

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

**Hodnocení alkaloidů pomocí *in vivo* testů s *Artemia salina* I.**

**Evaluation of alkaloids using *in vivo* tests with *Artemia salina* I.**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Jitka Vytlačilová, Ph.D.

Hradec Králové, 2014

Barbora Balíková

## **PROHLÁŠENÍ**

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

Barbora Balíková

Děkuji RNDr. Jitce Vytlačilové, Ph.D. za pomoc, cenné rady, připomínky a trpělivost při vypracovávání mé diplomové práce. Za trpělivost a podporu děkuji také celé mé rodině.

# **OBSAH**

<b>1. Úvod</b> .....	7
1.1 Cíl práce .....	9
<b>2. Teoretická část</b> .....	10
2.1 <i>Artemia salina</i> .....	10
2.1.1 Taxonomické zařazení .....	10
2.1.2 Anatomie a morfologie .....	10
2.1.2.1 Stavba těla .....	10
2.1.2.2 Orgánové soustavy .....	12
2.1.3 Vývoj .....	14
2.1.4 Odolnost žábřonožky .....	15
2.1.4.1 Diapauzální cysta .....	15
2.1.4.2 Hydratovaná a aktivovaná cysta .....	16
2.1.4.3 Odolnost vůči teple .....	17
2.1.5 Osmoregulace .....	18
2.1.6 Využití .....	18
2.1.6.1 Solární produkce soli .....	18
2.1.6.2 <i>Artemia salina</i> jako krmivo .....	19
2.1.6.3 Využití ve vědě .....	20
2.2 Alkaloidy .....	22
2.2.1 Charakteristika .....	22
2.2.2 Rozdělení alkaloidů .....	23

2.2.2.1 Tropanové alkaloidy .....	23
2.2.2.2 Pyrrolizidinové alkaloidy .....	23
2.2.2.3 Chinolizidinové alkaloidy .....	24
2.2.2.4 Steroidní alkaloidy .....	24
2.2.2.5 Purinové alkaloidy .....	25
2.2.2.6 Pyridinové alkaloidy .....	25
2.2.2.7 Indolové alkaloidy .....	25
2.2.2.8 Alkaloidy typu fenylethylaminu .....	27
2.2.2.9 Isochinolinové alkaloidy .....	27
2.2.2.9.1 Papaverin .....	28
2.2.2.9.2 Morfin .....	30
2.2.2.9.3 Kalifornidin .....	32
<b>3. Experimentální část .....</b>	<b>33</b>
3.1 Použitá metoda .....	33
3.2 Vyhodnocení výsledků .....	33
3.3 Testovaný organismus .....	34
3.4 Použitý materiál .....	34
3.4.1 Chemikálie .....	34
3.4.3 Vybavení .....	35
3.5 Pracovní postup .....	36
3.5.1 Příprava .....	36
3.5.1.1 Příprava mořské vody .....	36
3.5.1.2 Příprava testovaného organismu .....	37

3.5.1.3 Příprava testovaných látek .....	37
3.5.2 Vlastní provedení pokusu .....	37
<b>4. Výsledky .....</b>	<b>39</b>
4.1 Standardní látka .....	39
4.2 Kalifornidin .....	40
4.3 Papaverin .....	41
4.4 Morfin .....	43
<b>5. Diskuse .....</b>	<b>45</b>
<b>6. Závěr .....</b>	<b>49</b>
<b>7. Seznam zkratk .....</b>	<b>50</b>
<b>8. Seznam použité literatury .....</b>	<b>51</b>
<b>Abstrakt .....</b>	<b>55</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>56</b>

# 1. ÚVOD

Alzheimerova choroba je nejčastější příčinou demence <sup>[1]</sup>. Radíme ji mezi civilizační choroby, což jsou onemocnění, vznikající v důsledku moderního způsobu života civilizace <sup>[2]</sup>. Je to degenerativní onemocnění projevující se progresivní ztrátou paměti a rozpoznávacích funkcí. Na jeho vzniku se podílejí jak faktory vnějšího prostředí (viry, priony, toxiny, stres), tak i genetické vlivy <sup>[3]</sup>.

Makroskopicky se toto onemocnění projevuje atrofíí mozku. V důsledku ztráty parenchymu dochází k rozšíření mozkových komor. Z mikroskopických znaků jsou nejdůležitější senilní drúzy. Samotné drúzy nejsou pro Alzheimerovu chorobu typické, neboť se vyskytují i u osob tímto onemocněním netrpících. Specifická je však jejich četnost a hustota výskytu <sup>[3]</sup>. Senilní drúzy, nebo také senilní plaky, jsou vlastně chuchvalce amyloidních fibril. Kromě extracelulárního amyloidu obsahují plaky také deformované dendrity a axony s abnormálními intracelulárními neurofibrilami. Právě tvorba těchto netypických cytoskeletálních elementů vede k zániku neuronů <sup>[1]</sup>.

K tomuto úbytku nervových buněk dochází v mnoha oblastech mozku (hlavně v hippocampu) a díky tomu pak dochází ke snížené tvorbě neurotransmiterů. Zvláště se u tohoto onemocnění pozoruje úbytek cholinacetyltransferázy (až o 90%), klesají však koncentrace i dalších neurotransmiterů, například noradrenalinu, somatotropinu nebo serotoninu <sup>[1]</sup>.

Terapii Alzheimerovy choroby můžeme rozdělit na chorobu modifikující a symptomatickou. Protože je to nemoc heterogenní, je zde mnoho možností k výzkumu potenciálně účinných léčiv. Ze symptomatické léčby jsou užívány inhibitory acetylcholinesterázy a antagonisty NMDA receptorů, memantin. To jsou zároveň jediná dosud registrovaná léčiva <sup>[4]</sup>.

V současné době se pozoruje až epidemický nárůst civilizačních chorob a proto je potřeba zaměřit na ně nejen farmaceutický výzkum, ale také biologické a zemědělské vědy <sup>[2]</sup>. Do výzkumných skupin, zabývajících se civilizačními onemocněními,

konkrétně Alzheimerovo chorobou, patří i skupina ADINACO působící na Farmaceutické fakultě Univerzity Karlovy v Hradci Králové. Tato skupina se zabývá izolací alkaloidů z rostlin a hub, určením jejich struktury, stanovením jejich biologické aktivity a v neposlední řadě, u potenciálně prospektivních látek, jejich hlubšími studii. Sem patří například hodnocení akutní toxicity, kterým se zabývá tato diplomová práce <sup>[5]</sup>.



## 1.1 CÍL PRÁCE

Cílem této diplomové práce bylo optimalizovat metodu toxikologického screeningu na žábřonožkách *Artemia salina* a poté pomocí této metody vyhodnotit 3 látky. Zvolené látky patří mezi alkaloidy a jsou to: kalifornidin, papaverin a morfin.

## **2. TEORETICKÁ ČÁST**

### **2.1 ARTEMIA SALINA**

#### **2.1.1 TAXONOMICKÉ ZAŘAZENÍ**

Říše: Živočichové (Animalia)

Kmen: Členovci (Arthropoda)

Podkmen: Korýši (Crustacea)

Třída: Lupenonožci (Branchiopoda = Phyllopoda)

Řád: Žábronožky (Anostraca)

[6]

#### **2.1.2 ANATOMIE A MORFOLOGIE**

##### **2.1.2.1 STAVBA TĚLA**

*Artemia salina*, česky žábronožka solná, je typickým primitivním členovcem. Je to kosmopolitní druh ze slaných jezer a pobřežních slanisek. Protože může žít ve slané, brakické i sladké vodě, řadíme jí k euryhalinním organismům <sup>[6]</sup> <sup>[7]</sup>.

Název žábřonožek pochází z řeckého an = bez a ostrakon = skořápka: nemají tedy krunýř. Délka segmentovaného těla je většinou okolo 8-10 mm u samečků, 10-12 mm u samic. Šířka je u obou pohlaví cca 4mm. Pro tělo je charakteristická heteronomní segmentace a je kryté exoskeletem. Skládá se ze tří částí: hlava, hrud' a zadeček <sup>[7] [8]</sup>.

Hlava (cephalon) je nejvíce specializovanou částí těla. Vyskytují se zde specializované přívěsky, rozsáhle vyvinuté smyslové a nervové tkáně a komplex svalového a kosterního systému. Součástí hlavy jsou také vylučovací orgány a část trávicího traktu. Cephalon je rozdělen na šest článků. Akron, který nese jednoduché naupliové očko, složené oči na stopkách a labrum (část ústního ústrojí), a pět metamerických článků. Každý z těchto pěti článků nese pár rozeklaných končetin. Z prvního článku vyrůstají malá tykadla (antenuly), která jsou konkrétně u lupenonožců zakrnělá. Z druhého tykadla (anteny), která jsou u samečků výrazně větší. Slouží k přichycení na samici při kopulaci a nazývají se také objímavé končetiny. V těchto dvou párech končetin se vyskytují nervová zakončení, mají tedy i funkci smyslovou. Oproti tomu třetí až pátý pár zastává úkol příjmu a rozmělnění potravy. Třetí metamerický článek nese kusadla (mandibuly), čtvrtý a pátý čelisti (maxily). Souhrnně se hlavové končetiny nazývají cephalopody <sup>[6] [7]</sup>.

Hrud' (thorax) má 11 článků, z nichž každý nese pár rozeklaných, lupenitých nožek. Rozeklané (zvané také dvouvětevné, birámní) mají nerozeklanou (protopodit) a rozeklanou část. Na nožkách se vyskytují žábry a slouží tedy nejen k pohybu (plavání), ale i dýchání. Další jejich funkce jsou přihánění a filtrace potravy a osmoregulace. Žábřonožky plavou v typické poloze: otočené hřbetem dolů <sup>[6] [7]</sup>.

Zadeček (abdomen) je složen z osmi článků. První segment nese párové pohlavní orgány. Druhý až sedmý článek přívěsky postrádají a poslední (telson) je zakončen vidličkou (furkou) <sup>[6] [7]</sup>.

Celé tělo žábřonožky je kryté tenkým, flexibilním exoskeletem (také vnější kostra nebo kutikula) impregnovaným chitinem, ke kterému se zevnitř upínají příčně pruhované svaly. V larválních stádiích je kutikula na všech částech těla stejně tlustá. Je rozdělena na vnější epikutikulu a vnitřní fibrózi prokutikulu. Oproti tomu u dospělých jedinců je vnější kostra na různých částech těla různě široká a je rozdělena na tenkou

třívrstvou epikutikulu, laminovanou exokutikulu a fibrózní endokutikulu, pod níž se nachází epidermální buňky. Protože exoskelet brání růstu, dochází k jeho pravidelnému svlékání (ekdyzi). Tento proces indikuje hormon ekdyzon (svlékací hormon). U samic předchází ekdyze každé ovulaci, u samečků nebyla souvislost s reprodukcí pozorována. Na rozdíl od ostatních korýšů není kutikula inkrustovaná uhličitanem a žábřonožky tedy, jak už bylo uvedeno dříve, nemají krunýř<sup>[6] [7]</sup>.

## 2.1.2.2 ORGÁNOVÉ SOUSTAVY

### Trávicí soustava

Trávicí soustava je trubicovitá. Leží volně v hemocoelu a je omývána hemolymfou. Skládá se ze tří částí nazývaných jako foregut (jícen + ústa), midgut a hindgut a rozprostírá se po celé délce těla žábřonožky: od úst k řitnímu otvoru. Foregut a hindgut jsou původu ektodermálního a midgut endodermálního<sup>[6] [7] [9]</sup>. V místě, kde se setkává jícen a midgut, rozšiřuje se midgut v pár sáčků, nazývaných caeca. V jejich okolí je sekretována jemná granulární matrix zatím neznámé funkce. Buňky epitelu jsou lemovány dlouhými microvillami potaženými jemným fibrózním, pravděpodobně mukopolysacharidovým materiálem. Vytváří se tak nápadný kartáčový lem. Midgut nauplie a dospělého jedince je stejný<sup>[7]</sup>.

