

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

DIPLOMOVÁ PRÁCE

**Studium biologické aktivity alkaloidů izolovaných z *Fumaria officinalis* L.
(*Fumariaceae*) I.**

**Study of biological activity of alkaloids isolated from *Fumaria officinalis* L.
(*Fumariaceae*) I.**

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

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

Hradec Králové, 2014

Jan Kostelník

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.

V Hradci Králové, 2014

.....

Podpis

OBSAH

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	6
1 ÚVOD	8
2 CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE	9
3 TEORETICKÁ ČÁST	10
3.1 Alzheimerova choroba	10
3.1.1 Epidemiologie a klinický obraz	10
3.1.2 Etiopatogeneze	11
3.1.2.1 Neuronální klubka	11
3.1.2.2 Amyloid- β -protein	11
3.1.2.3 Apolipoprotein E	13
3.1.2.4 Zánětlivé mechanismy	14
3.1.2.5 Oxidační stres	15
3.1.3 Léčba AD	15
3.1.3.1 Terapie podle EBM	16
3.1.3.1.1 AChE a BuChE v souvislosti s AD	16
3.1.3.1.2 Inhibitory cholinesteras	16
3.1.3.1.3 Inhibitory glutamátergních receptorů	20
3.1.3.2 Farmakoterapeutický přístup, který není podle EBM	21
3.1.3.3 Perspektivní přístupy ve vývoji nových léčiv	22
3.1.3.3.1 Ovlivnění aktivit sekretas	22
3.1.3.3.2 Zamezení agregace β A	22
3.1.3.3.3 Imunoterapie	23
3.1.3.3.4 Zamezení degradace τ -proteinu	23
3.1.3.3.5 Prevence τ -oligomerizace	23
3.1.3.3.6 Specifická mitochondriální terapie	24
3.1.3.3.7 Inhibice prolyloligopeptidasy	24
3.2 <i>Fumaria officinalis</i> L. (<i>Fumariaceae</i>)	26
3.2.1 Taxonomické zařazení	26
3.2.2 Botanická charakteristika čeledi	27
3.2.3 Botanická charakteristika rodu	27
3.2.4 Morfologický popis	27
3.2.5 Stanoviště a rozšíření	28
3.2.6 <i>Fumaria officinalis</i> jako léčivá rostlina	28

3.2.7 Obsahové látky a jejich biologická aktivita	28
3.2.7.1 Fenolické sloučeniny	29
3.2.7.2 Alkaloidy	29
3.2.7.2.1 Protoberberinové alkaloidy	31
3.2.7.2.2 Benzofenanthridinové alkaloidy	33
3.2.7.2.3 Protopinové alkaloidy	34
3.2.7.2.4 Aporfinové alkaloidy	35
3.2.7.2.5 Spirobenzylisochinolinové alkaloidy	36
3.2.7.2.6 Ftalidisochinolinové alkaloidy	37
3.2.7.2.7 Indenobenzazepinové alkaloidy	38
3.2.7.2.8 Inhibiční aktivita AChE a BuChE vyvolaná alkaloidy z rodu <i>Fumaria</i>	39
4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	41
4.1 Materiál a vybavení	41
4.1.1 Chemikálie a rozpouštědla	41
4.1.2 Pomocné látky	41
4.1.3 Chromatografické adsorbenty	41
4.1.4 Detekční činidla	41
4.1.5 Přístrojové vybavení	42
4.1.6 Chemikálie a materiál, které byly použity pro stanovení inhibiční aktivity erytrocytární AChE a sérové BuChE	42
4.1.7 Chemikálie a materiál, které byly použity pro stanovení inhibiční aktivity POP	43
4.1.8 Přístroj pro stanovení cholinesterasové inhibiční aktivity	43
4.1.9 Přístroj pro stanovení POP inhibiční aktivity	43
4.2 Všeobecné postupy	43
4.2.1 Destilace rozpouštědel a odpařování	43
4.2.2 Chromatografie	43
4.2.2.1 Sloupcová chromatografie	43
4.2.2.2 TLC	44
4.2.2.3 Příprava desek pro preparativní TLC	44
4.2.2.4 Detekce	44
4.2.3 Teplota tání	44
4.2.4 GC-MS analýza	44
4.2.5 NMR analýza	45
4.2.6 Příprava erytrocytárních pouzder	45
4.3 Izolace alkaloidů z <i>Fumaria officinalis</i>	46
4.3.1 Separace alkaloidů z frakce č. 55 – 67	46
4.3.3.1 Čištění frakce č. 55-67 a její následné dělení na suchém sloupci	48

4.3.3.2 Zpracování jednotlivých podfrakcí	49
□ <i>spojené podfrakce č. 7-9</i> (0,105 g)	49
□ <i>spojené podfrakce č. 10-12</i> (0,153 g)	49
□ <i>spojené podfrakce č. 13-32</i> (0,925 g)	49
□ <i>spojené podfrakce č. 33-35</i> (0,147 g)	49
□ <i>spojené podfrakce č. 36-49</i> (3,996 g)	50
4.4 Stanovení inhibičních aktivit izolovaných alkaloidů	52
4.4.1 Stanovení cholinesterasové inhibiční aktivity	52
4.4.2 Stanovení prolyl oligopeptidasové inhibiční aktivity	52
5 VÝSLEDKY	54
5.1 Strukturní analýza (-)-stylopinu (JK-1)	54
5.1.1 MS (-)-stylopinu	54
5.1.2 NMR (-)-stylopinu	54
5.2 Strukturní analýza (-)-sinaktinu (JK-2)	56
5.2.1 MS (-)-sinaktinu	56
5.2.2 NMR (-)-sinaktinu	57
5.3 Strukturní analýza (-)-<i>O</i>-methyلفumarofycinu (JK-3)	58
5.3.1 MS (-)- <i>O</i> -methyلفumarofycinu	58
5.3.2 NMR (-)- <i>O</i> -methyلفumarofycinu	59
5.4 Specifická optická otáčivost	60
5.5 Teploty tání	61
5.6 Výsledky inhibičních aktivit	61
6 DISKUZE	62
7 ABSTRAKTY	64
8 CITACE	66

Seznam použitých zkratek

Aβ	β -amyloid
Ach	acetylcholin
AChE	acetylcholinesterasa
AD	Alzheimerova choroba
ApoE	apolipoprotein E
APP	amyloidní prekurzorový protein
ATP	adenosintrifosfát
BuChE	butyrylcholinesterasa
CNS	centrální nervová soustava
DEA	diethylamin
DMSO	dimethylsulfoxid
EBM	medicína založená na důkazech
EtOH	ethanol
FO	<i>Fumaria officinalis</i> L.
GABA	gama-aminomáselná kyselina
GC	plynová chromatografie
GSK-3β	glykogen syntthesa-kinasa-3 β
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
Hsp 90	protein teplotního šoku 90
Hup A	huperzin A
CHCl₃	chlofoform
IC	inhibiční koncentrace
LB	lékařský benzín
Mr	molekulární hmotnost
MS	hmotnostní spektrometrie
NFTs	neurofibrillary tangles
NGF	růstový nervový faktor
NMR	nukleární magnetická rezonance
PAF	plateled-activating factor
POP	prolyloligopeptidasa
PS1	presenelin gen 1

rAGE	receptor koncových produktů pokročilé glykace
Rf	retenční faktor
To	toluen
TLC	tenkovrstvá kapalinová chromatografie
UV	ultrafialová oblast

1 ÚVOD

Isochinolinové alkaloidy vykazují široké spektrum biologických aktivit včetně toxických. Jako potenciálně terapeuticky využitelné u AD se jeví jejich inhibiční aktivita k enzymům v centrálním nervovém systému, obzvláště enzymů zvyšující hladinu biogenních aminů – AChE a BuChE. Alkaloidy, jako inhibitory cholinesteras, byly nalezeny v taxonech patřící nejen do *Fumariace*, ale zejména v čeledích *Papaveraceae*, *Ranunculaceae*, *Rutaceae*, *Amaryllidaceae*, *Berberidaceae* a *Menispermaceae*¹.

Současná farmakoterapie AD však neumožňuje kauzální terapii. Dochází tak pouze ke zpomalení nástupu pozdějších stádií a průběhu demence, nikoli však k plnému vyléčení. V současné době jsou inhibitory cholinesteras stále intenzivně zkoumány, protože spektrum používaných inhibitorů cholinesteras je relativně úzké, v praxi se de facto používají jen látky galanthamim, rivastigmin a donepezil, v klinické fázi testování se jeví jako perspektivní látka huperzin A, která byla izolována z *Huperzia serrata* Thunb. (*Huperziaceae*)².

Inhibitory cholinesteras jsou stále „zlatými standardy“ v terapii AD (podle EBM), navíc v nedávné době bylo u některých těchto látek zjištěno, že kromě jejich účinků na cholinesterasy mají i další biologické aktivity, které mohou pozitivně ovlivňovat průběh AD. Nedávno bylo zjištěno, že některé inhibitory AChE inhibují i BuChE, což je žádoucí, neboť v průběhu AD postupně klesá aktivita AChE, a naopak stoupá aktivita BuChE. BuChE se v pozdním stádiu stává predominantní enzymem štěpící acetylcholin. Výzkum nových léčiv na AD se nezaměřuje jen na hledání inhibitorů cholinesteras, ale i látky slibující kauzální léčbu např. inhibitory sekretas, τ -proteinu, zamezení degradace τ -proteinu, případně aditivní biologickou aktivitu, kde se mohou zkoumané látky projevit jako např. látky inhibující prolyloligopeptidasu, která hraje roli v procesu paměti a učení³.

Fumaria officinalis L. (česky známá jako zeměděm lékařský) je lékopisná rostlina, která je známá a používána pro svůj cholagogenní účinek. V nedávné době bylo zjištěno, že v rámci screeningu, alkaloidní extrakty z taxonů rodu *Fumaria* vykazují inhibiční aktivitu vůči AChE i BuChE. Při hledání potenciálních inhibitorů cholinesteras na katedře Farmaceutické botaniky a ekologie FaF UK, alkaloidní extrakt z FO vykazoval cholinesterasovou inhibiční aktivitu².

Incidence i prevalence u AD roste s věkem. Léčba AD, nejčastější formy demence, je v dnešní době stále aktuálnější tématem, už proto, že jejím hlavním rizikovým faktorem je věk. Současná populace stárne a neexistují v podstatě žádné studie, které by v budoucnu předpokládali jiný progres. Proto je nutné se tímto problémem zabývat a neustále hledat terapeutické možnosti pro léčbu či zlepšení kvality života u pacientů postižených AD⁴.

2 CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE

Cíle diplomové práce:

1. izolace nejméně jednoho až dvou alkaloidů z vybrané frakce získané sloupcovou chromatografií sumárního diethyletherového alkaloidního výtřepku z *F. officinalis* připraveného D. Kassemovou a M. Šafratovou⁵, pomocí běžných chromatografických metod (sloupcová chromatografie, preparativní TLC, případně semipreparativní HPLC),
2. stanovení fyzikálně-chemických vlastností izolovaných alkaloidů (optická otáčivost, teplota tání) a struktury MS a NMR analýzou,
3. stanovení biologické aktivity izolovaných látek in vitro (IC_{50}) vůči lidských cholinesterasám (AChE a BuChE) a prolyloligopeptidase POP.

3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Alzheimerova choroba

AD je primární neurodegenerativní onemocnění neznámě etiopatogeneze, při kterém dochází k porušení mnoha vyšších kortikálních funkcí (chápání, počítání atd.). Vědomí zastřeno není⁶.

3.1.1 Epidemiologie a klinický obraz

Prevalence demencí se počínaje 62,5 rokem věku (kdy činí 0,7 %), každých pět let zdvojnásobuje, a však prevalence u AD se zdvojnásobuje každých 4,5 roku a tvoří přibližně dvě třetiny všech demencí. Ve věku nad 65 let trpí AD přibližně 10 % populace, u věkové populace nad 85 let postihuje tato choroba necelou polovinu populace. Ve vyšším věku jsou ženy postiženy dvakrát častěji než-li muži⁷. Jako signifikantní rizika pro vznik AD lze označit věk, familiární agregace případů genové mutace, přítomnost alely eta-4 genu pro apolipoprotein E⁸. Jako možné riziko pro vznik AD lze také označit kraniocerebrální poranění, nízká úroveň vzdělání. Vztah mezi AD, kouřením cigaret, hliníkem, zinkem, vyšší hladinou sérového homocysteinu a protizánětlivě působícími léky není vyjasněn⁹.

Příznaky onemocnění se projevují nenápadně, pomalu a postupně. Tyto příznaky je velmi obtížně odlišitelné od klinického stárnutí mozku. Doba, po kterou trvá preklinické stádium nemoci, není zatím přesně známa. Předpoklad je, že rozvoj choroby do prvních signálních příznaků trvá několik let¹⁰. Do signálních příznaků řadíme poruchy recentní epizodické paměti (charakteristické zapomínáním každodenních činností). V pozdějších stádiích se AD projevuje postižením těchto funkcí: poznávací, vykonávat běžné aktivity spjaté s každodenní činností člověka, a postižením spánku, chování a emotivity. Dále v těchto stádiích dochází také k poruše nekognitivních funkcí a vzniku depresí, halucinací, paranoidních bludů a větší míře ke zvýšené agresivitě vůči okolí^{9,11,12}. Doba přežití od objevení se prvních příznaků do exitu pacienta je v průměru udávána od 6 do 8 let. Ve výjimečných případech dochází k úmrtí do 3 let³⁷.

3.1.2 Etiopatogeneze

Jasně příčiny AD nejsou doposud objasněny. AD se popisuje na podkladě mikroskopických a patogenetických změn při stárnutí mozku a etiopatogenezi lze pouze objasnit.

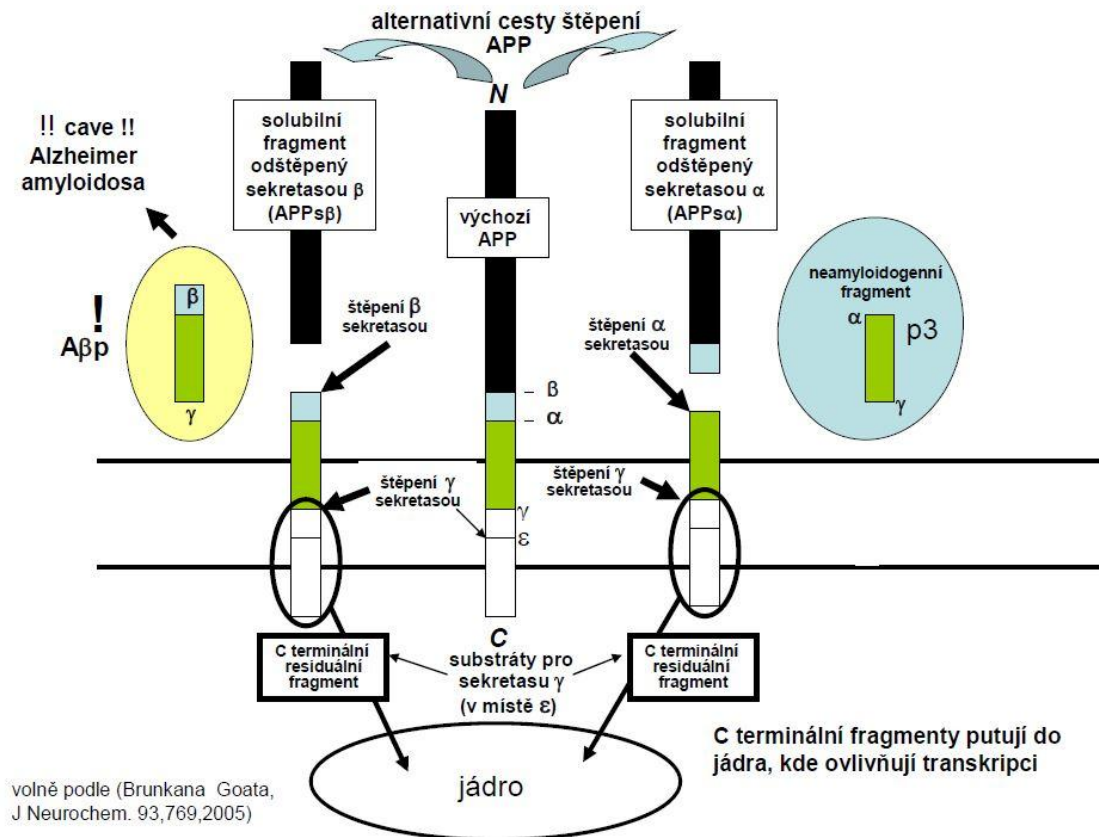
3.1.2.1 Neuronální klubka

Neurofibrilární klubka (NFTs), jsou Alzheimerův objev a jsou synonymem klasického pojmu Alzheimerovy změny neurofibril³. NFTs, u AD nazývané tautopatie, prostupují cytoplazmu neuronu. Tato klubka jsou tvořena dvěma párově spirálovitě stočenými vlákny, která se stáčí tak, že se vzájemně nekříží¹³. Párová spinální vlákna dopravuje do periferie axonální tok¹⁴. Podstatnou složkou těchto vláken je τ -protein, který se charakterizuje jako protein s nízkou molekulární hmotností asociovaný s mikrotubuly¹⁵. V mozku se τ -protein vyskytuje v 6 isoformách. τ -protein po navázání na tubulin mikrotubulů započne jejich polymerizaci. Jakmile je defosforylován, stabilizuje je. V párových spinálních vláknech má τ -protein vyšší molekulární hmotnost podmíněnou nadměrnou fosforylací. Míra fosforylace je podmíněna enzymy, které jsou zodpovědné za dodávku a degradaci fosfátových zbytků¹⁶. τ -protein je velmi dobře rozpustný, naopak jeho hyperfosforylovaná forma je nerozpustná. Tato forma nemá afinitu k mikrotubulům, a samovolně je spojována do α helixu. Jejich počet značí závažnost AD. Agregované molekuly τ -proteinu mají cytotoxické účinky a negativně ovlivňují kognitivní funkce.¹⁷

3.1.2.2 Amyloid- β -protein

Jako při jiné amyloidóze, tak i zde dochází k ukládání abnormálních vláknitých proteinů extracelulárně i intracelulárně. β -amyloid (β A) je tvořen 39-43 aminokyselin¹⁸. Je součástí amyloidních senilních plaků a ve stěnách cév, které se účastní mozkové amyloidní angiopatie. β A je produktem proteolýzy, který je tvořen hlavně z amyloidového prekursorového proteinu (APP)¹⁹.

