praha 2004.
- ⁴⁶ <http://socialnivevue.cz/item/cesko-v-roce-2050-ctvrt-milionu-nemocnych-alzheimerovou-chorobou> staženo 10. března 2014
- ⁴⁷ Hořejší J.: *Symposium 1: Alzheimerova choroba*. Galén, Praha 1999.

-
- ⁴⁸ <http://zdravi.e15.cz/clanek/postgradualni-medicina/alzheimerova-nemoc-a-jine-demence-271479> staženo 11. února 2014
- ⁴⁹ Tang M. X., Maestre G., Tsai W. Y., Liu X. H., Chung W. Y., Chun M., Schoefield P., Stern Y., Tycko B., Mayeux R.: Effect of Age, Ethnicity, and Head Injury on the Association between APOE Genotypes and Alzheimer's Disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 802, 6-15 (1996).
- ⁵⁰ Schofield P. W., Tang M., Marder K., Bell K., Dooneief G., Chun M., Sano M., Stern Y., Mayeux R.: Alzheimer's disease after remote head injury: an incidence study. *J. Neurol., Neurosurg. Psychiatry* 62, 119-124 (1997).
- ⁵¹ Cataldo J. K., Prochaska J. J., Glantz S. A.: Cigarette Smoking is a Risk Factor for Alzheimer's Disease: An Analysis Controlling for Tobacco Industry Affiliation. *J. Alzheimer's Dis.* 19, 465–480 (2010).
- ⁵² Armstrong R. A.: What causes Alzheimer's disease? *Folia Neuropathol.* 51, 169-188 (2013).
- ⁵³ Yuan Y., Niu F., Liu Y., Lu N.: Zinc and its effects on oxidative stress in Alzheimer's disease. *Neurol. Sciences* 2014, citováno podle Chem. Abstr. 2014445981, (2014).
- ⁵⁴ Jiráček R.: Diagnostika a terapie Alzheimerovy choroby. *Neurol. prax* 4, 224-227 (2008).
- ⁵⁵ Callone P. R., Kudlacek C., Vasiloff B. C., Manternach J., Brumback R. A.: *Alzheimerova choroba: 300 tipů a rad, jak ji zvládat lépe*. Grada, Praha 2008.
- ⁵⁶ <http://zdravi.e15.cz/clanek/priloha-lekarske-listy/alzheimerova-nemoc-nejcastejsi-neurodegenerativni-choroba-472918> staženo 11. března 2014
- ⁵⁷ Krejčová G., Ševelová L.: Současné poznatky o galantaminu, reverzibilním inhibitoru acetylcholinesterázy. *Vojen. Zdrav. Listy* 72, 37 (2003).
- ⁵⁸ Drtinová L., Pohanková M.: Možnosti využití huperzinu A v léčbě Alzheimerovy nemoci. *Chem. Listy* 107, 12-15 (2013).
- ⁵⁹ Opletal L.: osobní sdělení