### Oběhová soustava

Srdce je dlouhé, trubicovité, uložené na hřbetní straně trupu, po jehož celé délce se rozkládá. Je obklopeno perikardiální dutinou, která je jednou z částí hemocoelu. Vepředu vybíhá v krátkou aortu ústící do hemocoelu. Na bočních stranách srdce se nachází párové otvory, zvané ostia. Jsou to póry, které přivádí krev z perikardiálního sinu do srdečního lumen. Perikardiální dutinu od zbytku hemocoelu dělí perforované septum, kterým proudí krev zpět do srdce. Celé srdce kontrahuje najednou. Krev je tedy přiváděna aortou do hemocoelu, proudí všemi tkáněmi a přes perforovanou blánu se dostává do ostií a těmi do srdce<sup>[9]</sup>.

Krvetvorné orgány jsou malé, různě velké uzliny obklopené tenkou, přerušovanou membránou. Nachází se na bázi každé hrudní končetiny<sup>[7]</sup>.

### **Vylučovací soustava**

Exkrece u dospělých je pravděpodobně zajišťována maxilárními žlázami, zatímco u vývojových stádií žábronožky tuto funkci zastávají antenální žlázy, které se u dospělců vyskytují jen jako rudimenty. Maxilární žlázy tvoří uzavřené, centrálně uložené váčky, z nichž vede dlouhý exkreční kanál, který kolem nich vytváří tři smyčky a poté pokračuje jako terminální kanál vedoucí do malého otvoru v sekundární maxille. Vytváří se tedy jakýsi nefron. Žlázy jsou obklopeny hemocoelem a omývány krví. Epitel každého váčku tvoří podocyty, které zajišťují ultrafiltraci krve. Kanál nefronu je morfoloicky rozdělen na dvě části. V prvním, exkrečním, dochází k modifikaci lumenálního obsahu. Druhý je obklopen kutikulou a slouží jako vývod finální moči<sup>[9]</sup>.

### **Dýchací soustava**

K největší výměně plynu dochází přes permeabilní plochy polypodií<sup>[9]</sup>.

### **Nervová soustava**

Nervový systém *Artemia salina* se skládá z dorzálního mozku, cirkumenterických spojek a párových segmentových ganglií. Ty jsou podélně spojeny spojkami a příčně dlouhou přední a kratší zadní komisurou. Byly popsány dva typy neuronů: větší, tvořené gangliovými buňkami s dobře vyvinutou cytoplasmou a jádrem s malým chromatinem, a menší z globulových buněk, u kterých je to s cytoplasmou a chromatinem přesně naopak<sup>[9]</sup>.

Mezi smyslové orgány patří naupliové očko a dvě složené oči. Naupliové očko se nachází na centrální anteriorní části hlavy a je kryto kutikulou a epidermis. Skládá se ze dvou pigmentových buněk, uspořádaných jako převrácené Y. Díky tomuto postavení vznikají tři kalichy, které obsahují retinové buňky<sup>[7]</sup>.

Dále se u žábřonožky nachází dvě široce oddělené, kutikulou kryté složené oči na pružných stoncích. Tvoří je okolo 300 omnatidií. Ta jsou složena z krystalických kuželů a šesti retinových buněk <sup>[7]</sup>.

### **Rozmnožovací soustava**

Gonády jsou u obou pohlaví párové trubicovité orgány <sup>[4]</sup>. Samičí pohlavní orgány tvoří vaječníky, vejcovody a děloha, která leží v ovisacu. Do něj ústí 4 shluky molovitých žláz <sup>[10]</sup>. Dospělá žábřonožka ovuluje cca každých 140 hodin. Tato doba záleží na chovných podmínkách, které požaduje každý druh jiné, a na tom, jakou ze dvou možných cest bude pokračovat vývoj vajíček <sup>[7]</sup>.

Samci mají dva samostatné reprodukční systémy. Každý je tvořen varlaty, semennými vácčky a chámovodem. Když je penis zatažen, semenné vácčky jsou složeny do smyčky ve tvaru písmene U. Během páření se pak vácčky napřimují <sup>[10]</sup>. Varlata obsahují jak somatické, tak zárodečné buňky <sup>[7]</sup>.

### **2.1.3 VÝVOJ**

Vývoj *Artemia salina* je nepřímý. Z vajíčka vzniká larva (nauplius) a teprve potom dospělec. Dochází tedy k ovoviviparii (vejcoživorodosti). Larvální stádium má jednoduché naupliové očko, první tři páry tělních končetin a oválný tvar těla <sup>[7]</sup>.

Může ale také dojít k oviparii, kdy vznikne nejdříve zapouzďené embryo = cysta, jehož membrána je nepropustná pro netěkavé látky, což je důležité pro zachování homeostázy. Cysta vstupuje do diapauzy (stádium spánku), která je ukončena podnětem prostředí, jenž je rozdílný druh od druhu i u stejného druhu, jestliže se populace vyskytuje v geograficky jiném prostředí. Cysty jsou schopné přežít téměř úplné vyschnutí a často je právě to onou podmínkou k ukončení „spánku“. Embrya uvolněná z diapauzy pokračují ve vývoji v larvu za permissivních podmínek, mezi něž patří dostupnost kyslíku, dostatek vody a teplota. Larvy takto vzniklé jsou morfologicky

stejně s těmi, které se vyvinuly vejcoživorodou cestou, avšak jsou mezi nimi rozdíly biochemické <sup>[7]</sup>.

Tato schopnost vytvářet aktivní či latentní stadia je typická pro organizmy, které zažily velké výkyvy parametrů vnějšího prostředí <sup>[7]</sup>.

Žábronožka solná je také schopná partenogeneze, tedy rozmnožování bez oplodnění. Tento způsob rozmnožování je obvyklý, pokud nejsou k dispozici jedinci samčího pohlaví <sup>[11]</sup>.

## **2.1.4 ODOLNOST ŽÁBRONOŽKY**

### **2.1.4.1 DIAPAUZÁLNÍ CYSTA**

#### **Trehalosa**

To, že cysty dokáží přežít téměř úplné vyschnutí, umožňuje mimo jiné disacharid trehalosa. Ta chrání membrány a proteiny před destruktivním efektem vyschnutí její schopností nahradit vodu ve struktuře jejich povrchu. Tento proces se nazývá “water replacement hypothesis“. Česky tedy teorie nebo hypotéza náhrady vody. Trehalosu akumuluje ve vysokých koncentracích velké množství organismů schopných odolat vyschnutí. Objev této schopnosti trehalosy samozřejmě umožnil i její praktické využití. Např. chrání liposomy před zničením vyschnutím nebo lidské pankreatické ostrůvky před destrukcí chladem. Vědci se snaží aplikovat její účinek při protekci lidských krevních destiček před chladem a další využití na sebe jistě nenechá dlouho čekat <sup>[7]</sup>.

Logické je, že trehalosa se ve velkém množství vyskytuje jen u cyst. Začíná se syntetizovat již druhý den po oplodnění a to pouze u embryí, jejichž osudem je vstup do diapauzy. Většina trehalosy jakožto cukru, tedy zdroje energie, je poté využita k vystoupení z tohoto stádia spánku. Zbytek je metabolizován na glycerol a glykogen,

zásobní polysacharid. U všech ostatních stádií žábřonožky nalezneme trehalosu pouze v malém množství <sup>[7]</sup>.

### **Antioxidanty**

Vyschlé cysty jsou jako všechny jiné živočišné organismy náchylné k oxidaci. Proto potřebují účinné antioxidanty, které je budou před účinky molekulárního kyslíku bránit <sup>[7]</sup>.

U *Artemia salina* se ve velkém množství vyskytují karotenoidy, které získávají ze své potravy: mořských řas. V tucích rozpustné karotenoidy jsou inkorporovány do oocytů žábřonožky a tvoří pak hlavní složku lipidů, ze kterých je vystavěna membrána zapouzdřeného embrya. Právě karotenoidy jsou výbornými antioxidanty <sup>[7]</sup>.

V cystě se samozřejmě vyskytují i další antioxidační systémy. V literatuře najdeme zmínky o vitamínu E (tokoferolu) a C (kyselině askorbové) <sup>[7]</sup>.

Zdrojem oxidačního stresu jsou ionty železa, které reagují s širokou škálou sloučenin za vzniku škodlivých produktů. Tyto dvoj- a trojmocné ionty nalezneme u žábřonožek vázané na proteiny <sup>[7]</sup>.

#### **2.1.4.2 HYDRATOVANÁ A AKTIVOVANÁ CYSTA**

Post-diapauzální cysty dokážou přežít na rozdíl od jiných živočišných forem dlouhá léta anoxie. Zatímco všechna stádia většiny živočichů nepřežijí bez kyslíku v řádech hodin, cysty *Artemia salina* přežijí měsíce. Při laboratorních pokusech bylo pozorováno, že až 60% cyst přežije čtyři roky bez kyslíku a 10% šest let. Pokud nemá cysta dostatek kyslíku, zpomalí se její metabolismus a proto je za permisivních podmínek opět schopná pokračovat ve vývoji. Zpomalené látkové přeměně by totiž trvalo velmi dlouhou dobu vyčerpat substráty, které cysta potřebuje k dalšímu vývoji. Zapouzdřená embrya přivádějí svůj metabolismus do reverzibilního klidu hned během prvního dne anoxie <sup>[7]</sup>.



## Změna pH

Toto zpomalení metabolismu způsobuje změna pH. Velké rozdíly pH jsou typické pro všechny živočišné systémy upadající do dormance. Z hodnoty 7,9 a výš u aerobních embryí klesá pH na 6,9 po několika dnech anoxie. Kyselé prostředí v těle cysty inhibuje RNA, syntézu a degradaci proteinů a některé enzymy klíčové při reakcích, do nichž vstupuje trehalosa. Při opětovném dostatku kyslíku hodnota pH stoupne a látková přeměna se opět spustí <sup>[7]</sup>.

Protože je změna pH jedním z hlavních regulátorů metabolismu cyst žábřonožky, jsou tato embrya velice užitečná v biologických studiích <sup>[7]</sup>.

### 2.1.4.3 ODOLNOST VŮČI TEPLU

Tepelná odolnost žábřonožek se samozřejmě v každém vývojovém stádiu liší. Nejvíce odolné jsou vyschlé diapauzální cysty, které přežijí expozici -270 °C. Ani vysoké teploty (až 103 °C) jim nedělají problém. Svoji roli v této extrémní odolnosti hraje opět trehalosa <sup>[7]</sup>.

Jinak je tomu samozřejmě u hydratovaných cyst, u kterých je termotolerance nižší. Přesto přežijí hodinové vystavení 49 °C, což je v živočišné říši stále působivé. U cyst nebyla pozorována žádná indukce termotolerance, mají tedy pravděpodobně všechny struktury podílející se na odolnosti v sobě „zabudované“ <sup>[7]</sup>.

Nejhorší termotoleranci že všech vývojových stádií mají dospělí jedinci. Zde byla zaznamenána odolnost vůči cca 38 °C (při půlhodinové expozici). Na rozdíl od cyst u dospělců k indukci termotolerance dochází. Avšak díky nedostatku stresových proteinů a trehalosy je odolnost vůči teplu nízká <sup>[7]</sup>.

## 2.1.5 OSMOREGULACE

Žábřonožky mají vyvinutý velmi účinný způsob osmoregulace, aby přežili v prostředí, ve kterém se přirozeně vyskytují, tedy ve velmi slaných vodách <sup>[12]</sup>.