APP je transmembránový protein, jehož struktura je podobná membránovému receptoru. Skládá se z 695-770 AMK. Tento protein je velmi variabilní. Variabilita je dána nestříhovými variantami (vystřížení exonů 7, 8, 15 v různé kombinaci)¹⁷. APP tvoří tři základní isoformy APP_{695/751/770}. APP 695 je považován za neuronální isoformu. APP 751/770 jsou primárně koncentrovány v nonneuronálních elementech (tkáň svalová, aorta, pankreas, leukocyty)²⁰. V mozkové tkáni jsou tyto isoformy převážně součástí glií, jejich sekretorická forma APP má neuroprotektivní a neurotropní účinky. Funkce APP v neuronech je spjata s přenosem vzruchu a protekcí neuronů před inzulty nejružnějšího původu.²¹



Obr. 1 Typy proteolytické degradace APP. Vlevo proces vedoucí k deposici amyloidu (aktivita β- a γ-sekretasy), vpravo proces, který je považován za prevenci amyloidní deposice (aktivita α-sekretasy)¹⁸

Mimo transmembránové formy APP existuje i jeho fyziologická forma sekreční (sAPP). Tato forma vzniká dvěma cestami a to odštěpením celé pericelulární části lokalizovaného APP, nebo v průběhu sekretorické cesty. Veškerá tato proteolytická úprava je zprostředkována třemi proteasami, nazývanými sekretasy (α-, β-, γ-sekretasa) znázorněno v obr. 1. α-Sekretasa a β-sekretasa odštěpují extracelulární část APP od části transmembránové, čímž vedou ke vzniku sekretorických forem. α-Sekretasa štěpí APP zhruba uprostřed kritického amyloidogenního úseku a za fyziologických podmínek jsou z APP odštěpovány rozpustné peptidy o délce 39 AMK, které jsou neškodné. Její aktivita je velmi dobrou prevencí proti vzniku celistvého amyloidogenního βA. Variantní úprava zbylého peptidu z APP je zprostředkována β-sekretasou, zejména v kombinaci s γ-sekretasou a to tak, že vyštěpí kritický amyloidogenní βA segment. Poměr mezi fyziologickou (α úprava) a ostatními variantními amyloidogenními úpravami je za určitých okolností proměnný. U AD však převažuje aktivita β-sekretasy¹⁶. Tento nerovnovážený děj způsobuje akumulaci Aβ.

Nadbytek A β může být zahajovacím faktorem AD. Také se u 90 % případů AD prokazuje mozková amyloidová demence¹⁸.

U cerebrální amyloidosy jde obecně o spontánní proces, který probíhá trvale v menší intenzitě v dospělém věku. Ve stáří má progredující subklinický potenciál k amyloidním depositům v tzv. senilních placích a v cévách¹⁸. Tento proces může být potencován celou řadou činitelů a může vést k progresivní destrukci neuronálních a cévních částí lidského organismu. Faktory, které zvětšují vliv β A můžeme rozlišit na geneticky podmíněné a geneticky nepodmíněné¹⁶.

Geneticky nepodmíněné faktory jsou spjaty se stavem, který nazýváme buněčný stres. Souhrnně jde o ischemii, stavy spojené s traumatem mozku, energetickou deprivací různé etiologie. Také ale jde o faktory lokálního charakteru jako změny pH, vliv iontů těžkých kovů, při kterých dochází k aktivaci štěpení β -sekretasou. Velmi významným negativním faktorem je také vliv různých isoform apoE4. Kumulace těchto faktorů je pravděpodobně podkladem procesu amyloidní depozice související s věkem^{16,22,23}.

Mezi geneticky podmíněné faktory patří zejména preseneliny. Preseneliny jsou transmembránové ubikviterní proteiny o doposud ne zcela objasněné funkci. Jako společného jmenovatle všech těchto stavů lze označit zvýšení produkce β A a to hlavně řetězce o 42 AMK, vystupňovaný zejména u geneticky podmíněných forem nemoci a přítomností faktorů usnadňujících jeho fibrilární agregaci^{16,18}.

3.1.2.3 Apolipoprotein E

Apolipoprotein E (ApoE) je transportní protein, který je tvořen 299 AMK. Molekulární hmotnost je 33 kDa. ApoE se vyskytuje v mnoha orgánech, ale nejvyšší aktivitu má v mozku a v játrech. Nonneurální buňky, hlavně astrocyty a do určité míry mikroglie, jsou hlavními buňkami, které zodpovídají za expresi ApoE v mozku. ApoE má funkci jako ligand v receptorem zprostředkované endocytóze lipoproteinových částic²⁴ a účastní se tak redistribuce lipidů. Protilátky proti ApoE označují senilní plaky i cévy. Gen pro ApoE se vyskytuje ve třech alelách, které kódují tři isoformy (ApoE2 přítomný u 7-8 % populace, ApoE3 u 77-78 %, ApoE4 u 16-17%)²⁵.

Ačkoliv ApoE tvořen tolika různými isoformami, existují přesvědčivé důkazy o fyzikální interakci mezi ApoE4 a β A v souvislosti s AD. Na podkladě silné asociace mezi ApoE a β A v mozku byla dokázáno, že ApoE má funkci jako β A vázající protein, který vyvolává konformační změnu β A. Isoforma ApoE4 má na tento proces největší vliv a urychluje ukládání β A do plaků.

Nosičství genu pro ApoE4 je význačným rizikovým faktorem pro vznik AD. Toto riziko je nejvíce významné v populaci mezi 61-65 lety, v případě že jsou nosičem jen jedné alely. Naopak pokud jsou nosičem obou alel, je velice pravděpodobné, že onemocní dříve, než ti kteří jsou nosičem jedné, nebo žádné alely. ApoE4 zvyšuje pravděpodobnost výskytu, vzniku, aterosklerózy, cerebrovaskulární ischemie. Tyto rizikové faktory jsou velmi významné v souvislosti výskytu AD. ApoE4 váže A β rychleji, což může vést ke zvýšení tvorby amyloidních plaků, depozit²⁶.

3.1.2.4 Zánětlivé mechanismy

Řada důkazů poukazuje na to, že zánět má přímou souvislost s etiopatogenezí AD. Zánětlivé komponenty, které jsou spojeny s AD, zahrnují mozkové buňky, jako jsou astrocyty a mikroglie, klasické a alternativní dráhy komplementového systému, pentraxinové proteiny akutní fáze, nikotin-acetylcholinové receptory, receptory PPAR- α , cytokiny a chemokiny²⁷. U β A bylo prokázáno, že sám působí jako zánětlivý činitel a způsobuje aktivaci mnoha zánětlivých složek.

Jako hlavní činitele zánětlivého procesu u AD lze označit astrocyty a mikroglie²⁸. Mikroglie jsou buňky, které chrání a podporují neurony a působí jako imunokomponentní buňky. Mikroglie hrají hlavní úlohu v buněčné odpovědi na patologické léze, jaké jsou β A, nebo neurotoxické plaky. Expozice mikroglíí k β A způsobuje aktivaci mikroglíí, což vede ke zvýšené povrchové expresi MHC II spolu se zvýšenou sekrecí zánětlivých komponentů jako jsou cytokiny IL-1, IL-6, TNF- α a chemokiny IL-8, makrofágový zánětlivý protein-1(MIP-1)²⁹. β A aktivace mikroglie je zprostředkována receptorem pro pokročilé glykace konečných produktů a faktorem stimulující makrofágové kolonie (M-CSF)³⁰. Tyto receptory mohou vázat β A a spustit signály, které vedou k buněčné aktivaci. Přítomnost takto aktivovaných mikroglíí v okolí β A plaků poukazuje na fagocytární úsilí mikroglie tento plak odstranit. Spolu s fagocytózou může β A zvyšovat syntézu oxidu dusnatého v mikroglíích, což zapříčiňuje ztrátu vybraných populací neuronů. Tento děj vyúsťuje v neuronální poškození způsobené produkty, které jsou uvolňovány z aktivovaných mikroglíí³¹.

Roli astrocytů, v zánětlivých procesech spojených s AD, je obtížné jednoznačně určit. Senilní plaky u AD jsou spjaty s reaktivními astrocyty³² a s astrocyty na β A depozitech. Bylo prokázáno, že vylučují mnoho zánětlivých komponent, jako jsou interleukiny, prostaglandiny, leukotrieny, tromboxany, proteasy a inhibitory proteas. Hromadění astrocytů kolem β A deposit může aktivovat astrocyty navozenou fagocytózu β A, a být tak součástí etiopatogeneze

AD. Chemokiny, které vyprodukují astrocyty, jsou atraktivní pro mikroglie, jenž dále zvyšují produkci zánětlivých komponent a zvětšují tak neuronální poškození buněk^{33,34}.

3.1.2.5 Oxidační stres

V patogenezi AD se může uplatňovat vliv volných radikálů a reaktivních forem kyslíku - oxidativní stres. Reaktivní formy kyslíku jsou tvořeny jak volnými radikály (superoxid $O^{\cdot-}$, hydroxyl HO^{\cdot} , peroxy ROO^{\cdot} , hydroperoxy HO_2^{\cdot} , alkoxy RO^{\cdot} , oxid dusnatý NO^{\cdot}), ale také i neutrálními molekulami s velkým oxidačním potenciálem (peroxid vodíku H_2O_2 , ozon O_3 , singletový kyslík 1O_2)³⁵.

Reaktivní formy kyslíku, podle současných studií, mohou navodit mitochondriální dysfunkci, která jak se předpokládá, je iniciátorem pro vznik degenerativních onemocnění. Takto navozená mitochondriální dysfunkce oxidačním stresem může navozovat vznik AD u pacientů s predispozicí – poruchami genů na chromozomu 21 (genu pro APP), chromozomu 14 (PS1, presenelin 1 gene) a chromozomu 1 (PS2) nebo nosičstvím genu pro apolipoprotein E na 19 chromozomu^{2,36}.

Oxidační stres je také spojen s nadměrnou aktivací glutamátových receptorů. Glutamát a jemu podobné AMK jsou chápány jako hlavní excitační nervové přenašeče. Excitotoxická stimulace synapsí spojených s glutamátem se považuje za součást patogeneze degenerativních onemocnění a tím i AD³⁷. Jako důkaz přímého poškození neuronů oxidačním stresem prof. Markesbery ve své práci označil zvýšenou přítomnost iontů Fe, AL a Zn. V těchto mozcích pacientů byla zjištěna vyšší míra poklesu množství nenasycených mastných kyselin, peroxidace lipidů^{3,33}.

3.1.3 Léčba AD

Přesná etiopatogeneze není v známá, a tak kauzální terapie není v současnosti možná. Proto se v současnosti používaná farmakoterapie omezuje na ovlivnění etiopatogenetických řetězců, které jsou známé³. Farmakoterapie AD lze rozdělit podle toho, jakou poruchu ovlivňuje. A to farmakoterapii kognitivních a nekognitivních poruch. Nejbližší ke kauzální terapii má farmakoterapie kognitivních poruch (poruchy paměti, intelektu, motivace aj.)³⁷. Základem této terapie jsou inhibitory cholinesteras (kognitiva) a inhibitory NMDA receptorů. Kognitiva jsou terapeutika pozitivně působící na centrální acetylcholinergní systém. Další metody farmakoterapie lze označit jako aditivní. Patří sem podávání prekurzorů acetylcholinu, látek zvyšujících vstup prekurzorů acetylcholinu do neuronu, použití nootropik a protizánětlivá léčba.

Tato aditivní farmakoterapie nemá však jednoznačné výsledky, anebo chybí dostatečné údaje o její účinnosti.

3.1.3.1 Terapie podle EBM

3.1.3.1.1 AChE a BuChE v souvislosti s AD

AChE a BuChE jsou enzymy, které velmi rychle rozkládají hydrolýzou acetylcholin na kyselinu octovou a cholin. Cholin se po té vrací do presynaptického neuronu, kde se účastní znovu tvorby acetylcholinu. Kyselina octová se nové syntézy acetylcholinu neúčastní³⁸.

V lidském mozku jsou přítomny 2 formy AChE: majoritní tetrametr G4 a minoritní monomer G1. U AD významně roste podíl monomeru G1. Tyto monomery mají podobné katalytické vlastnosti, ale liší se oligomerní strukturou a způsobem vazby na povrch buňky. Acetylcholinesterasy jsou v mozковém kortexu distribuovány i mimo cholinergní vlákna a podílejí se na vzniku a toxicitě β A^{4,37}.

Kromě cholinergních synapsí v CNS se AChE nachází v nervosvalových spojeních a na membránách červených krvinek kde tvoří antigen skupiny Yt. AChE má velmi vysokou katalytickou aktivitu a katalyzuje i transacetylace^{39,37}.

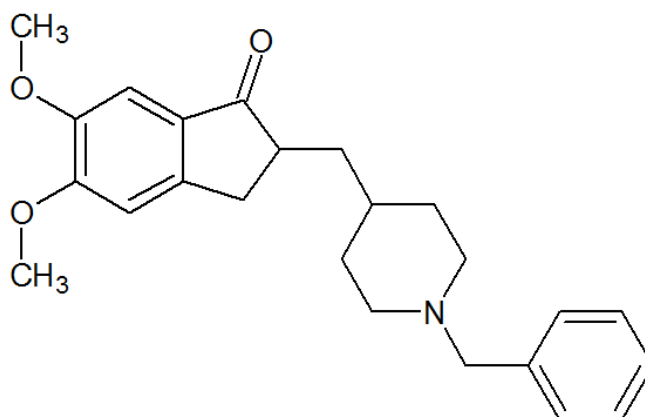
BuChE je široce rozšířena ve tkáních a v plazmě. Nejvíce aktivní je BuChE v játrech, kde je syntetizována a vylučována do plazmy, dále v srdci, ledvinách plicích. Kde je součástí většiny buněk, mimo červených krvinek. Hydrolyzuje butyrylcholin a v menší míře acetylcholin. Mimo to se podílí na hydrolýze toxických látek s esterovou vazbou jako je třeba kokain⁴⁰. Její přesná fyziologická funkce není doposud objasněna. Činnost BuChE s věkem narůstá, oproti menší aktivitě AChE a to hlavně u pacientů s AD^{38,39}.

3.1.3.1.2 Inhibitory cholinesteras

Enzymy AChE a BuChE odbourávají, jak již bylo zmíněno acetylcholin za tvorby rozkladných produktů^{41, 42}. Zablokováním těchto enzymů dojde ke zvýšení nabídky molekul acetylcholinu a ke snížení toxicity a tvorby β A. Nelze od ní očekávat vyléčení nemoci, ale hlavně zpomalení průběhu. Princip všech inhibitorů AChE a BuChE je podobný – dochází k nahromadění endogenního acetylcholinu a tím se zvýrazní jeho muskarinové a nikotinové účinky na receptory^{4,37}.

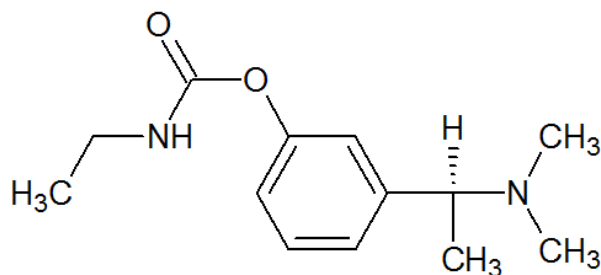
V současnosti se používají nejčastěji donepezil, eptastigmin, rivastigmin a galanthamin. Inhibitory cholinesteras jsou farmaka první volbu lehkých až středně závažných forem AD. Své opodstatnění mají i u těžkých forem, za předpokladu, kdy se začali podávat při prvních projevech a je zde na ně dobrá tolerance. Jako nově nasazované se u těžkých forem však nedoporučují.

Donepezil patří do skupiny piperidinových derivátů, a má bazický charakter. Je to specifický a reverzibilní inhibitor acetylcholinesterasy. Donepezil je více než tisíckrát účinnějším inhibitorem AChE než li BuChE⁴³. Ve studiích byly prokázány pozitivní účinky donepezilu v souvislosti s léčbou výrazného omezení úbytků paměti. Při AD dochází po podání donepezilu pacientům ke zlepšení kognitivních funkcí i globálního fungování. Krom toho došlo také ke zlepšení funkčních dovedností a řešení komplexních úkolů. Donepezil také snížil pokles objemu hippocampu a potvrdil tak svůj neuroprotektivní účinek⁴⁴.