-
- ⁶⁰ Keil B.: *Laboratorní technika organické chemie*. Nakladatelství Akademie věd Československé republiky, Praha 1963.
- ⁶¹ Ellman G. L., Courtney K. D., Andres V. J., Feather-Stone R. M.: A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7, 88 (1961).
- ⁶² Seger C., Sturm S., Strasser E. M., Ellmerer E., Stuppner H.: ¹H and ¹³C NMR signal assignment of benzyloisoquinoline alkaloids from *Fumaria officinalis* L. (Papaveraceae). *Magn. Reson. Chem.* 42, 882-6, (2004).
- ⁶³ Abro A., Kulsoom S., Riaz N.: Pharmacophore model generation for microtubule-stabilizing anti-mitotic agents (MSAAs) against ovarian cancer. *Med. Chem. Res.* 22, 4322-4330, (2013).
- ⁶⁴ El-Readi M. Z., Eid S. Y., Ashour M. L., Tahrani A., Wink M.: Modulation of multidrug resistance in cancer cells by chelidonine and *Chelidonium majus* alkaloids. *Phytomedicine* 20, 282-294, (2013).
- ⁶⁵ Wangchuk P., Keller P. A., Pyne S. G., Sastraruji T., Taweechotipatr M., Rattanajak R., Tonsomboon A., Kamchonwongpaisan S.: Phytochemical and biological activity studies of the bhutanese medicinal plant *Corydalis crispera*. *Nat. Prod. Commun.* 7, 575-580, (2012).
- ⁶⁶ Vacek J., Walterova D., Vrublova E., Simanek V.: The chemical and biological properties of protopine and allocryptopine. *Heterocycles* 81, 1773-1789, (2010).
- ⁶⁷ Zverinskii I. V., Mel'nichenko N. G., Telegin P. G., Poplavskii V. A.: Effect of celandine alkaloids on the activity of cytochrome P450-dependent monooxygenase of rat liver. *Vestsi Natsyyanal'nai Akademii Navuk Belarusi, Seryya Fizika-Tekhnichnykh Navuk* 2011, 76-80; cit. podle Chem. Abstr. 609434, (2011).
- ⁶⁸ Kim D. K., Lee K. T-I., Baek N., Kim S-H, Park H. W., Lim J. P., Shin T. Y., Eom D. O., Yang J. H., Eun J. S.: Acetylcholinesterase inhibitors from the aerial parts of *Corydalis speciosa*. *Arch. Pharmacol Res.* 27, 1127-1131, (2004).

-
- ⁶⁹ Xu L., Gu Z., Jiang X., Sheng R., Wang X., Xie M.: Studies on anticholinesterase active constituents of Rhizoma *Corydalis decumbens*. *Yaoxue Xuebao*, 37, 902-903, (2002); cit. podle Chem. Abstr. 538699, (2013).
- ⁷⁰ Novotná M.: *Diplomová práce*. Univerzita Karlova, Hradec Králové 2010.
- ⁷¹ Xiao H-T., Peng J., Liang Y., Yang J., Bai X., Hao X-Y., Yang F-M., Sun Q-Y.: Acetylcholinesterase inhibitors from *Corydalis yanhusuo*. *Nat. Prod. Res.* 25, 1418-1422, (2011).
- ⁷² Suau R., Cabezudo B., Rico R., Najera F., Lopez-Romero J. M.: Direct determination of alkaloid contents in *Fumaria* species by GC-MS. *Phytochem. Anal.* 13, 363-367, (2002).
- ⁷³ Kumar A., Pandey V. B., Seth K. K., Dasgupta B., Bhattacharya S. K.: Pharmacological Actions of Fumariline Isolated from *Fumaria indica* Seeds. *Planta Med.* 52, 324-325, (1986).
- ⁷⁴ Šafratová M.: *Diplomová práce*. Univerzita Karlova, Hradec Králové 2013.
- ⁷⁵ Cheng H. X., Zeng Y. C., Jia B. Y., Fang C. F., Cheng W. M.: Screening and identification of various components in *Thalictrum fortunei* using a combination of liquid chromatography/time-of-flight tandem mass spectrometry. *Pharmazie* 67, 106-110, (2012).
- ⁷⁶ Yu R., Ye Q., Chen B., Zhang G.: Chemical study on *Mitrephora maingayi*. *Tianran Chanwu Yanjiu Yu Kaifa* 15, 212-215, (2003); cit. podle Chem. Abstr. 208201 (2004).
- ⁷⁷ Su Y., Li S., Li N., Chen L., Zhang J., Wang J.: Seven alkaloids and their antibacterial activity from *Hypocoum erectum* L. *J. Med. Plants Res.* 5, 5428-5432, (2011).
- ⁷⁸ Yadav D. K., Singh N., Dev K., Sharma R., Sahai M., Palit G., Maurya R.: Anti-ulcer constituents of *Annona squamosa* twigs. *Fitoterapia* 82, 666-675, (2011).