Tento způsob spočívá v tom, že pijí své slané medium a transportují ionty a tekutiny ze střeva do hemolymfy stejnou rychlostí, jakou tekutina tělo opouští skrze tělní stěnu <sup>[7]</sup>. Ke ztrátě tekutiny dochází díky osmotickému tlaku. Žábřonožky jsou schopny pumpovat ven z těla ionty soli a proto je jejich vnitřní prostředí oproti tomu vnějšímu hypotonické. Dochází tedy k vyrovnání osmotického tlaku a přechodu tekutiny do media. Tuto ztrátu vody musí žábřonožky vyrovnat. Jak jinak, než napitím se. Tak se celý kruh uzavírá <sup>[12]</sup>

Sodné ionty přecházejí z těla žábřonožky do vnějšího prostředí díky sodno-draselným pumpám, které je pumpují ven proti osmotickému gradientu. Vysoká aktivita těchto pum a jejich enzymů byla zaznamenána u listovitých útvarů zvaných metepodity vyskytujících se na phylopodíích. Dále také u střeva a maxilární žlázy, což znamená, že tyto se také na osmoregulaci podílejí <sup>[7] [12]</sup>.

## 2.1.6 VYUŽITÍ

*Artemia salina* je díky svým unikátním vlastnostem využívána řadou vědců: fyziology, biology, biochemiky a genetiky. Své uplatnění našla i v akvaristice a produkci soli <sup>[7]</sup>.

### 2.1.6.1 SOLÁRNÍ PRODUKCE SOLI

Tento proces získávání soli probíhá čerpáním mořské vody z jednoho odpařovacího “jezířka“ do druhého, přičemž dochází k precipitaci karbonátů a sádrovce. Nakonec se přivádí nasycený roztok NaCl do krystalizačního jezírka, kde se sráží NaCl.

Předtím, než se všechna NaCl vysráží, musí být mateřská kapalina odpuštěna, aby se zabránilo kontaminaci bromidy a dalšími solemi, které precipitují právě při zvýšené salinitě. Tímto způsobem získáme nejčistší možnou formu soli: 99,7% v sušině<sup>[13]</sup>.

Kvantita a kvalita produkované soli jsou do značné míry ovlivněny hydrobiologickou aktivitou v jezírcích. Prospěšné jsou květy řas, které zajistí vyšší absorpci tepla, což znamená rychlejší vypařování a lepší výnosy. Řasy však musí být včas metabolizovány, jinak dojde k redukci velikosti krystalů a kvality soli, znehodnocení soli nebo dokonce k úplné inhibici precipitace<sup>[13]</sup>.

A zde je úkol žábřonožek. Ty se živí právě řasami a kontrolují tak jejich množství v jezírcích. To však není jediný důvod, proč jsou při solární produkci soli využívány. Poskytují esenciální živiny pro proliferaci Halobakterie v krystalizačních jezírcích. Vysoká koncentrace této bakterie redukuje množství rozpustných organických látek, čímž dochází ke snížení viskozity. To podporuje formaci větších krystalů. Dále tyto bakterie zvyšují stejně jako řasy absorpci tepla, což se opět odrazí ve větším vypařování vody<sup>[13]</sup>.

Tato metoda poskytuje nejen vysoce kvalitní sůl pro lidskou konzumaci a hlavně pro chemický průmysl, ale umožňuje sklízet vedlejší produkt ve formě cyst *Artemia salina* a její biomasy<sup>[7]</sup>. Výnos je ovlivněn dynamikou populace. Bylo pozorováno, že větší zisky jsou z oblastí, kde dochází k reprodukci ovoviviparií<sup>[13]</sup>.

#### **2.1.6.2 ARTEMIA SALINA JAKO KRMIVO**

*Artemia salina* se v posledních desetiletích stala nejoblíbenějším krmivem mořských i sladkovodních ryb pěstovaných jak v domácích akváriích, tak v průmyslových nádržích. Oblíbenost si získala díky svým výživovým hodnotám, snadnosti reprodukce a schopnosti přežít v extrémních podmínkách. Jako krmivo se využívají všechny životní formy žábřonožky<sup>[14]</sup>.

Rozsáhlé studie ukázaly, že rozdílné kmeny *Artemia salina* obsahují různé hladiny určitých polynenasycených mastných kyselina. Kompozice MK je určena

hlavně životním prostředím. Takže profil mastných kyselin dospělé žábřonožky a stejně tak cyst, které produkuje, reflektuje profil mastných kyselin potravy, kterou se živí <sup>[7]</sup>.

Nutriční vlastnosti žábřonožky se dají velice snadno ovlivnit a tedy podle potřeby upravit. Po vylíhnutí dochází k neselektivní filtraci částic menších než 25 µm. To umožňuje do žábřonožky “zabudovat“ látky, které je potřeba: esenciální mastné kyseliny, vitamíny, terapeutika, proteiny,... Tato technika obohacování se označuje jako bio-enkapsulace <sup>[7]</sup>.

Používá se živá biomasa, která se může zmrazit pro další použití nebo zpracovat v lupínky či jinou formu krmiva. Dospělá žábřonožka je získávána kultivací nebo sklízením ze solných jezírek <sup>[7]</sup>.

### 2.1.6.3 VYUŽITÍ VE VĚDĚ

*Artemia salina* je díky svým vlastnostem využívána vědci z rozmanitých vědních oborů. Na své testy ji používají ekotoxikologové, kteří ji vystavují množství různých polutantů a nešetří ji ani farmaceuti při preklinických testech. Své místo našla u genetiků a molekulárních biologů, kteří testují s její DNA, RNA, ribozomy a dalšími buněčnými komponenty, a také u biochemiků, kteří zase pro své potřeby izolují z žábřonožky enzymy, hemoglobin a další molekuly. Ekologové s ní krmí svá pokusná zvířata a své využití našla i u radiobiologů <sup>[7]</sup>.

### **Ekotoxikologie**

Testy akutní toxicity s různými vodními druhy jsou základním kamenem metod sloužících k monitorování a předvídání efektu chemikálií a odpadních vod. Nejvíce využívání jsou bezobratlí. Stále častěji se používají testovací kity, které obsahují bioindikátor ve formě vajíček, která se nechají vylíhnout až v době potřeby. Cysty *Artemia salina* jsou nejvíce využívány pro toxikologické testy mořského prostředí. Vhodnost těchto testů je však zpochybňována, kvůli malému významu žábřonožky pro mořský ekosystém a nedostatku senzitivity k množství běžných toxických látek <sup>[7]</sup>.

Tyto experimenty však můžeme provádět s velkým množstvím látek a jejich různými koncentracemi. Žábronožka se ukázala jako dobrý biosenzor, a i když se samozřejmě těmito testy nemohou nahradit ty na vyšších obratlovcích, mají potenciál jejich počet snížit <sup>[15]</sup>.

## 2.2 ALKALOIDY

### 2.2.1 CHARAKTERISTIKA

Alkaloidy jsou dusíkaté sloučeniny zásaditého charakteru, vyskytující se v různých orgánech některých rostlin a vzácně i u hub a obojživelníků. Nejvyšší obsah se nachází u rostlin z čeledí Apocyanaceae, Asclepidiaceae, Berberidaceae, Loganiaceae, Menispermaceae, Papaveraceae, Ranunculaceae, Rubiaceae a Solanaceae. Prakticky je nemají čeledě Rosaceae a Lamiaceae. V jedné rostlině se často vyskytuje více chemicky příbuzných alkaloidů a jejich obsah u jednotlivých rostlin značně kolísá. Mají především funkci ochrannou: odpuzují býložravce. Mohou však také sloužit k lákání opylovačů <sup>[16]</sup>.

V rostlinách jsou obvykle vázány jako soli organických kyselin (např. šťavelová, octová, mléčná), jen vzácně se vyskytují jako volné báze. Ve své struktuře zpravidla obsahují vázanou heterocyklickou sloučeninu. Jsou to většinou látky pevné, hořké chuti, bezbarvé a bez zápachu. Samozřejmě se vyskytují i výjimky, jako jsou alkaloidy kapalné (koniin, nikotin, spartein) nebo barevné (žlutý papaverin). Pouze některé se snadno rozpouštějí ve vodě, jsou však zpravidla dobře rozpustné v alkoholu, etheru, chloroformu a ve směsi chloroformu s etherem <sup>[16][17]</sup>.

Biosyntéza v rostlinách vychází z aminokyselin. Mohou však vznikat i jako meziprodukty biosyntézy terpenoidů, steroidů, některých kyselin nebo purinů účinkem aminů a amoniaku <sup>[18]</sup>.

Alkaloidy mají výrazný fyziologický účinek, který se často projevuje jejich extrémní toxicitou. Na druhé straně však mají mnohé z nich v subletálních dávkách terapeuticky výhodné farmakologické vlastnosti a využívají se jako léčiva <sup>[18]</sup>. Mnohé řadíme mezi drogy díky jejich účinku na centrální nervovou soustavu <sup>[17]</sup>.

Dosud bylo izolováno více jak 6000 alkaloidů a jejich počet stále stoupá. Stoupá také důležitost parciální a totální syntézy alkaloidů. Tato možnost se využívá právě tam,

kde je potřeba velké množství látky, například pro terapeutické použití nebo biologické zkoušky. V některých případech je parciální či totální syntéza natolik ekonomická, že vytlačila částečně nebo úplně izolaci z přírodních zdrojů. Je tomu tak například u kofeinu nebo lobelinu <sup>[18]</sup>.

Chemicky se od sebe navzájem alkaloidy velmi liší. Proto je různý i jejich toxický a farmakologický účinek. Podle obsažené heterocyklické sloučeniny je dělíme do několika skupin <sup>[16] [17]</sup>. Zde je uveden pouze výběr toxikologicky nejvýznamnějších skupin a jejich zástupců:

## **2.2.2 ROZDĚLENÍ ALKALOIDŮ**

### **2.2.2.1 TROPANOVÉ ALKALOIDY**

Mezi významné zástupce této skupiny patří kokain nacházející se u rostlin čeledi Erythroxylaceae, ve kterých je dominantní obsahovou látkou. Má širokou biologickou aktivitu, ovlivňuje přenos akčního potenciálu nervovými vlákny, působí na srdce a CNS. Listy zástupců této čeledi jsou zahrnuty do Jednotné úmluvy o omamných látkách, seznamu I <sup>[19]</sup>.

### **2.2.2.2 PYRROLIZIDINOVÉ ALKALOIDY**

Pyrrrolizidinové alkaloidy jsou v přírodě dosti rozšířené. Jsou charakteristické zvláště pro některé rostliny čeledí Asteraceae, Boraginaceae a Fabaceae. Mají hepatotoxický efekt <sup>[18]</sup>.

Velké množství pyrrrolizidinových alkaloidů se nechází u kostivalu (*Symphytum officinale*, čeleď Boraginaceae), který je proto nevhodný pro vnitřní užití a používá se pouze zevně jako hojivé stimulans a antiflogistikum <sup>[19]</sup>.

### 2.2.2.3 CHINOLIZIDINOVÉ ALKALOIDY

Nazývají se také lupinové alkaloidy, pro jejich hojný výskyt u rostlin rodu *Lupinus* (čeleď Fabaceae) <sup>[18]</sup>.

Hlavní zástupce spartein, nebo také lupinidin, se získává z janovce (*Sarothamnus scoparius*, Fabaceae) a je pro člověka toxický. Díky jeho stimulačním účinkům na srdce a krevní oběh může dojít k cirkulačnímu kolapsu <sup>[20]</sup>.

### 2.2.2.4 STEROIDNÍ ALKALOIDY

Tento typ alkaloidů je biosyntetizován ze steroidních prekurzorů. Rozdělují se podle povahy steroidu na alkaloidy typu pregnanu, cholestanu a O-nor-D-homocholestanového typu <sup>[18]</sup>. Některé z těchto látek mají teratogenní účinek, jsou inhibitory acetylcholinesterázy nebo destruktory buněčné membrány <sup>[16]</sup>.

Do této skupiny se řadí například protoveratrin A, protoveratrin B a jervin z rodu *Veratrum* (čeleď Melanthiaceae). *Solanum laciniatum* a *Solanum aviculare* slouží jako zdroje průmyslové izolace prekurzorů polysyntetických steroidních hormonů (např. solanidin, tomatidin) <sup>[18]</sup> <sup>[19]</sup>.