Obr. 2 donepezil

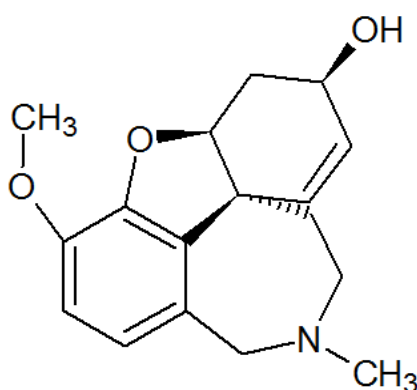
Rivastigmin je zástupcem inhibitorů karbamátového typu. Patří do skupiny pseudoireverzibilních inhibitorů, kdy molekula rivastigminu kompetitivně vytěsňuje acetylcholin na molekule cholinesterasy. Inhibice trvá déle, než je přítomnost inhibitoru či jeho aktivního metabolitu v plazmě. Mimo inhibice AChE také velmi výrazně inhibuje BuChE. Stejně jako u donepezilu může rivastigmin přechodně zlepšovat poruchy kognitivních funkcí⁴⁵. Toto zlepšení trvá přibližně 0,5-1 rok. Mimo jiné také ovlivňuje exekutivní funkce, takže usnadňuje pacientovi průběh každodenního života. A tím se zvyšuje soběstačnost pacientů.



Obr. 3 rivastigmin

Galanthamin je terciární alkaloid, který byl izolován z cibulek sněženky *Galanthus woronowii* Losinsk. (později i *Leucojum aktivum* L.)⁴⁶ z čeledi Amyryllidaceae. Je to selektivní, kompetitivní a reverzibilní inhibitor AChE s duálním účinkem⁴⁷. Mimo inhibici, zesiluje vlastní účinek acetylcholinu na nesynaptické i postsynaptické nikotinové receptory, vazbou na alosterické vazební místo receptoru. Touto modulací se zvyšuje acetylcholinergní přenos. V menší míře se brání vzniku hyposenzitivity M-receptorů. Po podání došlo ke zlepšení kognitivních i nekognitivních symptomů u AD⁴¹.

Přípravou derivátu galanthaminu obměnou methoxyskupiny a terciární aminoskupiny byly získány deriváty, které vykazovali výraznější inhibici AChE⁴⁸. Avšak jejich polarita brání průniku do CNS, což limituje jejich použití. Jako nadějný derivát se ukazuje ester galanthaminu (*N*-butylakarbamat galanthaminu), který je méně toxický než originální galanthamin, nižší polarita umožňuje průnik do CNS a jeho inhibiční aktivita AChE dosahuje 85 % galanthaminu⁴⁶.

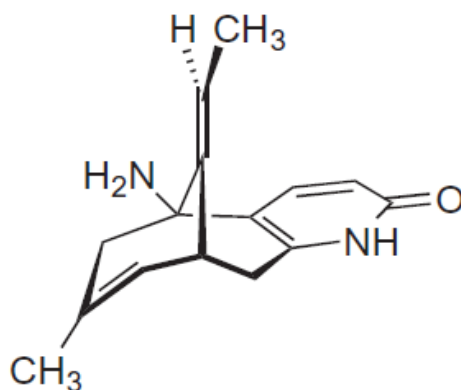


Obr. 4 galanthamin

Huperzin A je seskviterpenický alkaloid, který byl prvně izolován z čínské rostliny *Huperzia serrata* Thunb. (*Huperziaceae*). Tento alkaloid působí jako silný reverzibilní inhibitor AChE⁴⁹. Hup A při klinických testech na inhibiční účinnost (IC₅₀) proti AChE dosáhl

lepších výsledků než donepezil. Vykazuje 900 násobnou selektivitu vůči AChE než BuChE (donepezil vykazuje nižší selektivitu – 500 násobnou). Tato selektivita může zmírnit nežádoucí vedlejší účinky spojené s inhibicí BuChE⁴⁹. Po orálním podání má Hup A 24 až 180 krát vyšší inhibiční účinnost než donepezil. Jako další byl pozorován vliv Hup A na NMDA receptory. Hup A zabraňuje glutamátem indukovanou mobilizaci vápníku v buňce. Při tom bylo popsáno, že antagonistická aktivita Hup A proti NMDA receptoru je nezávislá na inhibiční aktivitě AChE⁵⁰. V současnosti se Hup A nachází ve druhé části klinického testování⁵¹. V testech po p.o. podání zlepšuje uchování paměti při kognitivních poruchách. Molekula alkaloidu je opticky aktivní, v testech se používá (–)-huperzin A.

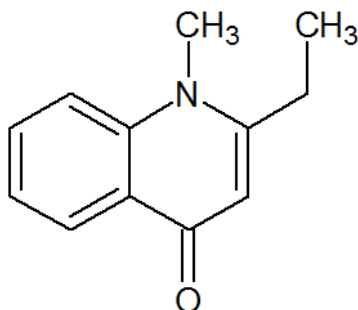
U Hup A bylo dále prokázáno, že má protektivní účinky na mozkovou tkáň před radikály H₂O₂, tím snižuje úroveň peroxidace lipidů. Dále ochraňuje tkáň před lézemi vyvolanými βA, zvyšuje enzymovou antioxidační aktivitu u potkanů⁵². Mezi další potenciálně prospěšné činnosti Hup A můžeme zahrnout modifikace βA, má jisté neuroprotektivní účinky proti apoptóze a reguluje expresi, signalizaci a sekreci NGF⁵³.



Obr. 5 (–)-huperzin A

Inhibiční cholinesteras vykazují i sekundární metabolity rostlin různých strukturních typů a nacházejí se nejen u vyšších rostlin, ale také u hub, řas a sinic. Jedná se zejména o alkaloidy, které patří k nejvíce prozkoumané skupině látek, neboť se dříve věřilo, že nositelem účinku je přítomnost dusíku v molekule. Alkaloidy produkované rostlinami mohou představovat do budoucna perspektivní látky při léčbě AD. Jmenujme například alkaloidy izolované ze stonků *Esenbeckia leiocarpa* Engl. (*Rutaceae*)⁵⁴, u které etanolový extrakt vykazoval inhibiční aktivitu proti AChE. Alkaloidy zodpovědné za inhibiční aktivity byly identifikovány jako **leiokinin A**, **leptomerin**. Zejména leptomerin je ve fázi klinického testování⁵⁵. V rámci screeningů cholinesterasových aktivit také některé extrakty z čeledi *Fumariaceae*,

Papaveraceae inhibovali cholinesterasu. například taxony *Corydalis cava*⁵⁶, *Fumaria vaillantii*, *F. macrocarpa*, *F. densiflora*⁵⁷. Jako další vykazují inhibiční účinnost terpeny, látky odvozené od šikimové kyseliny⁵⁸ a kumarinu (**umbeliferon**, **umbeliprenin** a **aurapten**)⁵⁹.

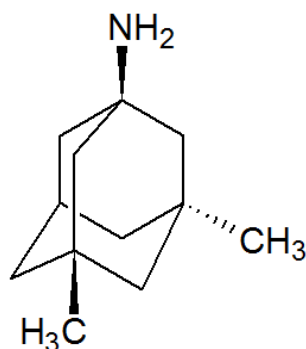


Obr. 6 leptomerin

3.1.3.1.3 Inhibitory glutamatergických receptorů

Při AD dochází k nahromadění excitačních aminokyselin, hlavně glutamátu a aspartátu. Glutamát je hlavním excitačním neurotransmiterem. Za fyziologických podmínek ovlivňuje učení a paměť. Glutamát se váže na ionotropní receptory a na metabotropní receptor vázaný na G-protein v membráně. Ionotropní receptory se rozdělují na NMDA (*N*-methyl-D-aspartát)⁶⁰, AMPA (α -amino-3-hydroxy-5-metyl-4-isoxazopropionová kyselina) a kainátový typ. Iontovou výměnou se NMDA a AMPA podílejí na parciální depolarizaci membrány, která následně aktivuje enzymatické procesy, které fixují formování neurální paměti⁶¹.

Glutamát a jeho zvýšené uvolňování a snížené odbourávání se spolupodílí na patologickém vzniku AD. Zvýšená koncentrace glutamátu se s tvorbou β A při ischemii vede ke chronické hyperexcitaci NMDA receptorů. S tím souvisí zvýšený influx Ca^{2+} do neuronů, kde dojde k aktivaci dependentních enzymů a tvorbě kyslíkových radikálů, vedoucí k excitotoxicitě glutamatergických i cholinergních neuronů. Glutamát zvyšuje toxicitu β A⁵⁴.



Obr. 7 memantin

Memantin jako nekompetitivní antagonist NMDA receptorů chrání neurony před excitotoxickým působením glutamátu náhradou Mg^{2+} a blokadou vstupu Ca^{2+} iontů do buněk. Memantin je indikován u středně těžkých až velmi závažných forem AD⁶².

3.1.3.2 Farmakoterapeutický přístup, který není podle EBM

Při AD dochází ke snížení neuronálního metabolismu, a to především oxidačního metabolismu glukózy a buněčné proteosyntézy. Z tohoto důvodu se začala používat nootropní farmaka⁶³. Nootropní farmaka je chemicky nesourodá skupina látek, které se používají k příznivému ovlivnění poruch vědomí, pozornosti a paměti^{37,4}.

Nootropika zvyšují odolnost nervové tkáně k hypoxii, oxidačnímu metabolismu glukózy a neuronální proteosyntézy. Tyto látky jsou většinou velmi dobře snášeny a mají velmi málo nežádoucích účinků. V současnosti mezi nejčastěji používaná nootropika patří piracetam, pyritinol^{3,4}. Efekt těchto nootropik nebyl potvrzen a nejsou tedy v léčbě ACH doporučována⁶⁴.

Jistou výjimkou v kategorii nootropik tvoří extrakt z *Ginkgo biloba* L. (*Ginkgo*) EGb 761, který je například v přípravcích Tanakan, Tebokan. Účinné látky z extraktu jsou ginkgo-flavonoidové glykosidy (ginkgoheterosid) terpenové látky charakteristické pro *Ginkgo biloba* a to ginkgolidy A, B, C a J, bilobalidy a organické kyseliny. Extrakt působí jako komplexní nootropní farmakoterapeutikum. Má antioxidační vlastnosti, má neuroprotektivní potenciál díky inhibici NMDA-receptoru. Dále blokuje mediátory zánětu PAF (platelet-activating factor)⁶⁵ a inhibuje faktor agregující krevní destičky. Těmito mechanismy extrakt zvyšuje toleranci k hypoxii, zlepšuje reologické vlastnosti krve, to má za následek vyšší průtok krve a má přímý a nepřímý neuroprotektivní vliv⁶⁶. V posledních letech se zkouší kombinace donepezilu a extraktu. Kombinace přinesla o něco lepší výsledky, v oblasti zlepšení kognitivních poruch, než li samotné podávání donepezilu⁶⁷. Výsledky však musí potvrdit další klinické studie.

Jako další se také používají prekurzory tvorby acetylcholinu. Z těchto látek se používá lecitin (fosfatidylcholin)⁶⁸. Uplatňuje se při syntéze cholinu, který je prekurzor tvorby acetylcholinu. V klinických studiích se přínos při užívání lecitinu nepotvrdil⁶⁹. Z dalších látek byly použity fosfatidylserin, fosfatidylinositol. Limitujícím faktorem u těchto látek je malá propustnost cholinu hematoencefalickou bariérou a snížení hladiny cholinacetyltransferasy⁷⁰.

V oblasti ovlivnění oxidačního stresu se používají tzv. scavengery (zhášeče) volných radikálů. Mezi nejčastěji používané patří α -tokoferol (vit. E). Vitamin E se v současnosti

v dostatečných dávkách (2000 IU/den) používá jako doplňková léčba při podávání inhibitorů cholinesteras⁷¹. U vitamínu E bylo dále prokázáno preventivní působení na rozvoj AD⁷². U vitamínu C se vliv na AD nepotvrdil.

Látky blokující projevy zánětu ze skupiny nesteroidních antiflogistik používané perorálně, neposkytly přesvědčivé důkazy a nejsou v současnosti používány. Protože jejich koncentrace v plazmě se v mozku pohybuje pouze okolo 1-2 %⁷³. Nasální formy těchto léčiv (především nasální forma flubiprofenu) se jeví jako perspektivnější a v současnosti probíhají studie o jejich vlivu na progresi AD⁷¹.

U karnitinu, koenzymu Q10 není jejich indikační působení v souvislosti s AD zcela potvrzené, a výsledky studií jsou nejednoznačné⁷⁴.

3.1.3.3 Perspektivní přístupy ve vývoji nových léčiv

V současnosti probíhá řada studií zabývajících se perspektivními postupy v oblasti léčby AD. Jsou založeny na hlubším porozumění etiopatogeneze AD. Například porozuměním mechanismu vzniku β A chybným štěpením APP β - a γ -sekretasou podnítil hledání nových léčebných postupů bližší kauzální léčbě.

3.1.3.3.1 Ovlivnění aktivit sekretas

Další možností ovlivnění vzniku a kumulace β A je použití inhibitorů enzymů, které se podílejí na jeho vzniku. Inhibitory β -sekretasy (látky s horší prostupností přes hematoencefalickou bariéru) a modulátory γ -sekretasy (některé z nich jsou deriváty nesteroidních antirevmatik)⁷⁵. Vyznačují se relativně dobrou tolerancí a orální aplikací. Studie, která zkoumala vliv těchto farmak, však skončila negativním výsledkem při podávání v akutní fázi AD. Kdy u pacientů s AD nedošlo k významnému zlepšení paměti, kognitivních funkcí⁷⁶. Podávání inhibitoru (γ -sekretasy) pacientům, kteří splňují rizikové faktory (genetický výskyt AD v rodině atd.) může působit preventivně a snižovat progresy AD⁷⁷. V současnosti jsou intenzivně hledány a testovány inhibitory z řad přírodních látek⁷⁸. Jako další jsou testovány modulátory γ -sekretas, které působí jen v místě štěpení APP⁷⁹. (např. R-enantiomer flubiprofenu tarenflubril, flurizan). Použití aktivátorů α -sekretas, snižujících cholesterol pomocí statinů (nízká hladina cholesterolu je spojována s vysokým stupněm aktivity α -sekretasy) má nejednoznačné výsledky⁸⁰.

3.1.3.3.2 Zamezení agregace β A

Z klinicky testovaných látek, jsou látky vážající se na uvolněné štěpy APP, znemožňující jejich oligomeraci následovanou polymerací s vytvořením β A. Principem této strategie je

zablokování agregace β A na nerozpustné fibrily a zvýšení clearance β A v mozku. Molekuly vázající se na β A oligomery a fibrily byly navrženy jako malé syntetické peptidy, které narušují konformační strukturu β -listu u β A⁸¹. Tato teorie byla testována u pacientů s AD použitím molekuly tamiprostu^{82,83} (modifikovaná molekula taurinu). Ten se přednostně váže na rozpustný β A peptid, kde se střetává s β listem amyloidu a udržuje ho tak v ne fibrilární formě, čímž inhibuje tvorbu a ukládání β A. Tamiprost prošel klinickým testováním. Nebyla u něj primárně prokázána léčba AD, ale sekundární analýzy potvrdili modulační schopnost tamiprostu na vývoj kognitivních zlepšení. A to hlavně v oblasti zlepšení paměti, jazyku a praktických dovedností⁸⁴. Podobně tomu tak bylo i u látky scyllo-inositol (stereoizomerní forma inositolu). Látka podobná účinkem tramiprosatu je například kurkumin z *Curcuma longa* L. (*Zingiberaceae*)⁷⁹.

3.1.3.3.3 Imunoterapie

Jednou z možností zabránění vzniku neuritických plak tvořených β A je vakcinace⁵⁹. Později bylo dokázáno, že vakcína proti β A nejenom zabraňuje vzniku neuritických plak, ale ovlivňuje i kognitivní dysfunkci⁸⁵. Jako první byla zkoušena pasivní imunizace β A. Tato terapie využívá principu zachování umělých hladin protilátek proti β A. Ve fázi klinických testů jsou látky gantenerumab, solanezumab. Dalším typem pasivní imunizace proti AD je intravenózní podání přirozených lidských imunoglobulinů, včetně protilátek proti β A. To zapříčinilo sníženou tvorbu β A, jeho vylučování v mozku a ochranu neuronů před toxicitou β A^{54,86}. V současnosti se také testují hybridní vakcíny oproti komplexu β A-rAGE.

3.1.3.3.4 Zamezení degradace τ -proteinu

Cílem je zamezení výskytu polymerizovaného τ -proteinu a projevu jeho toxicity. Hsp 90 se podílí na skládání denaturované bílkoviny a zdá se, že hraje velkou v prevenci degradace τ -proteinu. Z inhibitorů Hsp 90 se testuje kurkumin. Z látek, které zamezují degradaci, jsou ale především sledovány inhibitory enzymu GSK-3 β ⁸⁷. GSK-3 β se podílí na formování párového helikálního vlákna τ . Zkoušeny jsou například soli Li, nebo látky izolované z mořského plže *Hexaplex trunculus* (6-bromindirubin)⁸⁸.

3.1.3.3.5 Prevence τ -oligomerizace

Sloučeniny, které brání interakci mezi τ proteinem a NFTs by mohli být užitečné při léčbě AD. Léky jako astemizol, lansoprazol vykazují silnou afinitu k τ -proteinu, a proto nepřímo snižují interakce τ - τ . Ačkoliv lansoprazol snižuje patologické projevy τ -proteinu, má

nepříznivý vliv na metabolismus β A. Lansoprazol pravděpodobně zvyšuje ukládání a agregaci β A skrze modulační vliv na γ -sekretasu⁸⁹.

Barvivo methylenová modř (methylthionium chlorid) má různorodé farmakologické vlastnosti, z nichž jedna zabraňuje interakci τ -proteinu⁹⁰. Mimo to methylenová modř inhibuje agregaci β A, zlepšuje transport elektronů, snižuje oxidační stres, brání mitochondriálnímu poškození, reguluje autofagii a inhibuje AChE⁹¹. Tyto povzbudivé výsledky, byly potvrzeny v studiích na lidech⁹² a vedli k vývoji nové generace sloučeniny. Konkrétně se jedná o LEUCO-methylthionin, který je v současné době ve III. fázi klinických studií⁹³.

3.1.3.3.6 Specifická mitochondriální terapie

Udržováním mitochondriálních funkcí a chráněním mitochondrií proti toxickým agens se očekávají prospěšné účinky na energetickou bilanci mozku, axonální transport a transport Ca^{2+} . Ochrany mitochondrií může být dosaženo použitím antioxidantů, které se selektivně hromadí v mitochondriích. Mezi tyto sloučeniny patří kreatin, ubichinon (CoQ 10), idebenon, mitochinon (selektivně blokuje mitochondriální oxidativní poškození a zabraňuje buněčné smrti). Z látek, které jsou klinicky testovány, můžeme jmenovat latrepirdin. Latrepirdin je pluripotentní lék s antihistaminovým, anticholinesterasovým účinkem, dále blokuje vápenaté kanály, je antagonistou NMDA receptorů a inhibitorem monoaminoxidasy. Kromě těchto účinků latrepirdin chrání mitochondrie proti toxickým látkám včetně β A. Ve II. fázi klinické studie bylo prokázáno zlepšení kognitivních funkcí, které však ve III. fázi potvrzené nebylo. I zde probíhají sekundární analytické studie v souvislosti s možným modulačním účinkem na průběh choroby⁹⁴.

3.1.3.3.7 Inhibice prolyllooligopeptidasy

Inhibice polyoligopeptidasy (POP) sice nepatří mezi potenciální kauzální terapii AD, nicméně aditivně by se mohla v léčbě AD uplatnit. Prolyllooligopeptidasa (POP) je serin cytosolová peptidasa, která hydrolyzuje peptidové vazby na karboxylové straně prolinových zbytků⁹⁵. POP vykazuje nejvyšší koncentraci mezi mozkovými peptidasami, proto je její aktivita dávana do souvislosti s rozvojem neurologických poškození. POP je v mozkové tkáni odpovědná za metabolismus neuropeptidů, jako jsou např. substance P, vasopresin, neurotensin, thyroliberin, které jsou spojovány s učením a pamětí⁹⁶. Největší aktivita byla zaznamenána v mozkové kůře, třikrát menší aktivita v cerebellu. Střední aktivita byla popsána ve striatu, hypotalamu, hippokampu a amygdale⁹⁷. Pokles POP činnosti v séru byl pozorován u pacientů trpících různými stavy deprese, při jejím zvýšení pak byly pozorovány stavy mánie a

schizofrenie⁹⁸. Také nízká hladiny substance P je přisuzována činnosti POP, a je velmi často přítomna u lidí trpící AD. Substance P je popisována jako blokátor toxicity vyvolané β A⁹⁹.

Řada studií ukázala, že v mozku pacientů trpící AD jsou změněny hladiny neuropeptidas. Mnoho těchto neuropeptidas jsou substrátem pro POP, a spekuluje se přímí vliv POP v etiopatogenezi AD. Z tohoto důvodu se klinicky testují inhibitory POP¹⁰⁰. Z nejvíce prozkoumaných inhibitorů jmenujme Z-pro-prolinal, JTP-4819, ONO-1603, ZTTA. Všechny tyto inhibitory mají podobnou strukturu. Jedná se o prolinové deriváty. Vliv inhibitoru POP na zastavení degradace většiny neuropeptidas byl prozatím popsán v mozku kryš²⁹.

Jako potenciální inhibitory POP byly identifikovány látky izolované z mnoha rostlin a hub. Jedná se například o deriváty kávové a skořicové kyseliny izolované z *Hypericum brasiliense* L. (*Hypericaceae*)¹⁰¹, undulatin izolovaný z *Chlidanthus fragrans* L. (*Amaryllidaceae*)¹⁰², styrylpyranony izolované z houby *Phellinus linteus* (*Hymenochaetaceae*)¹⁰³. Polyozelin a kynapcin-12 přítomné v houbě *Polyozellus multiplex* (*Thelephoraceae*)¹⁰⁴.

3.2 *Fumaria officinalis* L. (*Fumariaceae*)

3.2.1 Taxonomické zařazení

Oddělení: *Magnoliophyta*

Třída: *Magnoliopsida*

Podtřída: *Ranunculidae*

Řád: *Papaverales*

Čeleď: *Fumariaceae*

Rod: *Fumaria*

Druh: *Fumaria officinalis* L. – Zemědým lékařský



Zemědým lékařský

Obr. 8 *Fumaria officinalis* L. – Zemědým lékařský¹⁰⁵

3.2.2 Botanická charakteristika čeledi

Zástupci z čeledi *Fumariaceae* jsou vytrvalé byliny bez mléčnic, se střídavými listy. Trojčetné nebo zpeřené listy jsou řapíkaté, bez palistů, vyrůstajíc střídavě. Květy jsou oboupohlavné, souměrné, vytvářející hrozny nebo lat. Kalich je tvořen dvěma malými lístky. Korunu tvoří čtyři lístky ve dvou kruzích v květu jsou dvě tyčinky na širokých nitkách. Prostřední část tyčinky nese dvoupouzdré prašníky. Semeník je svrchní, tvořen ze dvou plodolistů. Plody jsou nažky, nebo tobolky¹⁰⁶.

Do čeledi *Fumariaceae* se řadí 18 rodů s 450 druhy. Oblast rozšíření je mírný pás na severní polokouli. Čeleď je příbuzná s mákovitými (*Papaveraceae*). Od nich se však odlišují absencí mléčnic, a alkaloidy obsahují pouze idioblasty. Semeník u mákovitých může být tvořen srůstem až devatenácti plodolistů¹⁰⁷.

3.2.3 Botanická charakteristika rodu

Do rodu *Fumaria* jsou řazeny jednoleté byliny. Od dymnivek se odlišují tím, že plody obsahují pouze jedno semeno. Rostliny jsou lysé, zbarvení lodyh a listů je šedomodré. Postavení listů na lodyze je střídavé. Spodní listy jsou dlouze řapíkaté, horní listy jsou krátce řapíkaté nebo přisedlé. Květy jsou oboupohlavně, souměrné a krátce stopkaté. Do tohoto rodu je v současnosti řazeno asi 50 druhů, s pěti zástupci se můžeme setkat v ČR¹⁰⁸.

3.2.4 Morfologický popis

Zemědým lékařský je lysá, modrozeleně ojíňená, 10-40 cm vysoká jednoletá bylina. Lodyha je přímá nebo vystoupavá, dutá, rozvětvená a rýhovaná. Listy jsou střídavé, řapíkaté s jemnou, 2krát zpeřenou čepelí, s lístky řapíkatými, dlanitě členěnými až zpeřenými v čárkovité, tupé nebo špičaté úkrojky. Květenství tvoří bohaté, koncové a přímé listnaté hrozny. Květy jsou obojaké, souměrné přibližně 8 mm dlouhé, dvojčetné, s volnými obaly. Kališní lístky jsou vejčitě kopinaté a nepravidelně zubaté, později opadavé. Korunní lístky jsou nachové barvy a na špičce tmavší, horní část je protažena dozadu ve vakovitou ostruhu s medníkem. Tyčinky jsou dvě, dvoubratré a trojčlenné. Prašník tyčinek je složen ze 4 prašných váčků. Semeník je svrchní, tvořen 2 plodolisty a je jednopouzdrý. Plodem je kulovitá, zelená za sucha svrasklá nažka. Semeno je kulovité, červenohnědé^{96,97}.

3.2.5 Stanoviště a rozšíření

Tento druh je v ČR velmi rozšířen a řadí se mezi plevele. Obývá pole, zahrady, vinice, rumiště.

Druh roste skoro v celé Evropě (chybí jen v nejsevernější části), dále v Malé Asii, oblasti Kavkazu, severního Íránu, jižní Sibíře a severní Africe. Původním areálem rozšíření je zřejmě Středozeemí, kde je součástí původních společenstev na skalách a písčích⁹⁶.

3.2.6 *Fumaria officinalis* jako léčivá rostlina

Drogou zemědělymu je kvetoucí nat' – *Fumariae herba.*, nepřekvetlá a bez plodů. Je to výlučně sběrová droga. Droga má světle zelenou barvu listů a fialové květy, slabě makovou vůni a je hořké chuti. Droga je bohatá na benzyloisochinolinové alkaloidy částečně vázané na kyselinu fumarovou a flavonoidy. Soubor alkaloidů z drogy ovlivňuje hladké svalstvo, střevní peristaltiku, má diuretické a choleretické účinky¹⁰⁹.

V lidovém léčitelství se droga zemědělymu používá zejména pro jeho diuretické a choleretické účinky. Hlavně při potížích provázených křečemi horní části trávicího ústrojí, žlučníku a žlučvodů. Droga uvolňuje křeče a reguluje vyměšování žluče. Dále má droga projímavé účinky, pomáhá při chronických kožních onemocněních (léčebné koupele u psoriasis) a působí léčebně při krvavých hemeroidech. Jako homeopatikum se doporučuje při chronickém, svědivém ekzému vyvolaném jaterními poruchami⁹⁶.

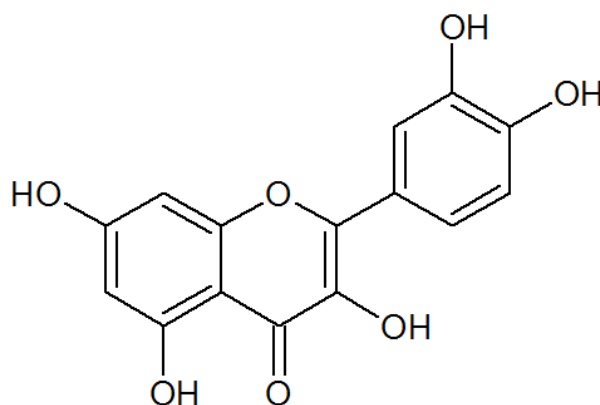
Množství prací popisuje antimikrobiální aktivitu extraktů rostlin rodu *Fumaria*. Výrazný antipyretický extrakt byl popsán při perorálním podání směsi látek získaných z extraktu *F. parviflora* (testovala se biologická aktivita hexanového, chloroformového, vodného extraktu). Jako neúčinnější byl identifikována směs získána extrakcí hexanem. Ethanolický extrakt z *F. parviflora* vykazuje význačný kardioinhibiční, antiarytmický, hypotenzivní a antipyretický účinek. U alkaloidového extraktu z *F. officinalis* byla popsána antiarytmická aktivita. Hepatoprotektivita a cytotoxicita extraktů *F. officinalis* a *F. densiflora* byla testována na modelu primárních kultur potkaních hepatocytů. Hepatoprotektivní účinky celkových extraktů jsou ve srovnání se samotným protopinem malé^{70,82}.

3.2.7 Obsahové látky a jejich biologická aktivita

Rostliny rodu *Fumaria* jsou významné hlavně obsahem svých isochinolinových alkaloidů. Obsahují také další skupiny sloučenin jako fenolické látky, hořčiny, třísloviny, slizy a minerální látky^{44,67}.

3.2.7.1 Fenolické sloučeniny

Mezi další skupinu látek s výrazným biologickým účinkem patří fenolické sloučeniny. Tyto sloučeniny byly také identifikovány, nebo izolovány z *F. officinalis*. Byla zjištěna přítomnost flavonoidů isokvercetin, kvercetin-3,7-glukosidu, kvercetin-3-arabinosyl-glukosidu, rutinu kamferol-arabinosidu¹¹⁰. Z kyselin jsou to kyseliny (-)-kaffeoyl-D-jablečná, (-)-feruloyl-D-jablečná a (-)-*p*-kumaroyl-D-jablečná, fumarová, kávová a chlorogenová⁷⁰.



Obr. 9 kvercetin

Jako první byla biologická aktivita popsána u derivátů kyseliny skořicové, kávové, ferulové a *p*-kumarové, konkrétně se jednalo o cholagogenní účinek. U kyseliny kávové bylo prokázáno, že inhibuje spasmolytickou aktivitu a spolu s kyselinou chlorogenovou inhibují peroxidaci mastných kyselin LDL lipoproteinů¹¹¹. Kyselina chlorogenová také aktivně ovlivňuje resorpci železa ve střevním traktu a má protektivní účinek na chromozomy vystavené gama záření. Tyto dvě posledně zmíněné kyseliny vykazují hepatoprotektivní účinek při intoxikaci hepatocytů brombenzenem, aktivují jaterní enzymové systémy sloužící k metabolismu xenobiotik. V rodu *Fumaria* je kvantitativně hojně zastoupena kyselina fumarová, která byla terapeuticky použita k léčbě lupénky. Kyselina má také potencionální antikancerogenní a antifungální účinky, které se dále zkoumají^{70, 112}.

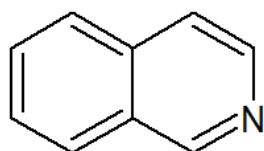
3.2.7.2 Alkaloidy

Obsah jednotlivých alkaloidů závisí na druhu a geografickém výskytu rostliny, rozmanitost alkaloidů v rámci rodu *Fumaria* u druhů, které se vyskytují na území ČR, je zobrazena v tab. 1^{113, 114} jejich obecná struktura pak na obr. 10⁹⁶.

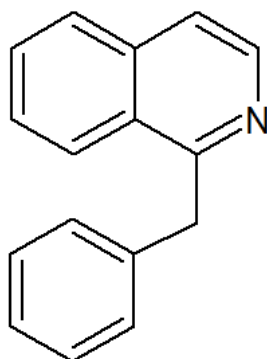
Tabulka 1 Výskyt jednotlivých strukturních typů alkaloidů v druzích rodu *Fumaria* ⁶⁹

Rod <i>Fumaria</i>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<i>Fumaria officinalis</i> L.	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
<i>Fumaria parviflora</i> Lam.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
<i>Fumaria schleicheri</i> Soy.Will.	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-
<i>Fumaria schramii</i> Velen.	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-
<i>Fumaria vaillantii</i> Loisel.	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-

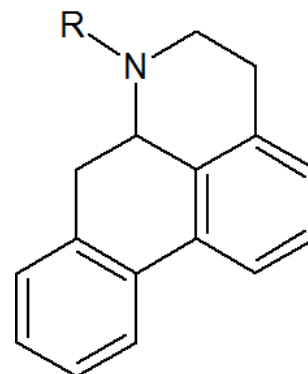
Typ: 1 isochinolinový, 2 benzyloisochinolinový, 3 aporfinový, 4 protoberberinový,
 5 benzofenantridinový, 6 protopinový, 7 ftalidisochinolinový, 8 sekoftalidisochinolinový,
 9 indenobenzazepinový, 10 spirobenzyloisochinolinový, 11 promorfinanový, 12 rhoedinový



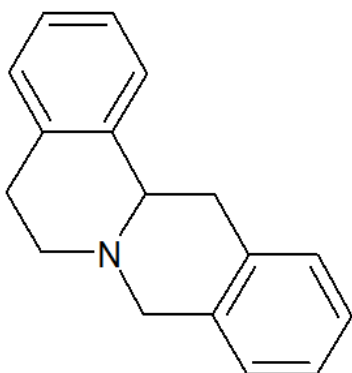
isochinolinový



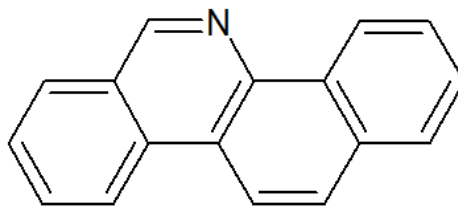
benzyloisochinolinový



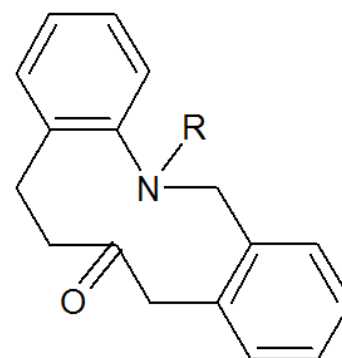
morfinový



protoberberinový

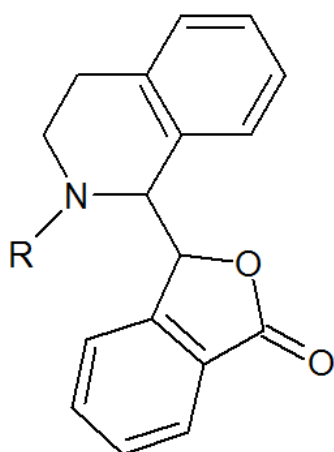


benzofenantridinový

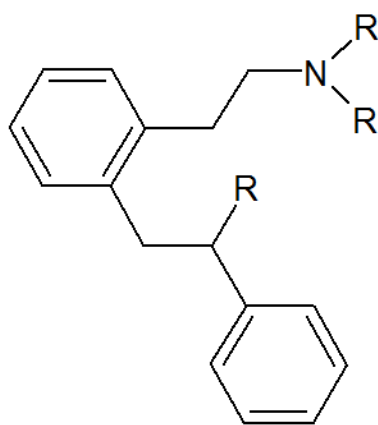


Protopinový

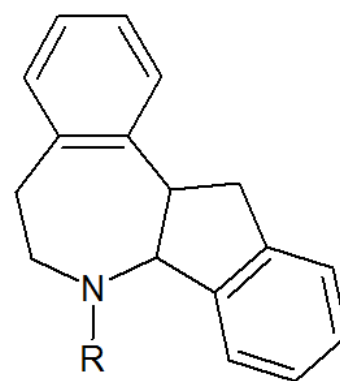
Obr. 10 strukturní typy alkaloidů identifikované v rostlinách rodu *Fumaria* ⁶⁹