### 2.2.2.5 PURINOVÉ ALKALOIDY

Mezi nejvíce zmiňované zástupce této skupiny patří kofein, theobromin a theofylin. Označují se také jako pseudoalkaloidy, jelikož i přes čtyři atomy dusíku v molekule nevykazují zásaditý charakter a netvoří soli s kyselinami. Výskyt je nejvyšší u druhů rodů *Coffea* (čeleď Rubiaceae), *Thea* (čeleď Theaceae), *Theobroma* a *Cola* (čeleď Sterculiaceae) <sup>[18] [19]</sup>.

Periferní účinky všech těchto methylxantinů jsou prakticky stejného charakteru, kofein má však nejsilnější účinky centrální, které chybí theobrominu. Působí psychostimulačně, kardiostimulačně, diuretický, bronchorelaxačně a zvyšují sekreci žaludečních žláz <sup>[21]</sup>.

### 2.2.2.6 PYRIDINOVÉ ALKALOIDY

Patří sem alkaloidy rostlin rodu *Nicotiana* (čeleď Solanaceae), čeledi Arecaceae (označované také jako arekové alkaloidy) a rostliny *Ricinus communis* (čeleď Euphorbiaceae) <sup>[18]</sup>.

U rodu *Nicotiana* se nachází především nikotin, který však můžeme nalézt i v jiných čeledích. Nikotin se do lidského těla dostává při kouření cigaret či doutníků. Jeho spalné produkty podporují vznik rakoviny plic. Kromě toho nikotin zvyšuje krevní tlak, aktivitu trávicí soustavy a zužuje cévy <sup>[16] [18]</sup>.

### 2.2.2.7 INDOLOVÉ ALKALOIDY

Distribuce indolových alkaloidů je v rostlinné říši velice široká. Mimořádně bohatým zdrojem je čeleď Apocyanaceae, z jejichž zástupců se izolují přírodní léčiva. Dalším cenným zdrojem je rod *Claviceps* (čeleď Clavicipitaceae). Hojně se nalézají

také u čeledí Loganiaceae, Rubiaceae a Euphorbiaceae. Patří sem i některé alkaloidy rodu *Cinchona* (čeleď Rubiaceae) <sup>[18] [19]</sup>.

Z celkového množství dosud známých alkaloidů tvoří celou jednu čtvrtinu právě alkaloidy indolové. Dělíme je do několika skupin:

### **Jednoduché indolové alkaloidy**

Sem patří například psilocybin obsažený v houbách čeledi Agaricaceae a mající halucinogenní účinky. Dále se sem řadí alkaloidy fysostigminového typu (fysostigmin), přítomné v semenech *Physostigma venenosum* (Viciaceae). Fysostigmin se v medicíně využívá jako miotikum <sup>[18] [19]</sup>.

### **Složené indolové alkaloidy**

Terapeuticky významné báze této skupiny jsou reserpin a vinkamin. Reserpin se vytváří v rostlině *Rauwolfia Serpentina* (Apocyanaceae) a má hypotenzní účinek. Vinkamin, nalézající se ve *Vinca minor* (Apocyanaceae), zvyšuje mozkové prokrvení a utilizaci kyslíku, negativně však působí na kardiovaskulární systém <sup>[18] [19]</sup>.

### **Dimerní indolové alkaloidy**

Mezi tyto alkaloidy, které jsou vlastně dimery terpenických indolových alkaloidů, patří důležité látky vinblastin a vincristin, vyskytující se u *Vinca rosea* (Apocyanaceae). Tyto sloučeniny se používají jako antineoplastika <sup>[18] [19]</sup>.

### **Hemiterpenické indolové alkaloidy**

Tato skupina se také označuje jako alkaloidy námelové nebo ergolinové. Nalézají se ve sklerociích parazitující vřeckaté houby rodu *Claviceps* (Clavicipitaceae) i v některých jiných houbách (*Aspergillus*, *Penicillium*). Patří sem ergometrin a ergotamin využívající se jako uterotonika a ergotamin i jako antimigrenikum <sup>[18] [21]</sup>.

### 2.2.2.8 ALKALOIDY TYPU FENYLETHYLAMINU

Mezi tyto baze patří efedrin a pseudoefedrin. Pochází z rodu *Ephedra* (čeleď Ephedraceae). Efedrin má kombinované přímé a nepřímé sympatomimetické účinky <sup>[18]</sup>  
[21].

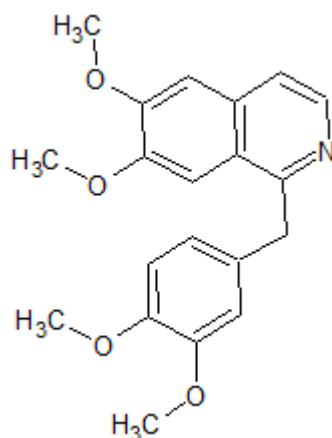
### 2.2.2.9 ISOCHINOLINOVÉ ALKALOIDY

#### **Benzylochinolinové alkaloidy**

Do této skupiny patří strukturně rozličné, v přírodě velice rozšířené alkaloidy. A to hlavně u čeledí Papaveraceae, Ranunculaceae, Rhamnaceae, Fumariaceae, Rutaceae nebo Berberidaceae <sup>[18]</sup>.

Patří sem opiové alkaloidy (papaverin, narkotin), alkaloidy kurare (protokuridin) a tubokurarové alkaloidy (tubokurarin). D-forma tubokurarinu je prudce jedovatá část šípového jedu, odstraňuje křeče způsobené tetanovým toxinem a je to tudíž myorelaxans. Vytváří ho rostlina *Chondrodendron tomentosum* (čeleď Menispermaceae) <sup>[18] [19] [21] [22]</sup>.

### 2.2.2.9.1 Papaverin



Obrázek 1: Struktura papaverinu

Papaverin je přírodní alkaloid opia. Opium je směs alkaloidů získávaná z nezralých tobolek nebo izolací z makoviny *Papaver somniferum* (čeleď Papaveraceae). Tato rostlina se vyskytuje v četných varietách lišících se nejen barvou květů a semen, tvarem a velikostí plodů, ale i obsahem alkaloidů a jejich vzájemným zastoupením. Opium obsahuje více než 40 alkaloidů a mezi hlavní patří morfin, kodein a papaverin, všechny tři využívané ve farmacii. Vyskytují se zde ve formě mekonátů, fumarátů, laktátů a síranů. Pro opium je charakteristická kyselina mekonová. Dalšími složkami opia jsou kaučuk, slizy, pektiny, pryskyřice, proteiny, cukry, minerální látky a voda. V lékopise nalezneme suroviny: Opium crudum a Opii pulvis normatus. Převážná část opia se dnes používá k izolaci jednotlivých alkaloidů. Dříve se používalo jako analgetikum, avšak pro jeho rizika se od tohoto ustoupilo<sup>[19] [23]</sup>.

Dnes se papaverin většinou připravuje synteticky. Na vzduchu podléhá vlivem světla rozkladným reakcím a žloutne. Protože se z trávicího ústrojí vstřebává dosti nerovnoměrně, dává se přednost podání parenterálnímu a rektálnímu<sup>[24]</sup>.

Papaverin má několik farmakologických využití. Jako muskulotropní spasmolytikum je indikován hlavně při střevních, žlučnickových a ledvinových spasmech a při různých spastických stavech cévních. Mechanismus účinku spočívá v inhibici fosfodiesterázy a následném hromadění cAMP, který má podíl na relaxaci hladké svaloviny. Tento jeho účinek je prost většiny nežádoucích účinků parasymptolytik (sucho v ústech, retence moči)<sup>[24]</sup>. Pro jeho schopnost relaxace

hladké svaloviny se využívá také k léčbě erektilní dysfunkce, musí se však aplikovat interkavernózně <sup>[25]</sup>. V této indikaci se někdy používá v kombinaci s fentolaminem. Tato kombinace je účinná u pacientů s neurogenní, psychogenní nebo mírnou cévní impotencí <sup>[26]</sup>.

Má také účinek vasodilatační, který způsobí pokles krevního tlaku, což je při jeho použití jako spasmolytika nežádoucí a přistoupilo se k přípravě strukturně blízkých derivátů, jako je např. drotaverin <sup>[24]</sup>. Vasodilatačního účinku se může využít k úlevě od cerebrální a periferní ischemie a ischemie myokardu komplikované arytmií. Nedoporučuje se však jako náhrada nitroglycerinu při anginózních záchvatech <sup>[26]</sup>.

Pokud se molekuly papaverinu dostanou do ovzduší, budou existovat jak ve formě páry, tak jako pevné částice. V případě páry je papaverin degradován v atmosféře hydroxylovými radikály vzniklými fotochemickými reakcemi. Pevné částice jsou z atmosféry odstraňovány mokrou či suchou depozicí. Na základě pKa papaverinu (8,07) se předpokládá, že se bude částečně vyskytovat ve formě kationtu. Ty jsou adsorbovány půdou mnohem silněji než částice neutrální. Vypařování z vlhkých povrchů se zde nepovažuje za podstatné a ze suchých povrchů se vypařovat nemůže. Biodegradační údaje v půdě nebo ve vodě nejsou k dispozici. V případě, že se papaverin uvolní do vody, předpokládá se jeho adsorpce na nerozpustné látky a sedimenty. Vypařování z vodního povrchu se opět nepokládá za důležité (na základě odhadované Henryho konstanty). K hydrolýze pravděpodobně nedochází, neboť molekula papaverinu neobsahuje funkční skupiny hydrolyzovatelné za podmínek okolního prostředí. Předpokládá se mírná bioakumulace ve vodních organismech <sup>[26]</sup>.

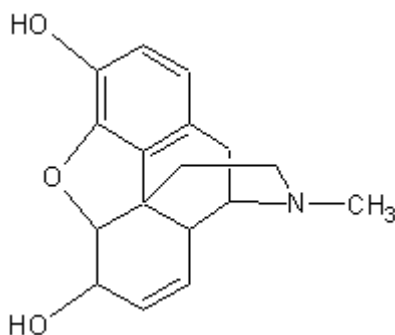
### **Složené benzylochinolinové alkaloidy**

Významným představitelem je alkaloid emetin rostliny *Cephaelis ipecacuanha* (Rubiaceae) mající expektorační a emetické účinky <sup>[18] [19] [21]</sup>.

## Morfinanové alkaloidy

V biosyntéze morfinanových alkaloidů je důležitým meziproduktem norlaudonosolin (stejně jako u isochinolinových). Při jeho přepisu dochází k ortho-para spojení a vytvoření základního uhlíkového skeletu morfinanů. Sledem několika reakcí vzniká thebain, dalšími reakcemi kodein a z něj demethylací morfin<sup>[18]</sup>.

### 2.2.2.9.2 Morfin



Obrázek 2: Struktura morfinu

Morfin se vyrábí izolací z opia, které ho obsahuje 9-14 %. Opium bylo již zmíněno výše. Z trávicího ústrojí se vstřebává nespolehlivě, proto se upřednostňuje injekční podání<sup>[21] [27]</sup>.

Řadí se mezi analgetika-anodyna a používá se pro zvládnutí krutých bolestí známého původu nezvladatelných jiným způsobem. Jsou to zejména úrazy, popálení, kruté pooperační bolesti nebo infarkt myokardu. Značné nebezpečí však představuje nemožnost oddělení jeho analgetického účinku a euforie, která po navození analgezie nastává. Dochází k touze po opakování tohoto zážitku a riziku vzniku závislosti. Chronická léčba bolesti tedy přichází v úvahu pouze tam, kde je infaustní diagnóza (např. maligní tumor). Mechanismus jeho účinku spočívá ve vazbě na opioidní (morfinové) receptory. Rozlišují se tři typy těchto receptorů: mí, kappa a sigma a na všechny působí morfin jako agonista<sup>[21] [27]</sup>.

Mezi další účinky morfinu patří schopnost potlačit pocity dušnosti, což nachází léčebné uplatnění např. při plicním edému. Má také výrazný tlumivý efekt na centrum pro kašel a na pohyb řasinkového epitelu v bronších. Dává se však přednost jiným antitusikům. Právě inhibice řasinkového epitelu vede u morfinistů k časté bronchopneumonii<sup>[21]</sup>.

Morfin lze použít i pro jeho účinek antidiarrhoický. Opět se ale dává přednost méně nebezpečným látkám<sup>[28]</sup>.

90% morfinu se využívá k přípravě jeho polysyntetických derivátů jako je například kodein (methylnorfin). Diacetylnorfin neboli heroin má také výrazný analgetický účinek. Rychle proniká do CNS, kde se hydrolyzuje na morfin. Je však ještě toxičtější než morfin a způsobuje těžkou závislost. Je zneužíván jako droga<sup>[23]</sup>.

Závislost na morfinu, morfinismus, je psychická i somatická. Návyk vzniká velmi rychle na analgetický a euforizující účinek, na ostatní účinky pak pomaleji. K léčbě závislosti se používají psychofarmaka nebo metadon a samozřejmě psychoterapie. Morfin je zařazen v seznamu návykových látek zákona o návykových látkách<sup>[19][21]</sup>.

Pokud se molekuly morfinu dostanou do vzduchu, existují zde ve formě pevných částic. Ty jsou z atmosféry odstraněny mokrou či suchou depozicí. Stejně jako u papaverinu se morfin bude v půdě vyskytovat částečně ve formě kationtů a nepředpokládá se jeho vypařování. Odpařování z vodního povrchu ani hydrolyza se nepovažují pro environmentální cykly za důležité. Ve vodě se morfin neváže na nerozpustné látky a sedimenty, ale má potenciál pro biokoncentraci ve vodních organismech<sup>[29]</sup>.

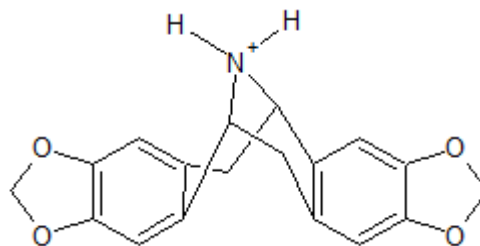
### **Berberinové alkaloidy**

Do této skupiny patří alkaloidy jako berberin nebo skulerin. Berberin je vytvářen rostlinou *Berberis japonica* (Berberidaceae). Vykazuje aktivitu proti některým plísňovým infekcím a je považován za antibiotikum<sup>[18][30]</sup>.

## Pavinanové alkaloidy

Bazický dusík je v tomto typu alkaloidů začleněn do můstku ve středu molekuly. Podle substituce se dělí na alkaloidy terciární a kvartérní (př. kalifornidin) <sup>[31]</sup>.

### 2.2.2.9.3 Kalifornidin



Obrázek 3: Struktura kalifornidinu

Kalifornidin byl izolován z rostliny *Eschscholzia californica* (čeleď Papaveraceae), podle níž dostal své jméno. Vyskytuje se i v dalších rostlinách rodu *Eschscholzia* <sup>[32]</sup>. Kalifornský mák se tradičně používá jako anxiolytikum. Studie ukazují, že jeho vodno-alkoholický extrakt má sedativní účinky ve vyšších dávkách a anxiolytický v nižších. Za tento účinek jsou pravděpodobně zodpovědné alkaloidy kalifornidin a kalifornin. Rostlina má také mírný analgetický efekt <sup>[31] [33]</sup>.



## **3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST**

### **3.1 POUŽITÁ METODA**

Použily jsme test na larvách *Artemia salina*, který se používá jak v ekotoxikologických testech, tak k toxikologickému screeningu<sup>[34]</sup>.

Existuje několik variací tohoto testu. Můžeme použít Petriho misky, zkumavky nebo mikrotitrační destičky. Testem se stanoví procento uhynulých nauplií *Artemia salina* v různých koncentracích k určení hodnoty letální koncentrace LC<sub>50</sub><sup>[35]</sup>.

V našem případě jsme zvolily mikrotitrační destičky. Do jamek destičky napipetujeme vytvořenou ředící řadu roztoků zkoumané látky. Do každé jamky odlovíme 10 larev žábřonožky. Připravíme několik paralelních stanovení a samozřejmě kontrolu. Celý test probíhá v prostředí mořské vody. Po 24 hodinách zaznamenáme úmrtnost nauplií. Za uhynulé jsou považovány až takoví jedinci, kteří již nevykazují po mechanickém dráždění ani nepatrný pohyb vycházející z některé části jejich těla, což lze nejlépe rozpoznat mikroskopem<sup>[36]</sup>. Test opakujeme 2x - 3x.

### **3.2 VYHODNOCENÍ VÝSLEDKŮ**

Pro každou koncentraci jsme vypočítaly procento úmrtnosti nauplií a pomocí statistického programu GraphPadPrism 6 zjistily hodnotu 24hLC<sub>50</sub> v jednotkách mM pro každou látku.

### 3.3 TESTOVANÝ ORGANISMUS

Při experimentu jsme použily larvy *Artemia salina*, jejíž podrobná charakteristika byla uvedena v teoretické části. Pro sledování toxicity jsou vhodné právě larvy (nauplie), neboť mají vysokou citlivost vůči celé řadě chemických látek. Líhnou se z opouzdrěných vajíček zvaných cysty, které jsou v klidovém stadiu diapauze a jsou komerčně dostupné v konzervách. To umožňuje velmi levně získat několik desítek milionů jedinců vysoké homogenity, což je další výhodou použití tohoto organismu <sup>[35]</sup>.

### 3.4 POUŽITÝ MATERIÁL

#### 3.4.1 CHEMIKÁLIE

testované látky (izolované skupinou ADINACO):

papaverin chlorid

kalifornidin jodid

morfin chlorid x 3H<sub>2</sub>O

látky k přípravě mořské vody:

NaCl (PENTA)

MgCl<sub>2</sub> x 6 H<sub>2</sub>O (PENTA)

CaCl<sub>2</sub>(PENTA)

KCl (PENTA)

Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>(PENTA)

HCl

NaOH

deionizovaná voda

MnCl

MnCl<sub>2</sub> x 4 H<sub>2</sub>O (FURKA P.A.)

### **3.4.3 VYBAVENÍ**

ultrazvuková lázeň SONOREX DIGITAL 10P (BANDELIN)

váhy KERN ABJ

inkubátor

pH metr

mikroskop LEICA EZ 4D

software GraphPadPrism 6

## 3.5 PRACOVNÍ POSTUP

### 3.5.1 PŘÍPRAVA

#### 3.5.1.1 PŘÍPRAVA MOŘSKÉ VODY

K přípravě mořské vody, která slouží jako médium pro žábřonožky, navážíme všechny pevné látky (jejich množství je uvedeno v tabulce 1) a nasypeme do uzavíratelné nádoby s rýskou o objemu 1000 ml. Nádobu po rýsku doplníme destilovanou vodou, uzavřeme a umístíme do ultrazvukové lázně pro úplné rozpuštění pevných látek. Po úplném rozpuštění je potřeba změřit pH, které by mělo mít hodnotu 8. Změříme ho tedy pomocí pHmetru a případně upravíme hydroxidem sodným nebo kyselinou chlorovodíkovou. Takto připravená mořská voda má salinitu 35‰ a koncentraci rozpuštěného kyslíku  $6,5 \text{ mg.l}^{-1}$ .

Tabulka 1: Složení mořské vody

látka	množství (g)
NaCl	23,00
MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	11,00
CaCl <sub>2</sub>	2,11
KCl	0,70
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	9,07

### **3.5.1.2 PŘÍPRAVA TESTOVANÉHO ORGANISMU**

Jako první krok dáme vylíhnout vajíčka. Líhnutí probíhá v mořské vodě při teplotě  $25 \pm 2$  °C, kdy k vylíhnutí dochází za 24 hodin. Vajíčka vložíme do inkubátoru, kde jsou po celou dobu ozařována světlem. Líhivost kvalitních cyst se blíží ke 100 procentům. Po vylíhnutí plavou prázdné skořápky cyst na hladině a mrtvé cysty leží na dně. U živých nauplií dochází k pozitivní fototaxi, které lze využít při následném lovení. Za optimálních podmínek je životnost žábřonožek 96-120 hodin <sup>[35][36]</sup>.

### **3.5.1.3 PŘÍPRAVA TESTOVANÝCH LÁTEK**

Nejdříve je potřeba připravit roztok látky o určité koncentraci a poté ředící řadu. Pomocí molekulové hmotnosti, kýženého objemu a koncentrace vypočítáme potřebné množství látky k vytvoření roztoku. Látky rozpustíme v mořské vodě a pro vytvoření čirého roztoku je vložíme do ultrazvukové lázně.

Dalším krokem je vytvoření ředící řady. Ředící faktor je 1,5, což odpovídá poměru 2:1. Připravíme si jedenáct koncentrací zkoumaného roztoku klesajících geometrickou řadou.

## **3.5.2 VLASTNÍ PROVEDENÍ POKUSU**

Při pokusu jsme využily možnosti miniaturizace a použily 96 jamkové mikrotitrační destičky.

Do jedenácti sloupců (1-11) napipetujeme námi vytvořenou ředící řadu roztoku zkoumané látky. Dvanáctý sloupec slouží jako kontrola (K), do něj napipetujeme pouze

mořskou vodu. V řadách máme 7 paralelních stanovení (A-G). Jamky v první řadě slouží jako promývací (P). Schéma pokusu je uvedeno v tabulce 2.

**Tabulka 2: Schéma pokusu**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	K
P	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>	C <sub>4</sub>	C <sub>5</sub>	C <sub>6</sub>	C <sub>7</sub>	C <sub>8</sub>	C <sub>9</sub>	C <sub>10</sub>	C <sub>11</sub>	mořská voda
A	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>	C <sub>4</sub>	C <sub>5</sub>	C <sub>6</sub>	C <sub>7</sub>	C <sub>8</sub>	C <sub>9</sub>	C <sub>10</sub>	C <sub>11</sub>	mořská voda
B	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>	C <sub>4</sub>	C <sub>5</sub>	C <sub>6</sub>	C <sub>7</sub>	C <sub>8</sub>	C <sub>9</sub>	C <sub>10</sub>	C <sub>11</sub>	mořská voda
C	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>	C <sub>4</sub>	C <sub>5</sub>	C <sub>6</sub>	C <sub>7</sub>	C <sub>8</sub>	C <sub>9</sub>	C <sub>10</sub>	C <sub>11</sub>	mořská voda
D	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>	C <sub>4</sub>	C <sub>5</sub>	C <sub>6</sub>	C <sub>7</sub>	C <sub>8</sub>	C <sub>9</sub>	C <sub>10</sub>	C <sub>11</sub>	mořská voda
E	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>	C <sub>4</sub>	C <sub>5</sub>	C <sub>6</sub>	C <sub>7</sub>	C <sub>8</sub>	C <sub>9</sub>	C <sub>10</sub>	C <sub>11</sub>	mořská voda
F	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>	C <sub>4</sub>	C <sub>5</sub>	C <sub>6</sub>	C <sub>7</sub>	C <sub>8</sub>	C <sub>9</sub>	C <sub>10</sub>	C <sub>11</sub>	mořská voda
G	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>	C <sub>4</sub>	C <sub>5</sub>	C <sub>6</sub>	C <sub>7</sub>	C <sub>8</sub>	C <sub>9</sub>	C <sub>10</sub>	C <sub>11</sub>	mořská voda

Po napipetování celé destičky odlovíme do každé jamky 10 nauplíí. Ty nejdříve ve větším množství pomocí pipety přeneseme z Petriho misky do promývací jamky a z té potom Pasteurovo pipetou po deseti kusech do zkoumaných jamek (ve stejném sloupci). Je samozřejmě žádoucí postupovat co nejrychleji a přenášet žábřonožky s co nejmenším množstvím vody, aby nebyly zbytečně vystaveny stresu a nedocházelo k dalšímu naředění roztoku.

Když máme destičku připravenou, přiklopíme ji víčkem a vložíme na 24 hodin do inkubátoru. Inkubace probíhá za teploty 25 °C.