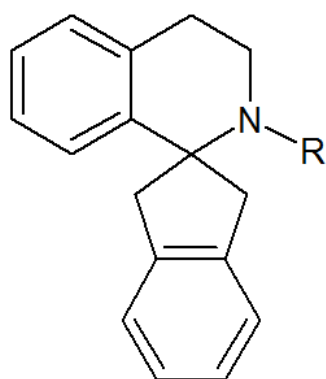
ftalidisochinoliny



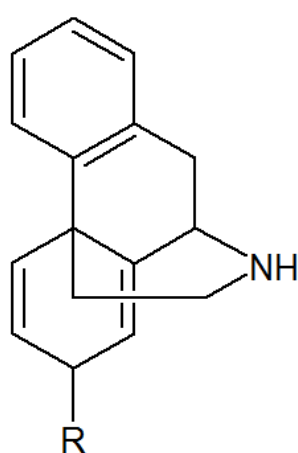
sekoftalidisochinoliny



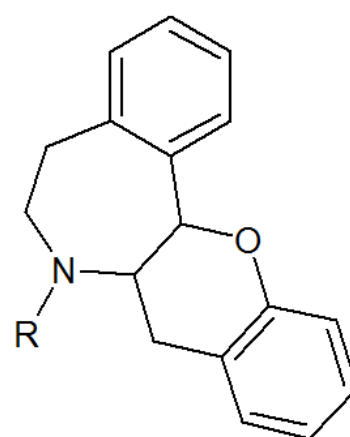
indenobenzazepiny



spirobenzylisochinoliny



promorfinany



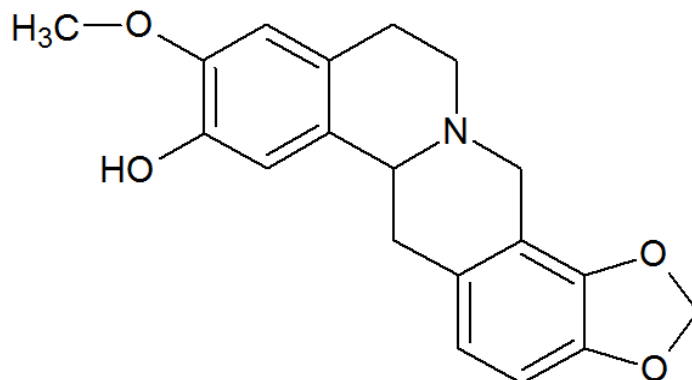
rhoeadiny

Obr. 10 pokračování

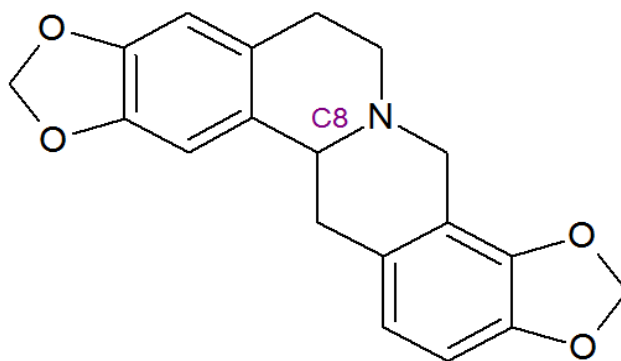
3.2.7.2.1 Protoberberinové alkaloidy

V čeledích *Berberidaceae* a *Fumariaceae* velmi často přítomná skupina alkaloidů. U druhu *F. officinalis* tvoří po skupině isochinolinových alkaloidů druhou nejpočetnější skupinu alkaloidů. Chemicky se vyskytují ve formě tetrahydroprotoberberinové, nebo ve formě kvarterních amoniových solí. Základ tvoří benzylisochinolinový skelet, kde mezi dusíkem a uhlíkem C 8 je přítomen berberinový most¹¹⁵. V *F. officinalis* byla zjištěna přítomnost (±)-cheilathifolinu, koptisinu, (±)-skulerinu, (-)-skulerinu, (±)-sinaktinu, (-)-sinaktinu, (±)-stylopinu, (-)-stylopinu. **Dihydrokoptisin** vykazuje kardioprotektivní, antioxidační účinky, inhibiční účinky na tvorbu osteoklastů, neuroprotektivní a antifungální účinky¹¹⁶. (±)-**skulerin** je charakteristický sedativními účinky. (±)-**sinaktinu** jsou přisuzovány antivirotické

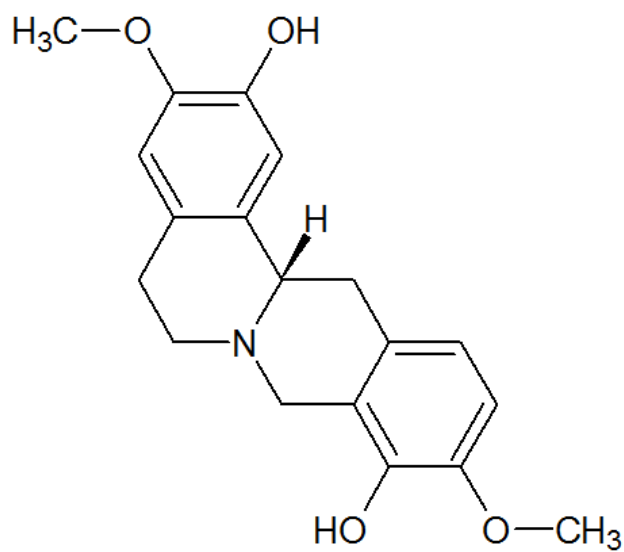
a antibakteriální účinky¹¹⁷. Mimo výše zmíněné čeledi se protoberberinové alkaloidy vyskytují také v čeledích *Lauraceae*, *Menispermaceae*, *Papaveraceae*, *Lauraceae*, *Ranunculaceae*⁷¹.



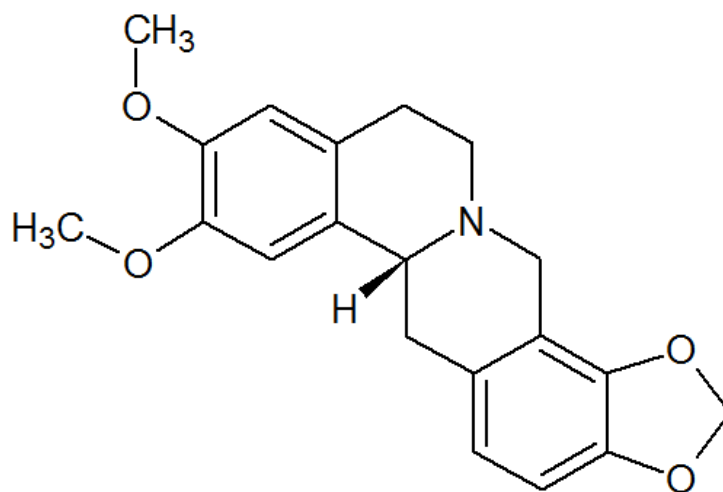
(±)-cheilathifolin



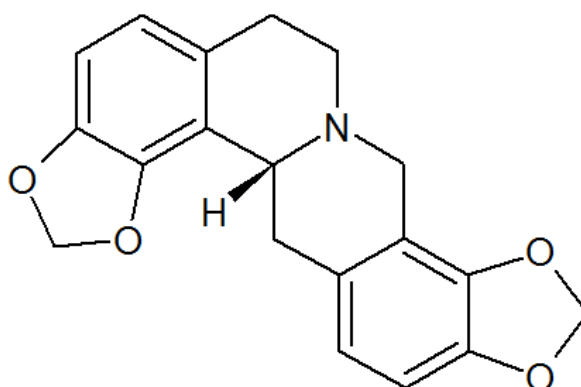
(±)-dihydrokoptisin



(-)-skulerin



(-)-sinaktin



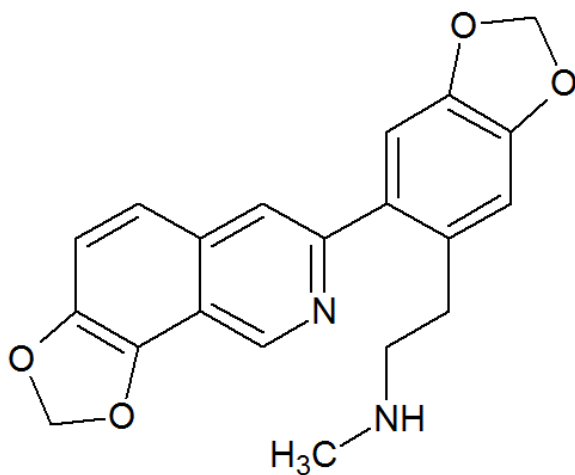
(-)-stylopin

Obr. 11 protoberberinové alkaloidy

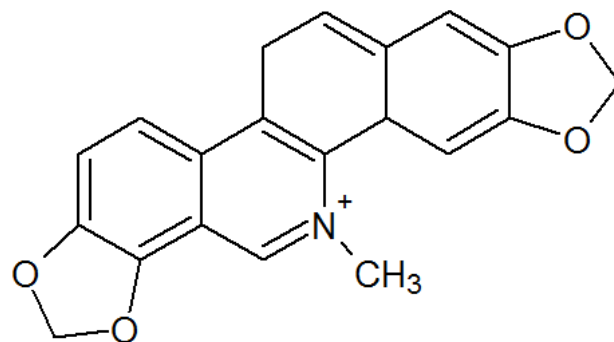
3.2.7.2.2 Benzofenanthridinové alkaloidy

Benzofenanthridinové alkaloidy jsou přítomny hlavně v čeledích *Papaveraceae*, *Rutaceae*. V rostlinách se tyto alkaloidy vytvářejí přeměnou protoberberinových alkaloidů¹¹⁸.

U *F. officinalis* byly identifikovány **korydamin**, **sanguinarin**. Sanguinarin je kvarterní alkaloid a má protinádorové a antibakteriální účinky a řadí se mezi potencionální antitumorová léčiva¹¹⁹. U korydaminu byly zjištěny antiulcerózní účinky v oblasti žaludku a duodena¹²⁰.



korydamin



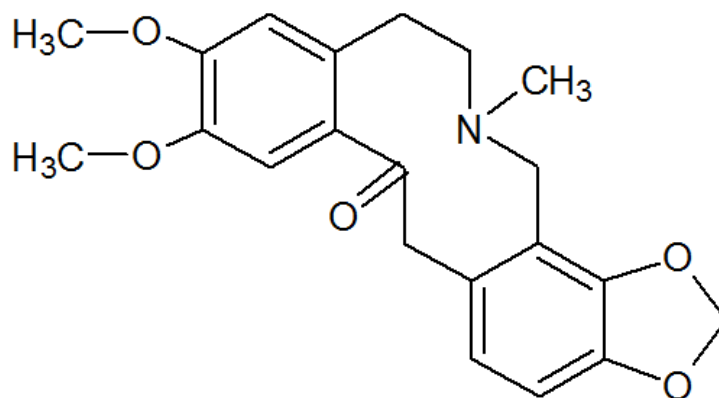
sanguinarin

Obr. 12 benzofenanthridinové alkaloidy

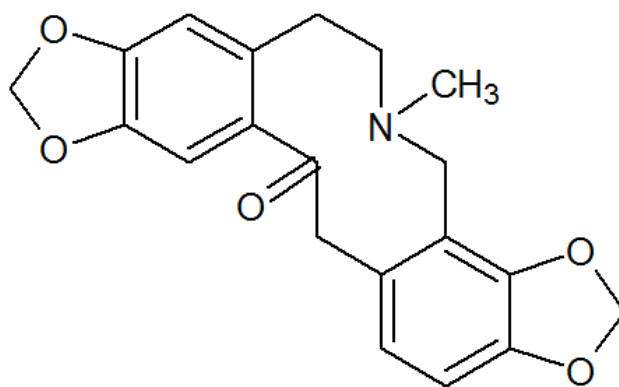
3.2.7.2.3 Protopinové alkaloidy

Protopinové alkaloidy jsou nejčastěji obsaženy v čeledích *Berberidaceae*, *Papaveraceae*, *Ranunculaceae*. Jsou to terciární, nebo kvartérní alkaloidy. Dusík není součástí isocholinového kruhu, ale je součástí desetičlenného heterocyklického cyklu kde je dále přítomna ketonická skupina. Protopinové alkaloidy vznikají oxidací z protoberberinových alkaloidů⁶⁸.

U *F. officinalis* byly identifikovány **protopin** a **kryptopin**. Tyto alkaloidy zpomalují srdeční frekvenci, zvyšují průtok koronární artérií a mají krátkodobý excitační účinek na dělohu¹²¹. Kryptopin také vykazoval antibakteriální aktivitu a antihelmintický účinek¹²². Protopin, mimo již zmíněné účinky, dále vykazoval inhibiční účinek na mozkovou GABA transaminasu a má antagonistický účinek na Δ opioidní receptorů¹²³.



kryptopin



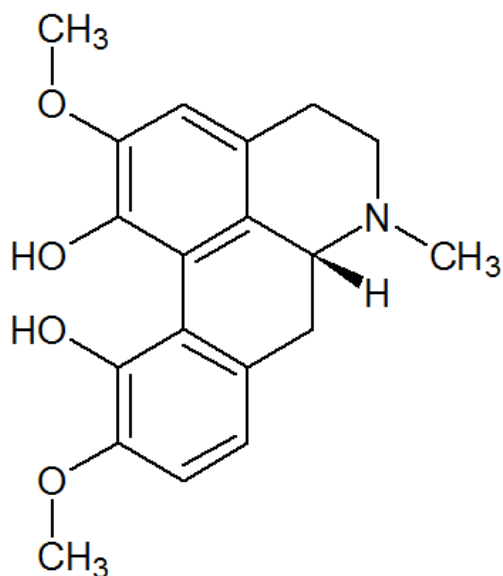
protopin

Obr. 13 protopinové alkaloidy

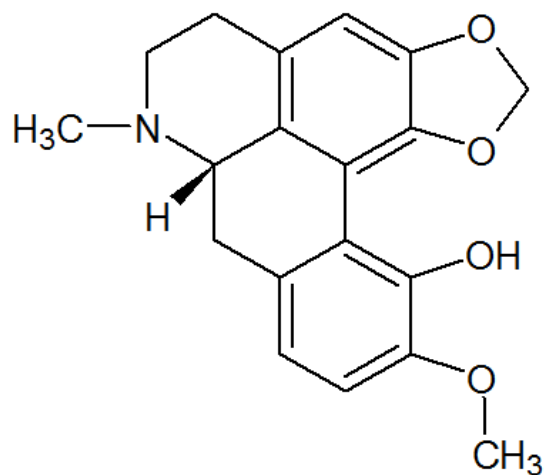
3.2.7.2.4 Aporfinové alkaloidy

Aporfinové alkaloidy se vyskytují nejčastěji v čeledích *Papaveraceae*, *Menispermaceae*, *Ranunculaceae* a *Lauraceae*. Jejich struktura je odvozena od struktury aporfinu. Tato struktura vzniká párováním aromatických jader benzyliochinolinů¹²⁴.

V *F. officinalis* byl identifikován (+)-**korytuberin**. Tento alkaloid působí na kardiovaskulární systém tak že zpomaluje puls a způsobuje zrychlení dechové frekvence^{79,125}. Dále byla zjištěna přítomnost (+)-**bulbokapninu**. Bulbokapnin je znám především pro svojí katatonii – bulbokapninová ztuhlost. Byla také u něj publikována inhibiční činnost na AChE a BuChE¹²⁶.



(+)-korytuberin

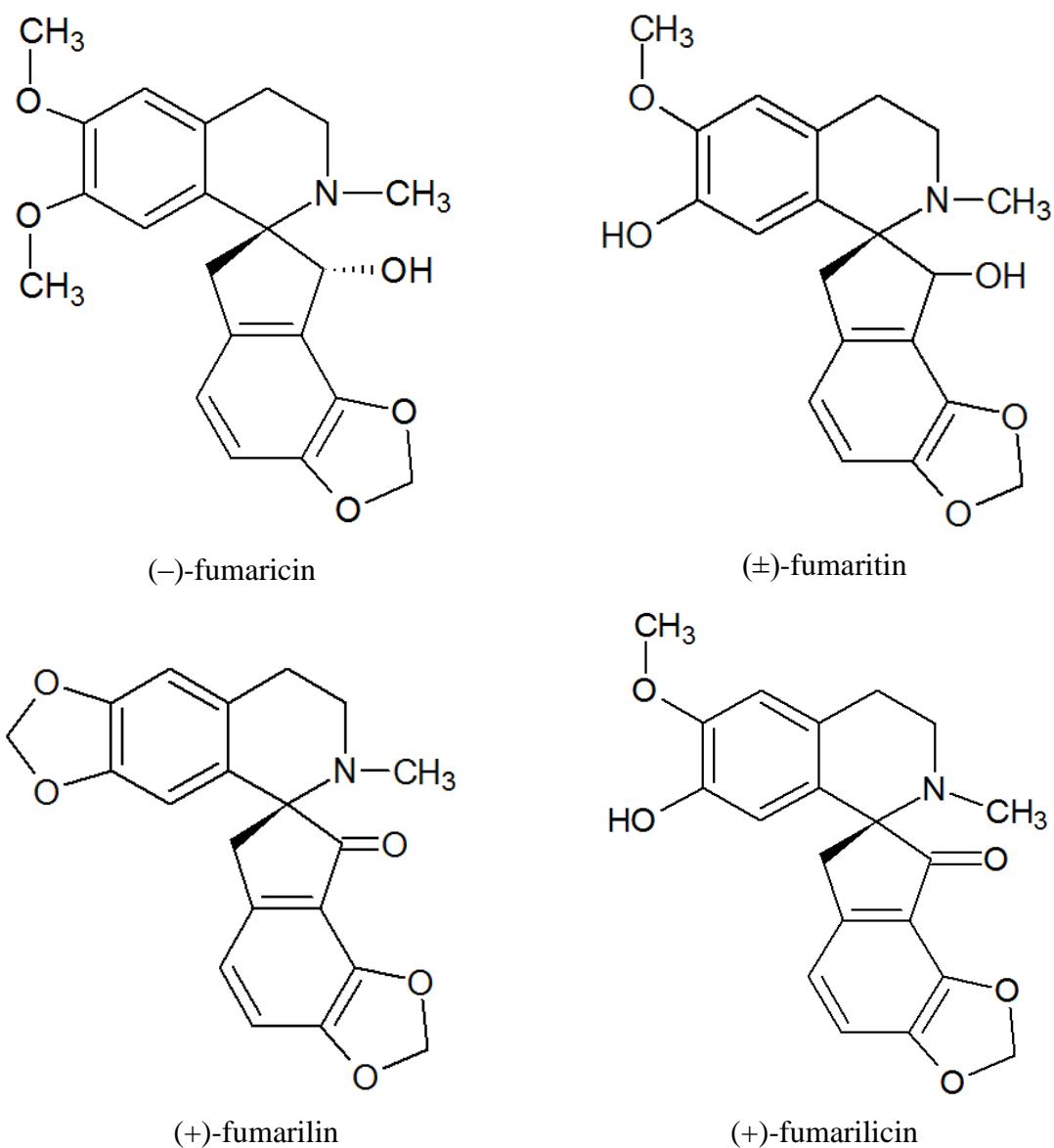


(+)-bulbokapnin

Obr. 14 aporfinové alkaloidy

3.2.7.2.5 Spirobenzylisochinolinové alkaloidy

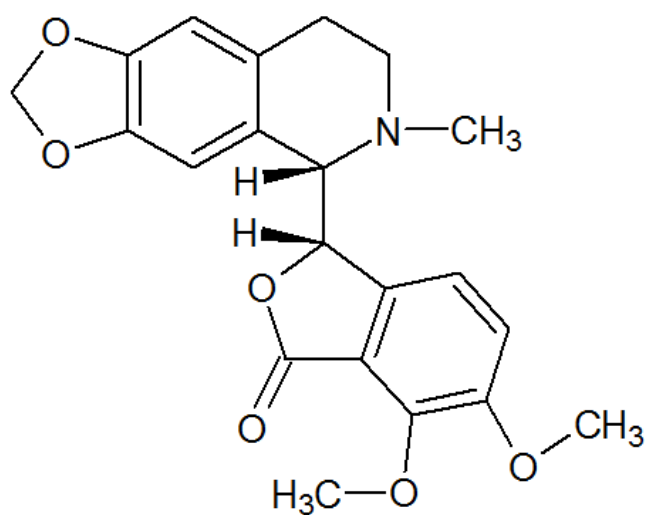
Spirobenzylisochinolinové alkaloidy tvoří hlavní skupinu obsahových látek čeledi *Fumariaceae*. V rostlině vznikají, tak jako jiné alkaloidy z této rostliny, přeměnou protoberberinových alkaloidů⁷⁰. Z této skupiny byla zjištěna u *F. officinalis* přítomnost (+)-**dihydrofumarilinu**, **epihydrofumarilinu**, (-)-**fumaricinu**, (+)-**fumarilinu**, (±)-**fumaritinu**, **fumaritin-N-oxidu**, **fumaritrilinu**, (+)-**fumarofycinu**, (-)-**O-methylfamurofycinu**, (+)-**parfumidinu**.



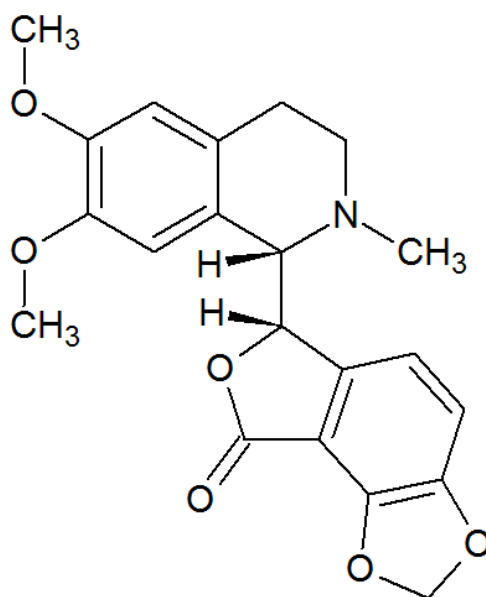
Obr. 15 struktury některých spirobenzylisochinolinových alkaloidů

3.2.7.2.6 Ftalidisochinolinové alkaloidy

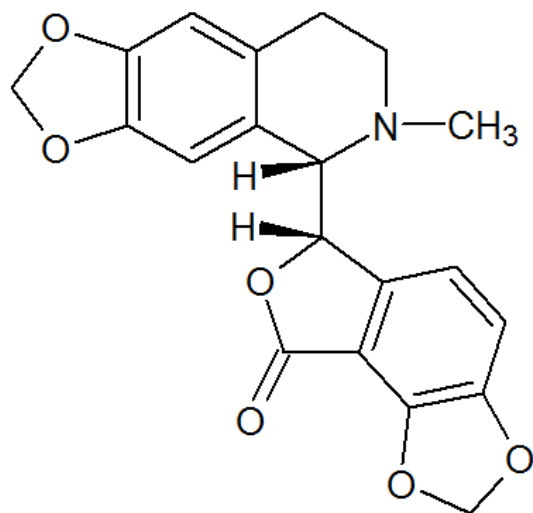
Alkaloidy této skupiny se nejčastěji nacházejí v čeledích *Berberidaceae*, *Papaveraceae* a *Ranunculaceae*. Prekurzory pro tyto alkaloidy jsou dopamin, methionin, tyramin a tyrosin. Prekurzory tvoří pro tuto skupinu charakteristické jádro, které je tvořeno čtyřmi cykly. Součástí těchto cyklů je i laktonový kruh. Ve *F. officinalis* byly identifikovány především (+)-**adlumin**, (+)-**bikukulin**, (+)-**hydrazin**. (+)-Adlumin má tlumící účinek na kardiovaskulární systém, zejména zeslabuje srdeční činnost. Dále má stimulační účinky v oblasti střev, a působí jako uterotonikum. Uterotonické vlastnosti má také hydrazin. (+)-Bikukulin je antagonistou GABA-A¹⁰².



(+)-hydrazin



(+)-adlumin

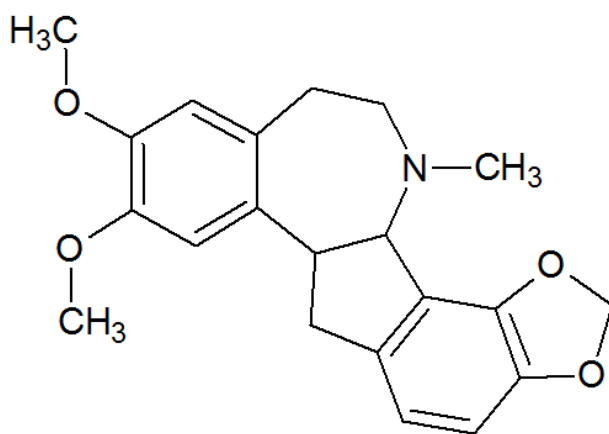


(+)-bikukulin

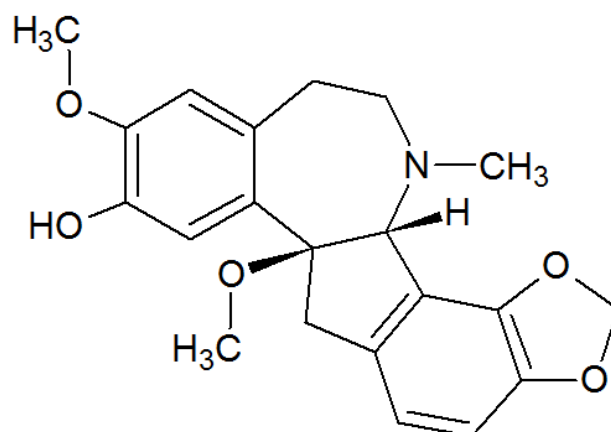
Obr. 16 ftalidoisochinolinové alkaloidy

3.2.7.2.7 Indenobenzazepinové alkaloidy

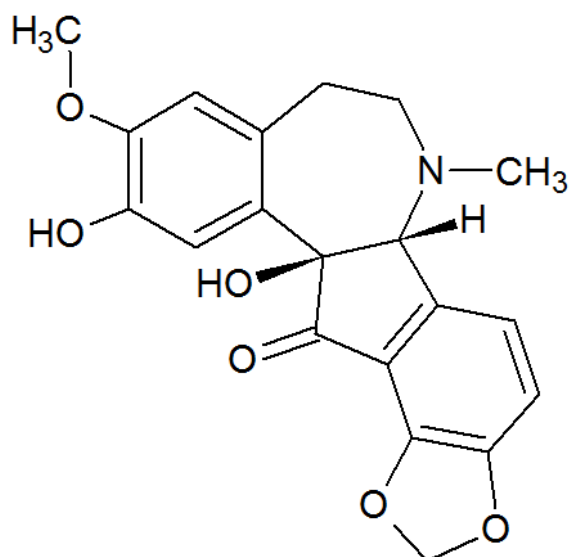
Sloučeniny této chemické struktury jsou v rodu *Fumaria* poměrně často zastoupené¹²⁷. V *F. officinalis* byla zjištěna přítomnost (±)-**bulgaraminu**, (+)-**fumaritridinu**, (+)-**fumaritrinu**, (+)-**fumarofinu**. Biologická aktivita těchto látek nebyla doposud publikována.



(±)-bulgaramin



(+)-fumaritridin



(+)-fumarofin

Obr. 17 indenobenzazepinové alkaloidy

3.2.2.7.8 Inhibiční aktivita AChE a BuChE vyvolaná alkaloidy z rodu *Fumaria*

V rámci screeningu cholinesterázových aktivit vykazovaly některé extrakty z čeledi *Fumariaceae* a *Papaveraceae* (podle nejnovější systematiky jsou někdy tyto dvě čeledi řazeny pod jednu čeleď *Papaveraceae*) inhibiční aktivitu vůči cholinesterasám¹²⁸. Druhy, které při screeningu vykazovali inhibiční aktivitu *Fumaria vaillantii*, *F. capreolata*, *F. kralikii*, *F. asepala*, *F. densiflora*, *F. flabellata*, *F. petteri* subsp. *thuretii*, *F. macrocarpa*, *F. cilicica*, *F. parviflora*, *F. judaica*¹²⁴.

Inhibiční aktivita byla měřena na AChE z elektrického úhoře (*Electrophorus electricus*) a koňské sérové BuChE upravenou Ellmanovou metodou⁸². Extrakty rostlin a sloučeniny testované na inhibici AChE a BuChE byly testovány v koncentracích 10 µg/ml a 1 mg/ml. Jako standard byl použit galanthamin. Extrakty o koncentraci 10 µg/ml, které byly testovány na inhibici AChE vykazovaly inhibiční aktivitu v rozmezí 5,09 – 54,44 %, standard 5,08 %. Při koncentraci extraktu 1 mg/ml bylo rozmezí 2,01 – 16,62 % u standardu 11,23 %. Látky o koncentraci 10 µg/ml bylo rozmezí 87,02 – 96,89 % v závislosti na určitém taxonu, u standardu 48,80 %. Při koncentraci testovaných alkaloidů 1 mg/ml bylo rozmezí 80,03 – 99,32 % a u standardu byla aktivita 80,31 %. Údaje vyjadřují pokles aktivity enzymu na danou hladinu⁸². Z výsledků inhibiční aktivity lze tedy říci, že většina rostlinných extraktů vykazovala inhibiční účinnost proti oběma enzymům závislou na dávce.

Alkaloidy, které byly izolované a vykazovali inhibiční aktivitu AChE (c alkloidu = 1 mg/ml) z rodu *Fumaria* jsou (+)-kanadin (56,75 ± 0,58 %), (+)-hydrastin (10,08 ± 0,78 %), (+)-bulbokapnin (65,23 ± 0,42%), (+)-fumaroficin (37,90 ± 0,99 %) , korydaldin (17,11 ± 0,89 %) a protopin (80,53 ± 0,59%), údaje v závorkách vyjadřují pokles aktivity enzymu na danou hladinu^{82,129}. Alkaloidy hydrastin a corydaldin byly nejméně účinné, co se inhibiční aktivity týče, to vede k domněnce, že k inhibiční aktivitě extraktu nepřispívá. Bulbokapnin (IC₅₀ = 2,0 µM) má vyšší hodnotu IC₅₀ než li galanthamin (IC₅₀ = 5,8 µM). Přispívá tak k inhibiční aktivitě extraktu. Také kanadin (IC₅₀ = 2,6 µM) vykazuje silnou inhibiční aktivitu

120

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Materiál a vybavení

4.1.1 Chemikálie a rozpouštědla

- ethanol 95%, denaturovaný methanolem, p.a. (Penta)
- cyklohexan p. a. (Penta)
- destilovaná voda (H₂O)
- diethylether č. (LachNer)
- dusičnan bismutitý zásaditý (LachNer)
- diethylamin p.a. (LachNer)
- chloroform p. a. (Penta)
- jodid draselný (Penta)
- kyselina chlorovodíková 35%, p.a. (Lachema)
- kyselina vinná (Penta)
- lékařský benzín lékopisné kvality ČL 2009 (Penta)
- toluen p. a. (Penta)

4.1.2 Pomocné látky

- křemelina Celite C 535 John's Manville (Sigma-Aldrich)
- uhličitan sodný 10 % (w/w)

4.1.3 Chromatografické adsorbenty

- Kieselgel SiO₂ 60 F254, fa Merck, 20 × 20 cm, hliníková deska s vrstvou silikagelu pro TLC s hloubkou vrstvy 0,2 mm (Merck)
- Oxid hlinitý (Al₂O₃) deaktivovaný 6% H₂O, stupeň deaktivace Brockmann III, velikost zrn 40-200 μm, (ACROSS)

4.1.4 Detekční činidla

Dragendorffovo činidlo dle Muniera

Toto činidlo se používá k detekci alkaloidů a sloučenin, které ve své molekule obsahují vázaný dusík. Skládá se z roztoku **A** a roztoku **B** v poměru 1:1.

Roztok A se připravuje rozpuštěním 1,7 g dusičnanu bismutitého zásaditého a 20 g kyseliny vinné v 80 ml vody.

Roztok B byl připraven rozpuštěním 16 g jodidu draselného ve 40ml vody.

Mayerovo činidlo

Mayerovo činidlo se používá ke zjištění přítomnosti alkaloidů v organickém rozpouštědle.

Jeho složení je 1,36 g chloridu rtuťnatého, 5 g jodidu draselného a 100 ml vody. Po smísení a důkladném rozpuštění sloučenin vzniká tetrajodortuťnatán draselný, který reaguje s alkaloidy.

4.1.5 Přístrojové vybavení

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

4.1.6 Chemikálie a materiál, které byly použity pro stanovení inhibiční aktivity erytrocytární AChE a sérové BuChE

Chemikálie

- 10mM acetylthiocholin jodid (Sigma-Adrich)
- 10mM butyrylthiocholin jodid (Sigma-Adrich)
- 0,1 M fosfátový pufr, pH 7,4 (o složení: dihydrát dihydrogenfosforečnanu sodného (Lachema); dodekahydrát hydrogenfosfrečnanu disodného (Lachema)
- 5 mM 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina $\geq 98\%$ (Sigma-Aldrich)
- Huperzin A (TAZHONGHUI – Tai'an zhonghui Plant Biochemical Co., Ltd., China)
- Galanthamin hydrobromid (Changsha Organic Haerb Inc., China)
- Dimethylsulfoxid (Sigma-Adrich)

Materiál

Jako zdroj AChE byla použita pouzdra lidských erytrocytů. Zdrojem BuChE byla lidská plazma.

4.1.7 Chemikálie a materiál, které byly použity pro stanovení inhibiční aktivity POP

Chemikálie:

- Z-Gly-Pro-*p*-nitroanilide (Sigma-Aldrich)
- POP (Sigma-Aldrich)
- dimethylsulfoxid (Sigma-Adrich)
- fosfátem pufovaný fyziologický roztok, 0,01 M, pH 7,4 (o složení: 137 mM NaCl a 2,7 mM KCl)
- bajkalin (Sigma-Adrich)
- 1,4-dioxan (Lachema)
- *p*-nitroaniline (Lachema)

4.1.8 Příklad pro stanovení cholinesterasové inhibiční aktivity

Reader Synergy™ HT Multi-Detection Microplate Reader (BioTek, USA). Měření bylo prováděno na mikrotitračních destičkách (96 jamek, průhledné, Brand).