Po 24 hodinách destičku z inkubátoru vyjmeme a pomocí mikroskopu odečteme úmrtnost v každé jamce (samozřejmě kromě jamek promývacích).

Každý test zopakujeme 2x -3x.

## 4. VÝSLEDKY

### 4.1 Standardní látka

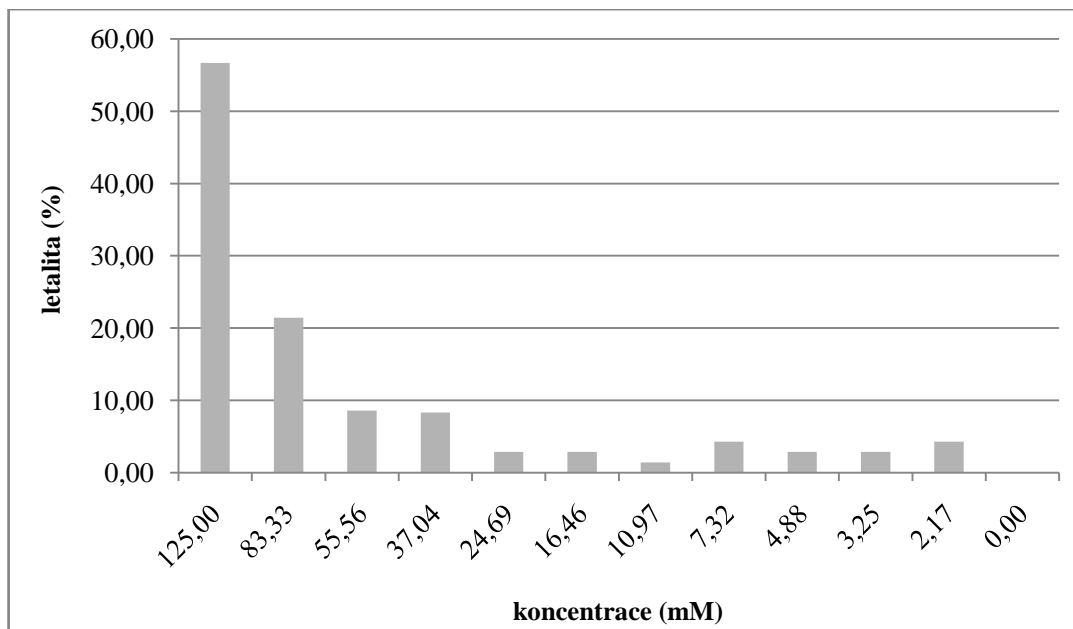
Jako standardní látku jsme použily chlorid manganatý. Stejně jako u chloridu jsou výsledky interpretovány u dalších testovaných látek.

V tabulce 3 jsou uvedeny průměry procent úmrtnosti pro každou koncentraci (tedy pro každý sloupec) a směrodatné odchylky.

**Tabulka 3: Průměr procent úmrtnosti pro každou koncentraci a směrodatné odchylky při použití  $MnCl_2$**

c(mM)	125,00	83,33	55,56	37,04	24,69	16,46	10,97	7,32	4,88	3,25	2,17	0,00
průměr	56,67	21,43	8,57	8,33	2,86	2,86	1,43	4,29	2,86	2,86	4,29	0,00
±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
σ	0,34	0,00	1,01	0,84	1,01	1,01	1,01	0,00	1,01	0,00	2,02	0,00

Následujícím graf (obrázek 4) ukazuje závislost úmrtnosti larev *Artemia salina* na koncentraci  $\text{MnCl}_2$ .



Obrázek 4: Graf závislosti letality na koncentraci při použití  $\text{MnCl}_2$

Pomocí statistického programu GraphPadPrism 6 jsme pak vypočítaly hodnotu letální koncentrace:

$$24\text{hLC}_{50} = 111,0 \text{ mM} (104,1 - 118,5 \text{ mM})$$

## 4.2 KALIFORNIDIN

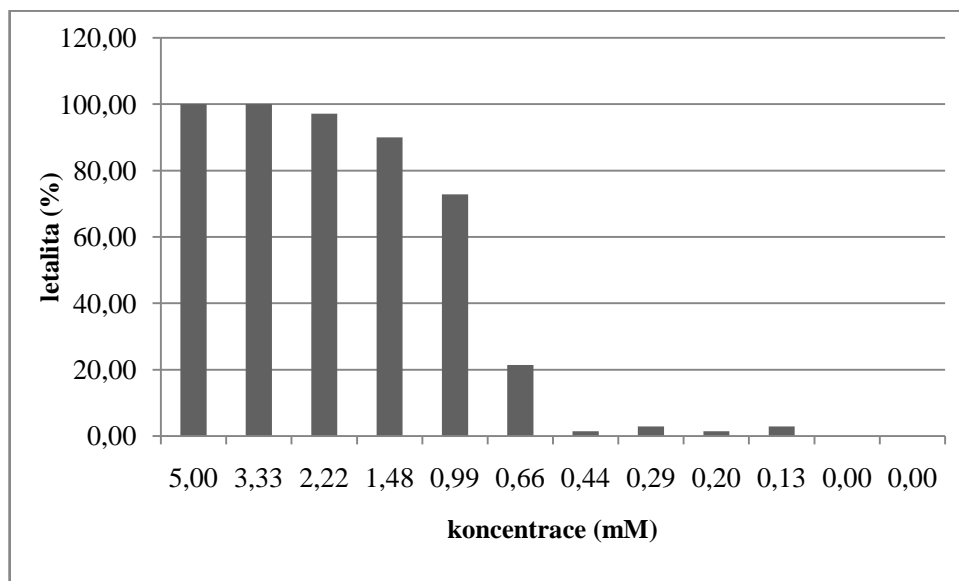
Jedním ze tří testovaných alkaloidů byl kalifornidin. Ten jsme si připravili v iničiálních koncentracích 10 mM a 5 mM. Koncentrace po naředění geometrickou řadou jsou opět uvedeny v tabulce.



## 5mM

Tabulka 4: Průměr procent úmrtnosti pro každou koncentraci a směrodatné odchytky při použití kalifornidinu 5mM

c(mM)	5,00	3,33	2,22	1,48	0,99	0,66	0,44	0,29	0,20	0,13	0,00	0,00
průměr	100,00	100,00	97,14	90,00	72,86	21,43	1,43	2,86	1,43	2,86	0,00	0,00
±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
σ	0,00	0,00	1,01	1,01	4,04	0,00	1,01	1,01	0,00	2,02	0,00	0,00



Obrázek 5: Graf závislosti letality na koncentraci při použití kalifornidinu 5mM

Hodnota letální koncentrace vypočtená pomocí statistického programu GraphPadPrism 6 je:

$$24hLC_{50} = 0,84mM (0,79 - 0,88mM)$$

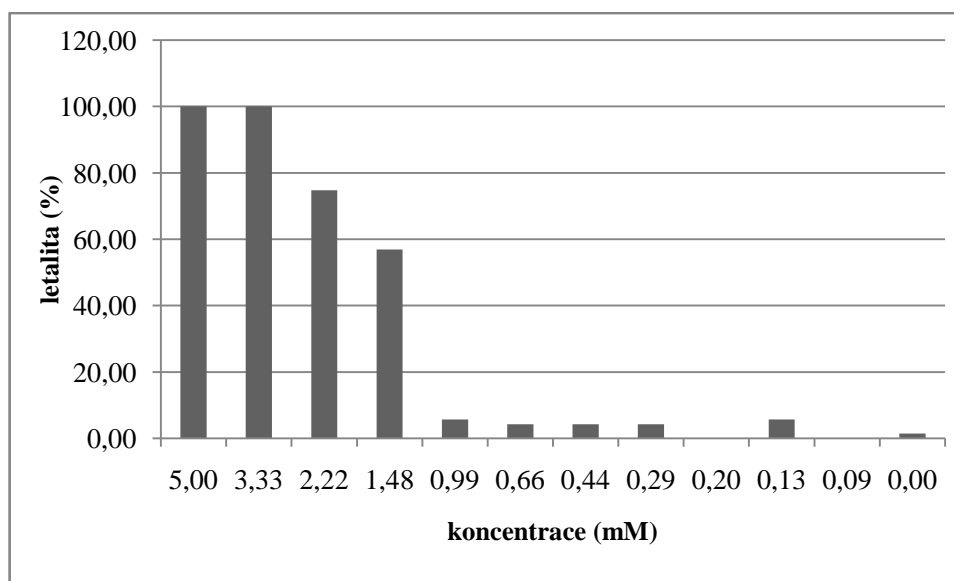
## 4.3 PAPAVERIN

Papaverin jsme připravily v iniciálních koncentracích 10mM a 5 mM.

## 5 mM

**Tabulka 5: Průměr procent úmrtnosti pro každou koncentraci a směrodatné odchylky při použití papaverinu 5mM**

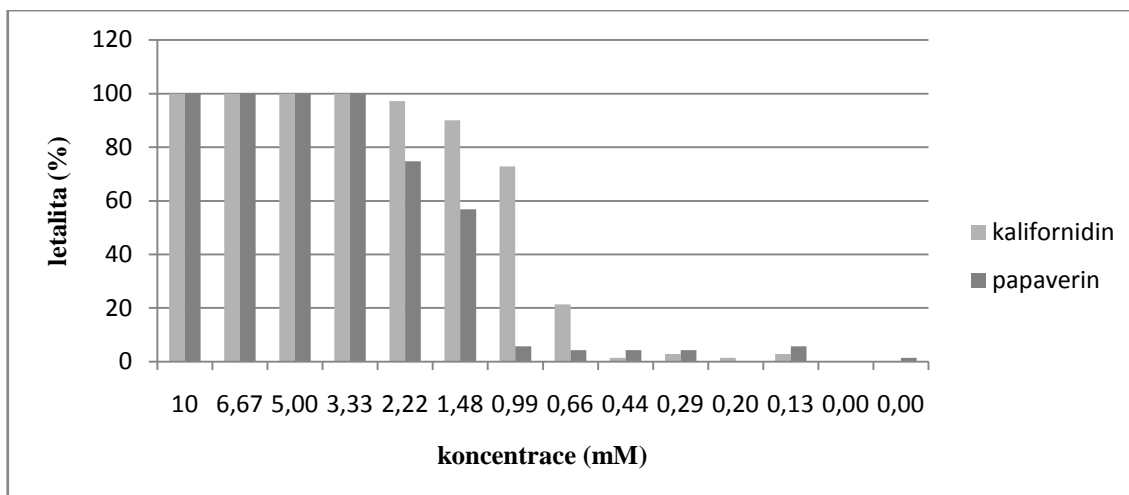
c(mM)	5,00	3,33	2,22	1,48	0,99	0,66	0,44	0,29	0,20	0,13	0,09	0,00
průměr	100,00	100,00	74,80	56,88	5,71	4,29	4,29	4,29	0,00	5,71	0,00	1,43
±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
σ	0,00	0,00	0,64	0,18	1,01	0,00	1,01	1,01	2,02	3,03	0,00	1,01



**Obrázek 6: Graf závislosti letalita na koncentraci při použití papaverinu 5mM**

Hodnota letální koncentrace vypočtená pomocí statistického programu GraphPadPrism 6 je:

$$24hLC_{50} = 1,47mM (1,39 - 1,54mM)$$



Obrázek 40: Srovnání účinnosti kalifornidinu a papaverinu

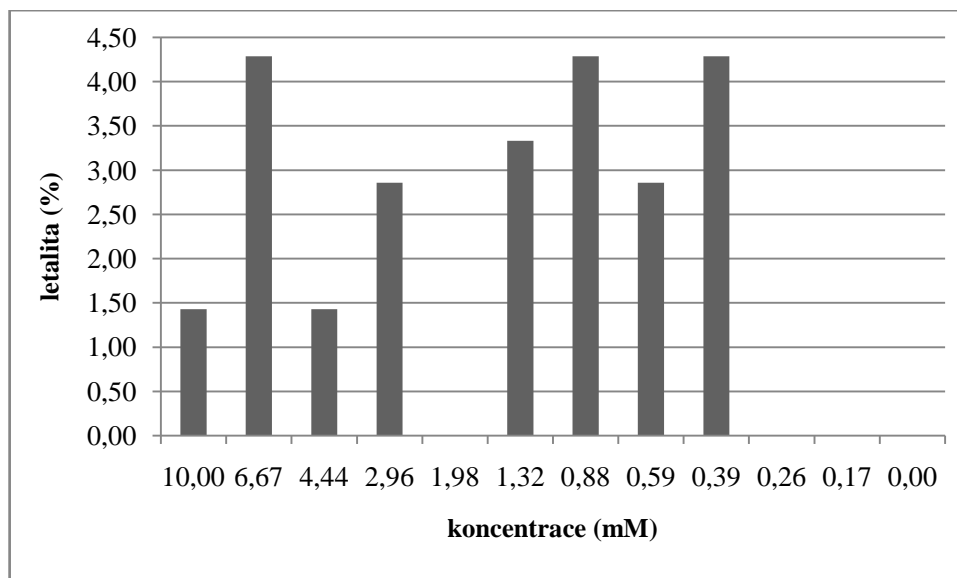
## 4.4 MORFIN

Morfin jsme připravily v koncentracích od 10 mM a 15 mM.