4.1.9 Příklad pro stanovení POP inhibiční aktivity

ELISA reader EL800 (Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA). Měření bylo prováděno na mikrotitračních destičkách (96 jamek, průhledné, Brand).

4.2 Všeobecné postupy

4.2.1 Destilace rozpouštědel a odpařování

Komerční rozpouštědla v kvalitě pro analýzu, nebo chemicky čistá byla před použitím přečištěna destilací. Odpařování frakcí, které byly získané při sloupcové chromatografii, probíhalo na vakuové odparce do 40 °C za sníženého tlaku. Frakce byly po vysušení v exikátoru umístěny v chladničce (při 2-8 °C)

4.2.2 Chromatografie

4.2.2.1 Sloupcová chromatografie

Sloupcová chromatografie byla provedena metodou gradientové eluce na neutrálním oxidu hlinitém. Suspenze adsorbentu byla navrstvena do chromatografické kolony, do takto připravené kolony byl nanesen vzorek ve formě roztěru.

4.2.2.2 TLC

Tenkovrstvá chromatografie byla prováděna vzestupně v systému normálních komor. Komory byly započítím chromatografie nasyceny, doba sycení mobilní fáze byla závislá na velikosti komor, pohybovala se od 20 minut po dobu 1 hodiny.

4.2.2.3 Příprava desek pro preparativní TLC

Příprava spočívala v odmaštění desek a v nalití směsi komerčního silikagelu a destilované vody na skleněné desky o rozměru 20 x 20 cm. Desky byly po té umístěny do stojanu, kde samovolně vyschly. Doba sušení byla nejméně 24 h před jejich použitím.

4.2.2.4 Detekce

Pro detekci alkaloidů na TLC se používala nejprve detekce pod UV lampou při vlnových délkách $\lambda = 254$ a 366 nm. Následně byl po vyvinutí chromatogram postříkán Dragendorffovým činidlem, pozitivní reakce v oblasti výskytu na přítomnost alkaloidu se projevila jako oranžovohnědá skvrna.

4.2.3 Teplota tání

Teploty tání byly měřeny na bodotávku Büchi Melting Point B-540. Výhřevnost byla nastavena tak, aby do 10 °C před předpokládanou teplotou tání u dané látky stoupala teplota ve výhřevném bloku rychle (15 °C/min.) a pak stoupala postupně (0,5 °C/min.) do maximální teploty, která byla o 10 °C vyšší než předpokládaná teplota bodu tání látky.

4.2.4 GC-MS analýza

Hmotnostní spektra byla měřena na spektrometru Agilent 7890A GC 5975, mód EI při 70 eV. Separace byla provedena na koloně DP-5 MS (30 × 0,25 mm × 0,25 μm), Agilent Technologies Santa Clara, CA, USA. Parametry teplotního programu: 100°C → 15°C/min → 180°C/1min → 5°C/min → 300°C. Teplota injektoru byla nastavena na 280 °C, nosným plynem bylo helium, jeho průtok byl nastaven na 0,8 ml za minutu. Detekční rozmezí bylo m/z 35-600, teplota detektoru byla 200 °C. Injekce proběhla ve split modu v poměru 1:10, byl injektován 1 μl alkaloidního roztoku (1 mg/ml). Detekce jednotlivých alkaloidů byla provedena na základě porovnání jejich MS spektra se spektry v NIST knihovně, literatuře a s referenčními spektry látek, které byly již na katedře Farmaceutické botaniky a ekologie Faf UK dříve izolovány.

4.2.5 NMR analýza

NMR spektra byla měřena na spektrometru Varian Iniova 500. Pracovní frekvence pro jádra byla ^1H 499,9 MHz, ^{13}C 125,7 MHz. Pro měření spektra ^{13}C NMR byla použita 5 mm SW širokopásmová sonda. ^1H NMR spektra byla měřena v inverzní 5 mm ID PFG sondě za použití standardních pulzních frekvencí. Měření byla realizována v deuteriochloroformu za teploty 25 °C.

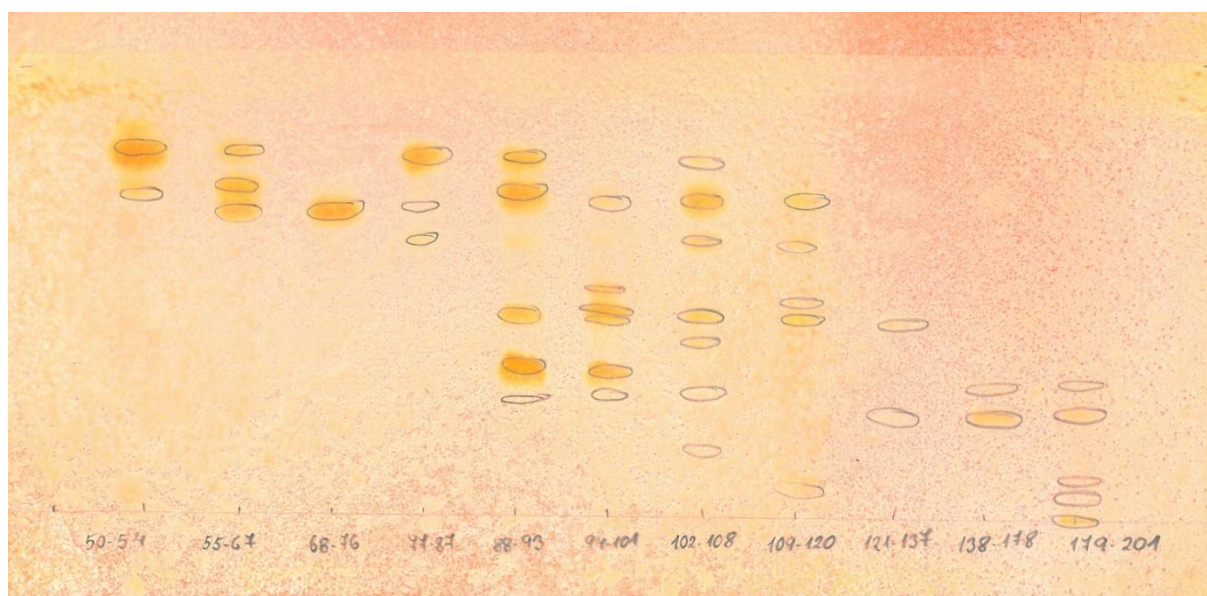
4.2.6 Příprava erytrocytárních pouzder

Z čerstvě odebrané krve se odebrala erytrocytární pouzdra, která byla připravena přidáním citrátu (1 ml na krve 10ml). Plazma (BuChE) byla odstraněna za pomoci centrifugy (4000 ot. /min.). Erytrocyty byly přemístěny do 50 ml zkumavek a 3× promyty 5mM fosfátovým pufrem (pH 7,4) s 15 mM chloridem sodným (12000 ot. /min). Promyté erytrocyty byly smíchané s 5 mM fosfátovým pufrem (pH 7,4) na dobu 10 minut, aby byla zajištěna jejich lýza. Desintegrované buňky byly 10 minut centrifugované rychlostí 20000 ot. /min. a následně byla pouzdra (BuChE) třikrát promyta fosfátovým pufrem (pH 7,4).

4.3 Izolace alkaloidů z *Fumaria officinalis*

4.3.1 Separace alkaloidů z frakce č. 55 – 67

Náplní diplomové práce byla izolace spojené frakce 55-67 (A2), která byla získána ze souhrnné sloupcové chromatografie alkaloidního diethyletherového koncentrátu (87 g), který byl dříve připraven a zpracován v rámci diplomových prací D. Kassemové a M. Šafratové^{5,130}.



Obr. 18 TLC frakcí A1-A11

Tabulka 2 Výsledky sloupcové chromatografie

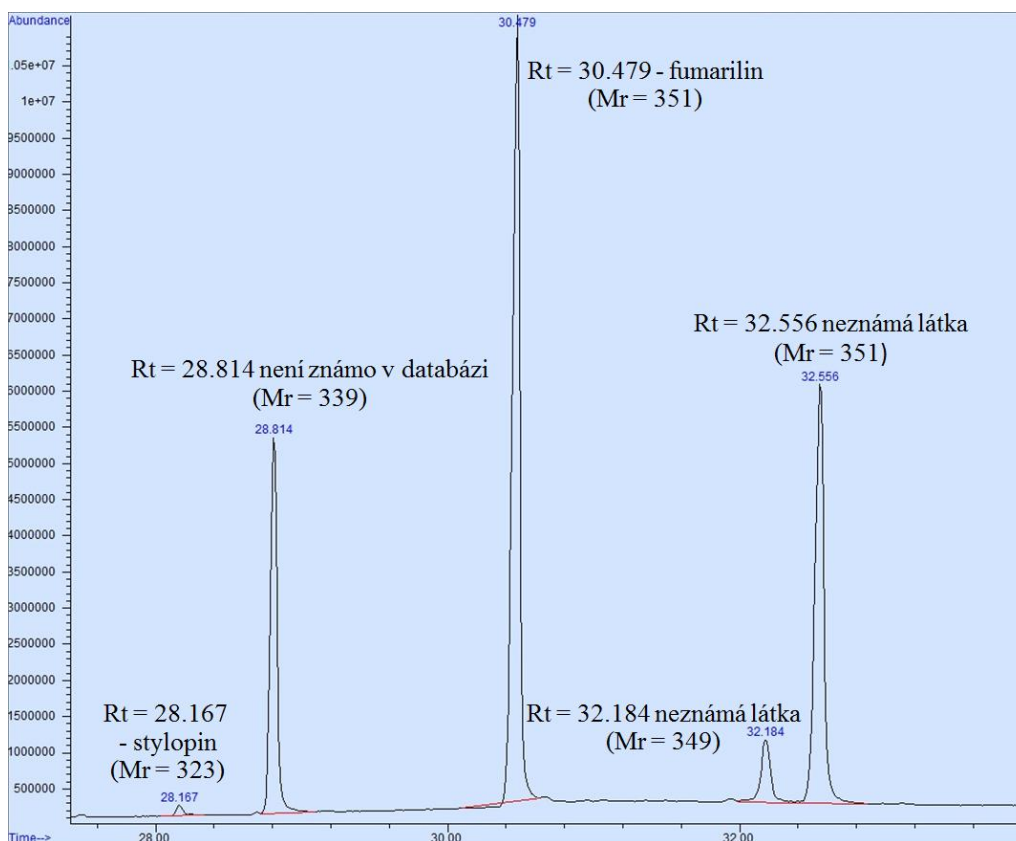
<i>Spojené frakce (A1 – A11)</i>	<i>Mobilní fáze</i>	<i>Hmotnost frakcí</i>
50-54	LB + CHCl ₃ (3:2)	0,30
55-67	LB + CHCl ₃ (3:2)	13,89
68-76	LB + CHCl ₃ (3:2)	6,30
77-87	LB + CHCl ₃ (3:2, 1:1)	9,60
88-93	LB + CHCl ₃ (1:1)	13,59
94-101	LB + CHCl ₃ (1:1)	7,70
102-108	LB + CHCl ₃ (1:1)	1,00
109-120	LB + CHCl ₃ (1:1)	1,46
121-137	LB + CHCl ₃ (1:1, 2:3)	2,00
138-178	LB + CHCl ₃ (2:3, 1:4), CHCl ₃	8,75
179-201	CHCl ₃ , CHCl ₃ + EtOH (3:1, 1:1)	10,90



Obr. 19 TLC frakce 55-67

Skrze TLC byla ve frakci zjištěna přítomnost 5 alkaloidů po detekci s Dragendorffovým činidlem a UV 254 nm.

Parametry TLC: adsorbent SiO₂ 60 F254 (Merck), komora nasycená, mobilní fáze CH_x + DEA (90:10), počet vyvíjení 3x, dráha 9 cm (R_f – 0,41; 0,52; 0,69; 0,74; 0,89), detekce Dragendorffovo č. + UV 254 nm.



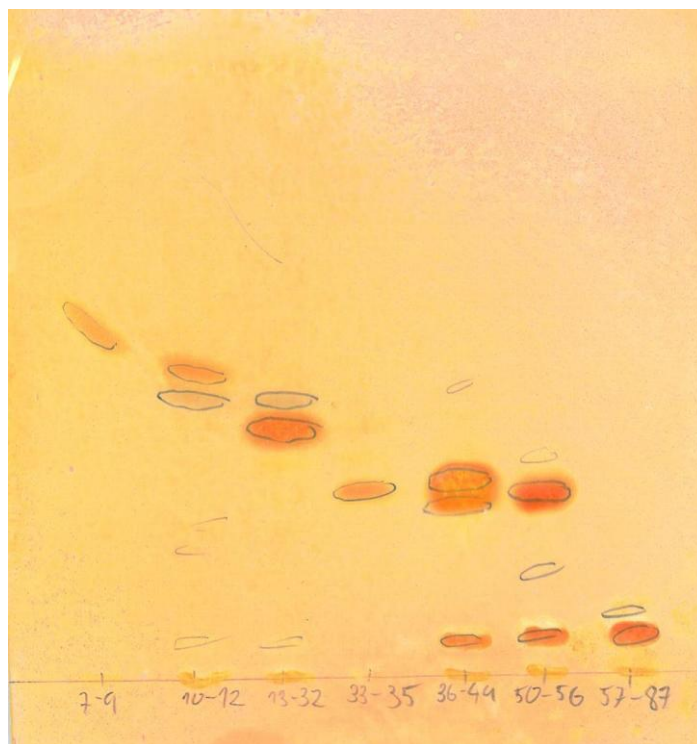
Obr. 20 GC-MS analýza frakce 55-67

- GC-MS analýza prokázala přítomnost 5 alkaloidů, porovnáním MS spekter s MS spektry v knihovně se 2 látky identifikovali jako stylopin a fumarilin. Zbývající 3 neznámé sloučeniny nemohly být identifikovány touto technikou, neboť spektra těchto látek nebyla nalezena v knihovně.

4.3.3.1 Čištění frakce č. 55-67 a její následné dělení na suchém sloupci

Frakce č. 55-67 byla přečištěna přes vrstvu neutrálního Al_2O_3 (ACROSS, velikost zrn 40-250 μm , deaktivovaného 6 % H_2O). Přečištěním bylo získáno 11,9 g extraktu. Přečištěná frakce přes Al_2O_3 byla separována sloupcovou chromatografií na Al_2O_3 (ACROSS, velikost zrn 40-250 μm , deaktivovaného 6 % H_2O , $m = 1130$ g; roztěr připraven ze stejného adsorbentu $m = 67$ g (1:6)). Výška sloupce adsorbentu = 26 cm, průměr = 7,4 cm, mrtvý objem $V = 900$ ml. Pro separaci byla použita gradientová stupňovitá eluce; mobilní fáze (MF): LB + CHCl_3 + DEA (90:10:5, 85:15:5, 80:20:5, 70:30:5, 60:40:5 a 40:60:5), průtok 10 ml/ min, frakce jímány po 100 ml.

Celkově bylo získáno 7 spojených podfrakcí. Separace byla monitorována TLC ($\text{CHx} + \text{To} + \text{DEA} - 70:20:10$). Celková hmotnost spojených frakcí byla 9,84 g.



Obr. 21 TLC jednotlivých spojených frakcí

Parametry TLC: adsorbent SiO₂ 60 F254 (Merck), komora nasycená, mobilní fáze CH_x + To + DEA (50:40:10), vyvíjeno 2x, dráha 10 cm, detekce Dragendorffovo č. + UV 254 nm

Tabulka 3 Podfrakce získané přečištěním původního extraktu

Spojené frakce	Mobilní fáze (LB+CHCl ₃ +DEA)	Hmotnost odparku (g)
7 - 9	90:10:5	0,105
10 - 12	90:10:5, 85:15:5	0,153
13 - 32	85:15:5	0,925
33 - 35	80:20:5	0,147
36 - 49	80:20:5, 70:30:5	3,996
50 - 56	60:40:5	2,797
57 - 87	40:60:5	1,160

4.3.3.2 Zpracování jednotlivých podfrakcí

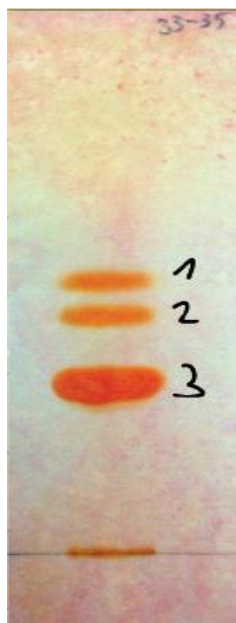
- *spojené podfrakce č. 7-9* (0,105 g)
 - krystalizací ze směsi CHCl₃ + EtOH bylo získáno 23,86 mg bílých, drobných krystalů látky JK-1.

- *spojené podfrakce č. 10-12* (0,153 g)
 - tato frakce nebyla zpracovávána, neboť obsahuje látku JK-1, která byla izolována z předešlé podfrakce v dostatečném množství pro biologické testy *in vitro*.

- *spojené podfrakce č. 13-32* (0,925 g)
 - z této frakce bylo získáno 400 mg bílých, drobných krystalů JK-2 krystalizací ze směsi EtOH + CHCl₃.

- *spojené podfrakce č. 33-35* (0,147 g)
 - spojená frakce byla podrobena preparativní TLC na komerčních deskách (Merck, síla vrstvy 0,2 mm). Počet desek 8, velikost 20 x 10 cm, soustava CH_x + DEA (95:5), počet vyvíjení 3x. Celkem byly získány 3 zóny (R_f - 0,47; 0,59; 0,71). Ze zóny 1 a 2 o m = 20,8 mg a 16,2 mg nebyly alkaloidy izolovány, protože podle GC-MS obsahovaly alkaloidy,

které byly izolovány v předchozích frakcích (JK-1 a JK-2). Ze zóny 3 byl získán krystalizací ze směsi EtOH + CHCl₃ alkaloid JK-3 (28,6 mg).