### 10mM

Tabulka 6: Průměr procent úmrtnosti pro každou koncentraci a směrodatné odchylky při použití morfinu 10mM

c(mM)	10,00	6,67	4,44	2,96	1,98	1,32	0,88	0,59	0,39	0,26	0,17	0,00
průměr	1,43	4,29	1,43	2,86	0,00	3,33	4,29	2,86	4,29	0,00	0,00	0,00
±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
σ	1,01	2,02	2,02	1,01	2,02	1,35	2,02	1,01	1,01	2,02	1,01	0,00



**Obrázek 7: Graf závislosti letalita na koncentraci při použití morfinu 10mM**

## **5. DISKUSE**

V této práci byla vyhodnocována toxicita alkaloidů na žábronožkách *Artemia salina*. Veškeré testované alkaloidy byly získané od skupiny ADINACO, zabývající se studiem látek izolovaných z rostlin a hub. Součástí výzkumu této skupiny je zejména studium vlivu těchto alkaloidů na patofyziologické procesy probíhající v souvislosti s Alzheimerovou chorobou <sup>[5]</sup>.

Použitý organismus, dospělec žábronožky solné, je korýš cca centimetrové délky, vyskytující se v mírných, subtropických i tropických klimatických zónách. Dokáže se tedy přizpůsobit velkému rozpětí teplot (6-35 °C), ale také salinity (5-250 g·l<sup>-1</sup>) <sup>[7][15][34]</sup>.

Použití žábronožek jako organismu sledovaného pro vliv alkaloidů na zmíněný organismus limitují dva faktory: malý význam pro mořský ekosystém (což je pro toxikologický screening nepodstatné) a nízká senzitivita k řadě chemických látek, přesto velké množství dalších vlastností žábronožek vyzdvihují tento organismus na jeden z nejvíce vhodných organismů pro testy toxicity. Mezi tyto vlastnosti patří široká geografická distribuce, snadné uchovávání a zacházení, odolnost, krátký životní cyklus, velké množství potomstva a v neposlední řadě také značné množství informací o některých druzích <sup>[7][34]</sup>. Testy jsou vhodné nejen pro toxikologické screeniny, ale nachází také své uplatnění ve farmakologii a farmakotoxikologii, kde žábronožky slouží jako biosenzory. Výše zmíněné výhody upřednostňují tento organismus pro testování toxicity, což může vést ke snížení počtu obratlovců potřebných pro testy <sup>[15][34][38]</sup>.

Velkou předností použití žábronožek v testování toxicity je také možnost miniaturizace testu. Mikrobiotesty (také alternativní testy) jsou stále více oblíbené pro svou dostupnost, cenu a rychlou a snadnou realizaci <sup>[37]</sup>.

Přestože výše zmíněné výhody spojené s použitím žábronožek při testování toxicity předurčují tento organismus jako hlavní pro další klinické testování, problém spojený s jejich použitím může být reprodukovatelnost testu. Vlastnosti žábronožek se liší nejen druh od druhu, ale také kmen od kmenu. I přes dodržení přesně daných experimentálních podmínek, jako je teplota a salinita, se citlivost prvního larválního

stádia žábřonožek značně liší. Liší se i doba potřebná k vylíhnutí 50% larev (za stejné teploty). Proto by bylo vhodné určit jeden určitý geografický kmen jako standard pro testování<sup>[38]</sup>.

Další komplikací při reprodukci testu mohou být také různá stádia larev s různou citlivostí. Z prvního larválního stádia bezprostředně po vylíhnutí, zvaného také jako Instar I, přechází larva po určité době (jejíž délka závisí na teplotě) do druhého larválního stádia (Instar II). Vývoj dalšího stádia závisí jak na teplotě, tak na kvalitě a kvantitě krmení. Pokud ke krmení nedochází, umírají larvy během třetího nebo čtvrtého stadia. Výzkumy potvrdily, že druhé a třetí larvální stádium je mnohem citlivější než první. Je tedy nutné při opakování pokusu dodržovat přesně stanovenou teplotu, která by měla být konstantní. Při teplotě 24 °C bylo totiž pozorováno, že 60% larev přejde do stavu Instar II během 16 hodin, zatímco při teplotě pouze 20 °C byla doba přechodu do tohoto stádia zvýšena na 35 hodin<sup>[38]</sup>.

Podle Sorgeloos P. et al. (1978) je *Artemia salina* jeden z nejvíce vhodných organismů pro testy toxicity, co se týče mikroskopických bezobratlých. V jeho práci a dále v práci Vanhaeckeho P. et al. (1981) jsou zmíněna doporučení k provedení testu. Hlavní důraz při provádění testů je především kladen na původ kmene, podmínky během inkubace a líhnutí (teplota, salinita, aerace, světlo a pH), použití larev stejného vývojového stádia v rámci jednoho testu, které by se v průběhu neměly vylíhnout v jiné. Dále je nutné dbát na teplotu a salinitu média použitého během testu. Vhodné je zejména použití biotestu s žábřonožkami pouze na akutní testy toxicity a provádět jej pouze s čerstvě odlovenými nauplii. S každým testem by se měl paralelně stanovit kontrolní test s referenčním toxikantem (laurylsulfát sodný). Odchytky od těchto doporučení by vedly k použití populace s odlišnými morfologickými stadii a rozdílnou citlivostí a test by byl nehodnotitelný<sup>[38][39]</sup>.

V rámci této diplomové práce byly výše zmíněné podmínky dodrženy, jako standardní toxikant byl použit chlorid manganatý.

K testování toxicity byly zvoleny tyto tři alkaloidy: kalifornidin, papaverin a morfin. Všechny tyto organické sloučeniny obsahují v základním skeletu isochinolinovou strukturu. Jsou těžce rozpustné v mořské vodě, v jejímž prostředí celý

experiment probíhal, a proto bylo nutné použít ultrazvukovou lázeň pro jejich lepší rozpuštění.

Alkaloidy kalifornidin a papaverin byly testovány ve stejných koncentracích a to v rozmezí od 10 mM do 0,13 mM (ředily jsme geometrickou řadou s ředícím faktorem 1,5 výchozí roztoky o koncentracích 10 mM a 5 mM). Výsledkem měření jsou hodnoty letální koncentrace 24hLC<sub>50</sub>, což je koncentrace zkoušené látky mající za následek zahubení 50 % larev žábřonožky. Index 24 hodin vyjadřuje délku expozice <sup>[40]</sup>.

U kalifornidinu byla naměřena letální koncentrace 0,84 mM a u papaverinu 1,47 mM. V jiných toxikologických studiích můžeme nalézt 48hEC<sub>50</sub> (koncentrace, která zničí 50% buněk po inkubaci trvající 48 hodin) papaverinu rovnající se 23,8 μM na tyrosin-hydroxylázu pozitivních neuronech <sup>[41]</sup>, nebo údaj o 60% cytotoxicitě vůči hladkým svalovým buňkám penisu <sup>[42]</sup>.

Morfin byl nejdříve použit ve výchozí koncentraci roztoku 10 mM, což po naředění odpovídalo koncentracím od 10 mM do 0,17 mM. Protože s použitím zmíněné koncentrační řady morfinu nebylo dosaženo v podstatě žádné mortality, bylo nutné opakované testování se zvýšenou koncentrací. I přes použití koncentrací od 15 mM do 0,26 mM jsme opět padesátiprocentní mortality nedosáhly. Maximální úmrtnost larev byla pouze 20 %.

Při testování cytotoxicity morfinu vůči buňkám kloubu nebyla u 0,025% morfinu cytotoxicita zaznamenána <sup>[43]</sup>. Často je také zkoumána inhibice cytotoxicity NK buněk morfinem <sup>[44]</sup> <sup>[45]</sup>.

Grafické porovnání toxicity testovaných alkaloidů je uvedeno ve výsledkové části na obrázku 10. Z těchto výsledků je patrná vyšší toxicita kalifornidinu než papaverinu vůči *Artemia salina*. Morfin nebyl pro zmíněné výsledky do grafu zahrnut.

Rozdílnou toxicitu papaverinu a morfinu si snad lze vysvětlit jejich rozdílným mechanismem účinku. Zatímco účinek morfinu je zprostředkován jeho afinitou k morfinovým receptorům, mechanismus účinku papaverinu spočívá v inhibici fosfodiesterasy <sup>[27]</sup> <sup>[24]</sup>.

Další navýšení koncentrace morfinu a tedy možné získání kýženého výsledku nebylo pro jeho špatnou rozpustnost v mořské vodě možné provést. V rámci dalšího

testování by bylo možné použít DMSO (dimethylsulfoxid) jako kosolvens, látku zprostředkující rozpouštění. DMSO je vhodný z důvodu nízké toxicity na *Artemia salina* a neměl by mít vliv na vyhodnocování testu. <sup>[36]</sup>.

Dalším řešením by snad také mohlo být použití citlivějších vývojových stádií nauplií. To by však odporovalo výše zmíněným pravidlům o použití pouze čerstvě odlovených a stejně starých nauplií.



## 6. Závěr

Cílem této diplomové práce bylo optimalizovat metodu toxikologického screeningu alkaloidů na organismu *Artemia salina* a poté touto metodou vyhodnotit tři alkaloidy: kalifornidin, morfin a papaverin.

Larvy žábřonožky *Artemia salina* jsou organismem vhodným právě pro akutní toxikologický screening. Při testování byly použity čerstvě vylíhlé larvy odlovené do roztoků různých koncentrací zkoumané látky. Po 24 hodinách inkubace byla vyhodnocena úmrtnost larev. Protože jsou žábřonožky vodním organismem, probíhal celý pokus v prostředí mořské vody.

V mořské vodě bylo nutné rozpustit i ve vodě těžce rozpustné testované látky. K usnadnění rozpouštění byla použita ultrazvuková lázeň. Všechny tři zkoumané alkaloidy patří do skupiny isochinolinových alkaloidů a mají tedy podobnou strukturu.

Nejtoxičtější z testovaných alkaloidů byl kalifornidin, izolovaný z kalifornského máku. Naměřená hodnota letální koncentrace (24hLC<sub>50</sub>) byla **0,84 mM (0,79 – 0,88 mM)**. Jako o něco méně toxický byl vyhodnocen papaverin, který je součástí opia z makoviny *Papaver somniferum*. U papaverinu se hodnota 24hLC<sub>50</sub> rovná **1,47 mM (1,39 – 1,54 mM)**.

Z opia se také získává třetí z testovaných alkaloidů, morfin. Hodnota letální koncentrace (24hLC<sub>50</sub>) vzhledem k malé úmrtnosti larev nebyla u morfinu nalezena. Byl tedy ze všech zkoumaných látek nejméně toxický.

Za stejných podmínek jako testy s hodnocenými alkaloidy probíhal i test se standardním toxinem, chloridem manganatým.

## **7. SEZNAM ZKRATEK**

NMDA receptor	Receptor pro N-methyl-D-asparagovou kyselinu
RNA	Ribonukleová kyselina
MK	Mastné kyseliny
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
CNS	Centrální nervová soustava
cAMP	Cyklický adenosinmonofosfát
pKa	Logaritmus disociační konstanty kyselin
24hLC <sub>50</sub>	Koncentrace zkoušené látky mající za následek 50% úmrtnost testovaného organismu po 24 hodinovém působení
DMSO	Dimethylsulfoxid
48hEC <sub>50</sub>	Koncentrace zkoušené látky mající za následek 50% sledovaný efekt po 48 hodinovém působení

## 8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. SILGERNAGL, S. *Atlas patofyziologie člověka*. Praha: Grada, 2001. ISBN 80-716-9968-3.
2. ŠÍMA, Petr. Civilizační nemoci aneb Nemoci západního životního stylu - ZDN. [online]. [cit. 2014-04-22]. Dostupné z: <http://zdravi.e15.cz/clanek/priloha-lekarske-listy/civilizacni-nemoci-aneb-nemoci-zapadniho-zivotniho-stylu-447075>
3. MAČÁK, J. a MAČÁKOVÁ J. *Patologie*. Praha: Grada, 2004. ISBN 80-247-0785-3.
4. CUNNINGHAM, E. L. and PASSMORE A. P. Drug development in dementia. *Maturitas*. 2013, 76: 260-266.
5. ADINACO - Vědecký portál farmaceutické fakulty UK. [online]. [cit. 2014-03-26]. Dostupné z: <http://portal.faf.cuni.cz/Groups/ADINACO/>
6. SEDLÁK, E. *Zoologie bezobratlých*. Brno, 2002. ISBN 80-210-2892-0.
7. BEARDMORE, J. *Artemia: basic and applied biology*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2002, xv, 286 s. ISBN 1402007469.
8. Koryši (Crustacea). [online]. [cit. 2014-02-04]. Dostupné z: <http://www.zoologie.frasma.cz/mmp%20213%20korysi/kor%C3%BD%C5%A1i.html>
9. Brine Shrimp. [online]. [cit. 2014-02-26]. Dostupné z: <http://www.discusnews.com/article/cat-01/brine-shrimp.shtml>
10. BOWEN, S. T. and HANSON J. (1962). A Gynandromorph of the brine shrimp, *Artemia salina*, *Genetics*. 1962. 47(3): 277–280.
11. EMSLIE, S. Reproduction from Animal Diversity Web. *Encyclopedia of Life* [online]. [cit. 2014-02-27]. Dostupné z: [http://eol.org/data\\_objects/18634424](http://eol.org/data_objects/18634424)
12. Osmoregulation and ion transport in brine shrimp gills. [online]. [cit. 2014-02-21]. Dostupné z: <http://sites.lafayette.edu/hollidac/research/osmoregulation/brine-shrimp-gills/>

13. TACKAERT, W. and SORGELOOS P. The Use of Brine Shrimp *Artemia* in Biological Management of Solar Saltworks, *Seventh Symposium on Salt*, 1993, 1: 617-622.
14. Artemia World. [online]. [cit. 2014-02-20]. Dostupné z: <http://www.artemiaworld.com/home/index.php?lng=cz>
15. DVOŘÁK, P. a kol. Use of the Crustacean *Artemia franciscana* for Alternative Biotests. *Acta Veterinaria*. 2010, 79: 47-53.
16. KRMENČÍK, P. a KYSILKA J. Toxikon - alkaloidy. [online]. [cit. 2014-03-03]. Dostupné z: <http://www.biotox.cz/toxikon/rostliny/alkaloidy.php>
17. BŘÍŽDALA, J. Alkaloidy. [online]. [cit. 2014-03-03]. Dostupné z: <http://www.e-chembook.eu/cz/biochemie/alkaloidy>
18. SUCHÝ, V. *Farmakognosie: Část všeobecná*. Brno: Univerzita Komenského, 1994. ISBN 9788022307284.
19. JAHODÁŘ, L. *Farmakobotanika: semenné rostliny*. Praha: Karolinum, 2006. ISBN 80-246-1225-9.
20. Spartein – Wikipedia. [online]. [cit. 2014-03-03]. Dostupné z: <http://de.wikipedia.org/wiki/Spartein>
21. WENKE, M. *Farmakologie: učebnice pro lékařské fakulty*. Praha: Avicenum, 1990. ISBN 80-201-0028-8.
22. Benzylisochinolinové alkaloidy | Velký lékařský slovník On-Line. [online]. [cit. 2014-03-05]. Dostupné z: <http://lekarske.slovníky.cz/lexikon-pojem/benzylisochinolinove-alkaloidy>
23. SUCHÝ, V. *Farmakognosie: Část speciální I*. Brno: Univerzita Komenského, 1994. ISBN 80-223-0727-0.
24. DOLEŽAL, M. *Farmaceutická chemie léčiv působících na autonomní nervový systém*. Praha: Univerzita Karlova, 134 s. ISBN 978-802-4616-339.

25. KUBÍČEK, V. Léčba erektilní dysfunkce 2005 (2) :: ČESKÁ SPOLEČNOST PRO SEXUÁLNÍ MEDICÍNU. [online]. [cit. 2014-03-05]. Dostupné z: <http://www.cssmweb.cz/news/lecba-erektilni-dysfunkce-2005-2/>
26. Papaverine - PubChem. [online]. [cit. 2014-03-05]. Dostupné z: [http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?sid=160964447&loc=es\\_rss#x94](http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?sid=160964447&loc=es_rss#x94)
27. HARTL, J. a PALÁT K. *Farmaceutická chemie II*. Dotisk. Praha: Karolinum, 1997. ISBN 978-807-0668-344.
28. ROBERTSON, S. Morphine Uses. [online]. [cit. 2014-03-06]. Dostupné z: <http://www.news-medical.net/health/Morphine-Uses.aspx>
29. Morphine - PubChem. [online]. [cit. 2014-03-06]. Dostupné z: <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=5288826#x94>
30. Berberine - Wikipedia, the free encyclopedia. [online]. [cit. 2014-03-05]. Dostupné z: <http://en.wikipedia.org/wiki/Berberine>
31. PORUBA, M. *Biologicky aktivní metabolity rostlin V.: Alkaloidy Eschscholtzia californica CHAM a jejich biologická aktivita*. Olomouc, 2012. Rigorózní. Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Fakulta farmaceutické botaniky a ekologie.
32. Californidine - Wikipedia, the free encyclopedia. [online]. [cit. 2014-03-10]. Dostupné z: <http://en.wikipedia.org/wiki/Californidine>
33. ABASCAL, K. a YARNELL E. Nervine Herbs for Treating Anxiety. *Alternative & Complementary therapies*. 2004.
34. NUNES, B. S. et al. Use of the genus Artemia in ecotoxicity testing. *Environmental Pollution*. 2006, 144: 453-462.
35. Standardní operační postup Laboratoře ekotoxikologie a LCA. [online]. [cit. 2014-03-13]. Dostupné z: [http://www.vscht.cz/uchop/udalosti/skripta/15r/AkutnitestArtemia.htm#\\_ftn1](http://www.vscht.cz/uchop/udalosti/skripta/15r/AkutnitestArtemia.htm#_ftn1)

36. SKLENÁŘ, Z. a kol. Možnosti využití biotestu s *Artemia salina* při studování toxikologických účinků inhibitorů cyklindependentních kináz. *Klin Farmakol Farm.* 2006, 20: 62-65.
37. DOLEŽALOVÁ WEISSMANNOVÁ, H. a kol. Stanovení toxicity "MUSK" sloučenin s využitím alternativních testů ekotoxicity. *Chem. Listy.* 2013, 107: 172-177.
38. SORGELOOS, P. et al. The Use of *Artemia* Nauplii for Toxicity Tests - A Critical Analysis. *Ecotoxicology and environmental safety.* 1978, 2: 249-255.
39. VANHAECKE, P. et al. Proposal for a Short-Term Toxicity Test with *Artemia* Nauplii. *Ecotoxicology and environmental safety.* 1981, 5: 382 - 387.
40. HORÁK, J. a kol. *Úvod do toxikologie a ekologie pro chemiky.* Praha: VŠCHT, 2004. ISBN 80-708-0548-X.
41. GOTO, K. et al. Neurotoxic effects of papaverine, tetrahydropapaverine and dimethoxyphenylethylamine on dopaminergic neurons in ventral mesencephalic-striatal co-culture. *Brain Research.* 1997, 754: 260-268.
42. RAJASEKARAN, M. et al. Vasoactive Agents Induce Cytotoxicity in Cultured Human Penile Smooth Muscle Cells. *Urology.* 2002, 59: 155-158.
43. HAASTER, F. et al. Bupivacaine, ropivacaine, and morfine: comparison of toxicity on human hamstring-derived stem/progenitor cells. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2011, 19: 2138 – 2144.
44. YAGER, M. P. et al. Morphine Inhibits Spontaneous and Cytokine-enhanced Natural Killer Cell Cytotoxicity in Volunteers. *Anesthesiology.* 1995, 83: 500 – 508.
45. BORMAN, A. et al. Small doses of morphine can enhance NK cell cytotoxicity in pings. *International imunofarmacology.* 2009, 9: 277 – 283.

# **ABSTRAKT**

Univerzita Karlova v Praze  
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové  
Katedra farmaceutické botaniky a ekologie

Kandidát: Barbora Balíková  
Školitel: RNDr. Jitka Vytlačilová, Ph.D.  
Název diplomové práce:

## **Hodnocení alkaloidů pomocí *in vivo* testů s *Artemia Salina***

Alzheimerova choroba je nejčastější příčinou demence a řadí se mezi civilizační onemocnění. Protože je doposud dostupná pouze omezená symptomatická léčba a výskyt civilizačních onemocnění (a tedy i Alzheimerovy choroby) v posledních desetiletích stoupá, je potřeba hledat nové látky účinné při léčbě tohoto onemocnění.

Součástí výzkumu každé látky je toxikologický screening, jenž byl naším úkolem. K hodnocení akutní toxicity se jako vhodný organismus jeví žábřonožka *Artemia salina*, která byla použita i v experimentu pro účely této práce. Pokus byl prováděn v miniaturizovaném prostředí.

Testovány byly tři látky patřící mezi isochinolinové alkaloidy: kalifornidin, papaverin a morfin.

Jako nejtoxičtější byl vyhodnocen alkaloid kalifornidin, menší toxicitu měl alkaloid papaverin. Morfin se při použití stejné metodiky a podobných koncentrací jako v případě kalifornidinu a papaverinu jevil v podstatě jako netoxický.

# **ABSTRACT**

Charles University in Prague  
Faculty of Pharmacy in Hradec Králové  
Department of Pharmaceutical Botany and Ecology

Candidate: Barbora Balíková  
Consultant: RNDr. Jitka Vytlačilová, Ph.D.  
Title of diploma thesis:

## **The evaluation of alkaloids using *in vivo* tests with *Artemia salina* I.**

Alzheimer's disease is the most common cause of dementia and it is one of the lifestyle diseases. There is so far available only limited symptomatic treatment and the occurrence of the lifestyle diseases (and thus Alzheimer's disease) is increasing in recent decades. Therefore it is necessary to find new compounds which will be effective in the treatment of this disease.

Toxicological screening - which was our task - is the part of the research of each substance. For the evaluation of the acute toxicity appears as a suitable organism brine shrimp *Artemia salina*, which was used in the experiment for the purposes of this work. The experiment was conducted in a miniaturized environment.

There were tested three substances belonged to the isoquinoline alkaloids: californidine, papaverine and morphine.

As the most toxic was evaluated alkaloid californidine, alkaloid papaverine had less toxicity. Morphine appeared essentially as nontoxic with using the same methodology and similar concentrations as in the case of californidine and papaverine.