Obr. 22 3 zóny dělení podfrakce 33-35

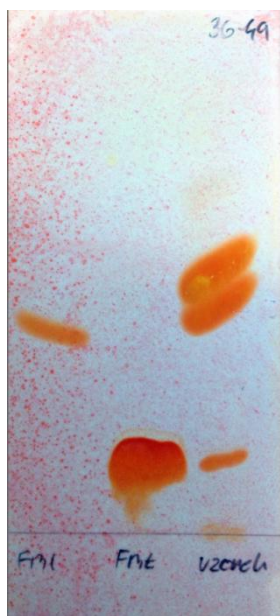
- *spojené podfrakce č. 36-49* (3,996 g)
- na základě TLC a GC-MS analýzy byly v této frakci zjištěny alkaloidy fumarilin, fumaricin a JK-3. Zpracování této podfrakce bylo zvoleno z důvodu, že v předchozí izolaci bylo látky JK-3 izolováno malé množství a tento alkaloid dosud nebyl z FO na Katedře farmaceutické botaniky a ekologie izolován.

Parametry TLC

- adsorbent SiO₂, komora nasycená, mobilní fáze CH_x + To + DEA (70 : 20 : 10),
vyvinuto 2x, dráha 10 cm (R_f – 0,25; 0,35; 0,45).

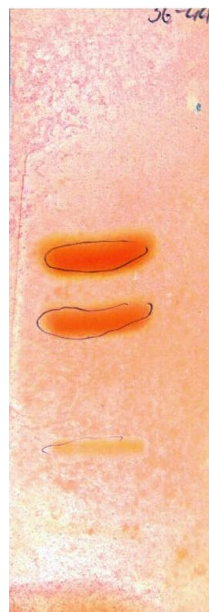
Zpracování a čištění eluátu

Frakce byla přečištěna na suchém sloupci (vrstva Al₂O₃ 10 cm, průměr sloupce 3 cm), takto bylo získáno 400 mg přečištěné frakce. Opakovanou krystalizací z EtOH + CHCl₃ bylo získáno 120 mg bílých, drobných krystalů JK-3.



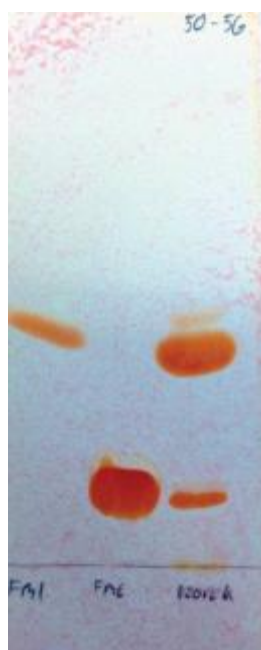
Obr. 23 TLC vzorku a standardů

(standardy: zkr. Fml – fumarilin, Fmc – fumaricin)



Obr. 24 podfrakce č. 36 - 49

- spojené podfrakce č. 50-56 a 57-87 (2,7973 g, 1,1597g)
- Podle TLC i GC-MS analýzy tyto frakce obsahovaly *fumarilin* a *fumaricin*. Tyto alkaloidy byly již dříve izolovány v rámci diplomové práce D. Kassemové a M. Šafratové^{5,130}. Z těchto spojených frakcí proto nebyly již izolovány.



Obr. 25 TLC podfrakce 50 – 56

4.4 Stanovení inhibičních aktivit izolovaných alkaloidů

4.4.1 Stanovení cholinesterasové inhibiční aktivity

Testy probíhali za následujících podmínek:

- teplota 37 °C
- v prostředí fosfátového pufru (pH 7,4)
- vlnová délka spektrofotometru 436 nm
- měření probíhalo v průsvitných multijamkových destičkách (96 jamek, Brand)

Pro stanovení IC_{50} se použila modifikovaná Ellmanova spektrofotometrická metoda s použitím 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoové kyseliny.

Hodnoty IC_{50} byly vypočítány z naměřených hodnot poklesu aktivity acetylcholinesterasy nebo butyrylcholinesterasy nelineární regresí v programu GraphPaD Prism (verze 3.02 pro Windows; Graph PaD Software, San Diego, CA, USA). Výsledky byly porovnány s hodnotami IC_{50} známých inhibitorů cholinesteras: galataminem ($IC_{50 \text{ AChE}} = 1,71 \pm 0,07 \mu\text{M}$, $IC_{50 \text{ BuChE}} = 42,30 \pm 1,30 \mu\text{M}$), Hup A ($IC_{50 \text{ AChE}} = 0,033 \pm 0,001 \mu\text{M}$, $IC_{50 \text{ BuChE}} > 1000 \mu\text{M}$), fysostigmin ($IC_{50 \text{ AChE}} = 0,063 \pm 0,001 \mu\text{M}$, $IC_{50 \text{ BuChE}} = 0,130 \pm 0,004 \mu\text{M}$).

I (inhibice) byla počítána dle vzorce:

$$I_{(\%)} = 100 - \left(\frac{\Delta A_{BL}}{\Delta A_{SA}} \right) * 100$$

kde ΔA_{BL} je nárůst absorbance slepého vzorku za 1 minutu, ΔA_{SA} je nárůst absorbance měřeného vzorku.

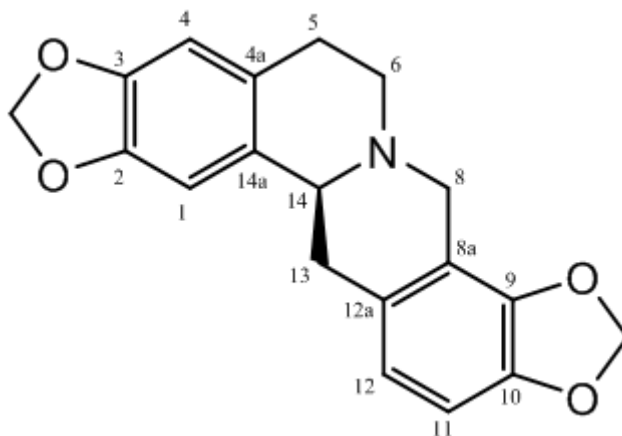
4.4.2 Stanovení prolyl oligopeptidasové inhibiční aktivity

POP byla rozpuštěna ve fyziologickém roztoku pufrovaném fosfátovým pufrům (PBS : 0,01 M Na/K, fosfátového pufru - pH7,4, obsahujícím 137 mM NaCl a 2,7 mM KCl), specifická aktivita pro enzym byla 0,2 U/ml. Pro testy byly použity standardní, polystyrenové, 96 jamkové mikrotitrační destičky s plochým a průhledným dnem (Brand). Zásobní roztoky testovaných sloučenin byly připraveny v DMSO (10 mM). POP substrát, Z-Gly-Pro-*p*-nitroanilid, se rozpustil v 40 % 1,4 – dioxanu (10 mM). Pro každou reakci byly PBS (170 μl), testovaná sloučenina (5 μl) a roztok POP (5 μl) inkubovány po dobu 5 minut při teplotě 37 °C. Po té se přidá substrát (20 μl) a mikrotitrační destička byla posléze inkubována po dobu 30 minut při teplotě 37 °C. Tvorba *p*-nitroanilinu byla přímo úměrná aktivitě POP a byla

měřena spektrofotometricky při 405 nm za použití mikrotitračního detektoru ELISA (EL800, Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA). Inhibiční účinnost testovaných sloučenin byla vyjádřena jako hodnoty IC_{50}^{131} .

5 Výsledky

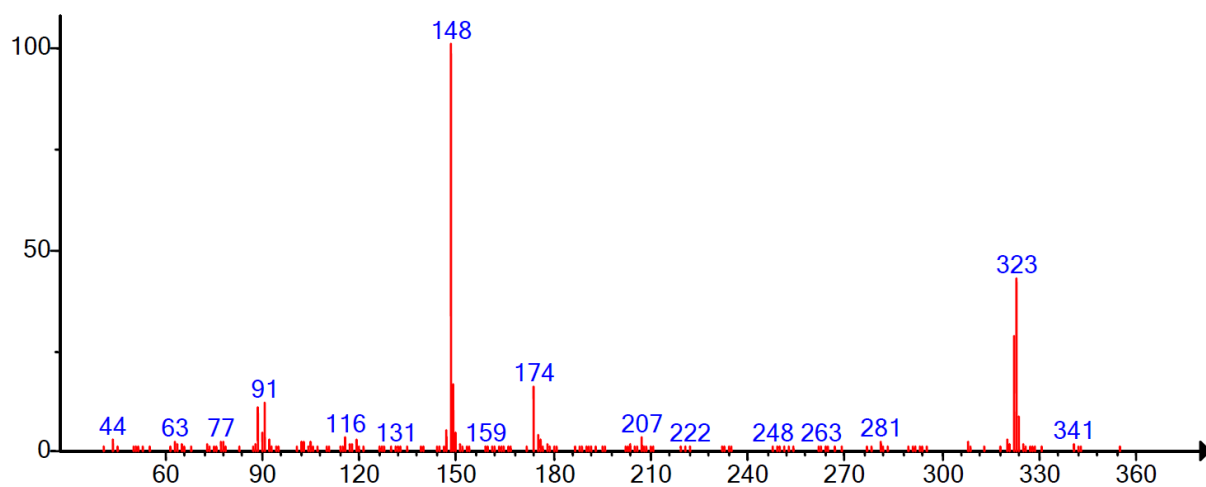
5.1 Strukturní analýza (-)-stylopinu (JK-1)



Obr. 26 (-)-stylopin

5.1.1 MS (-)-stylopinu

EI-MS (m/z) 323(42), 322(28), 174(16), 148(100), 91(12), 89(11)

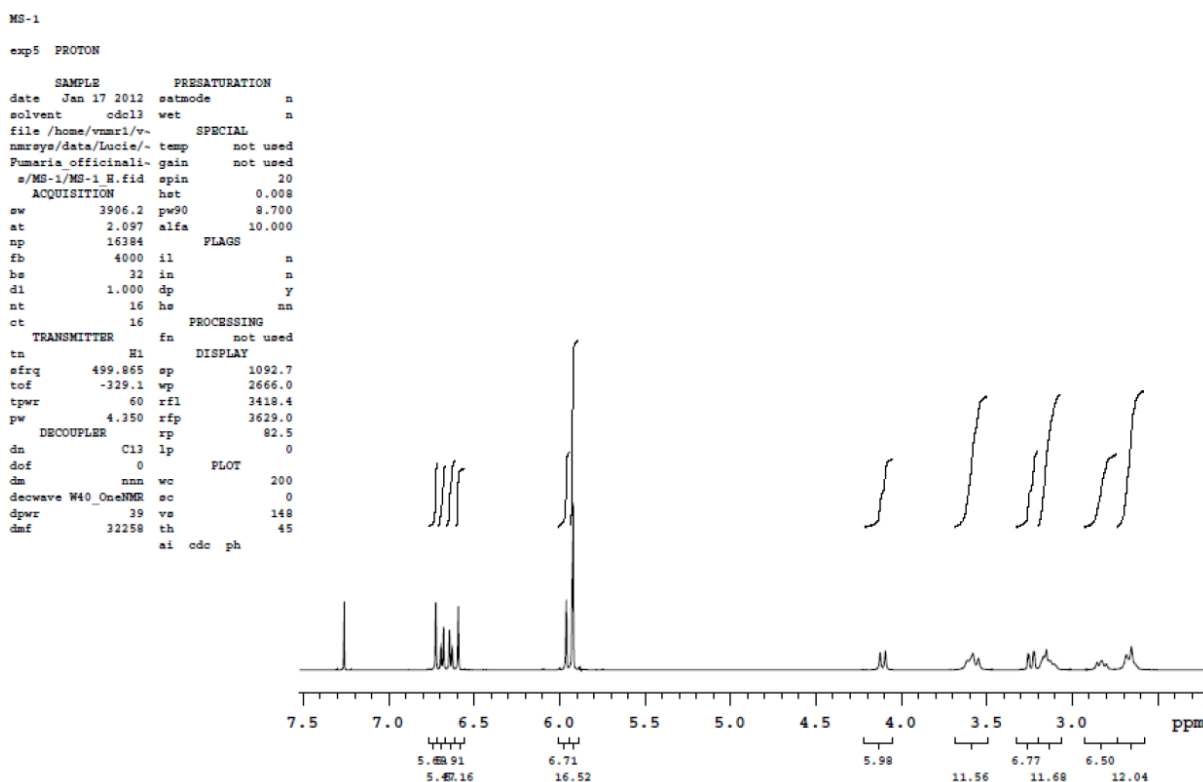


Obr. 27 EI-MS (-)-stylopinu

5.1.2 NMR (-)-stylopinu

Struktura (-)-stylopinu byla určena na základě výsledků ^1H - a ^{13}C -NMR spekter a jejich srovnání s literaturou¹³²

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): 6.72 (1H, s, H1), 6.69 (1H, d, *J* = 8.5 Hz, H11), 6.64 (1H, d, *J* = 8.5 Hz, H12), 6.59 (1H, s, H4), 5.96-5.92 (4H, m, 2xOCH₂O), 4.11 (1H, d, *J* = 15.1 Hz, H8), 3.61-3.56 (2H, m, H8, H14), 3.24 (1H, dd, *J* = 16.5, 3.6 Hz, H13), 3.19-3.09 (2H, m, H5, H6), 2.83 (1H, dd, *J* = 16.5, 11.0 Hz, H13), 2.70-2.62 (2H, m, H5, H6).



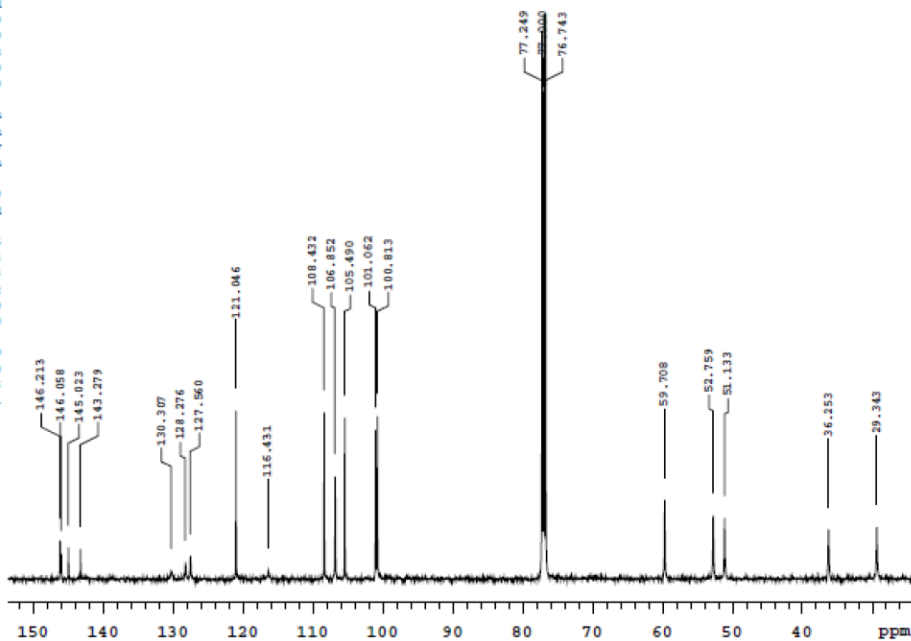
Obr. 28 ¹H NMR spektrum (-)-stylopinu

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): 146.2 (C3), 146.1 (C2), 145.0 (C10), 143.3 (C9), 130.3 (C14a), 128.3 (C12a), 127.6 (C4a), 121.0 (C12), 116.4 (C8a), 108.4 (C4), 106.9 (C11), 105.5 (C1), 101.1 (C9OCH₂OC10), 100.8 (C2OCH₂OC3), 59.7 (C14), 52.8 (C8), 51.1 (C6), 36.3 (C13), 29.3 (C5).

MS-1

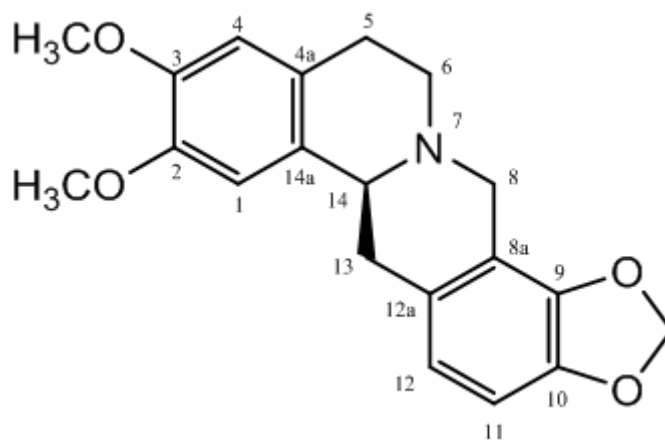
exp5 CARBON

```
SAMPLE      PRESATURATION
date Jan 17 2012 satmode n
solvent cdcl3 wet n
file /home/vnmr1/v-
naraya/data/Lucio/- temp not used
Fumaria_officiali- gain 30
s/MS-1/MS-1_C.rid spin 20
ACQUISITION hst 0.008
sw 32051.3 pw90 10.400
at 1.022 alfa 10.000
np 65536 FLAGS
fb 17000 il n
bs 64 in n
dl 5.000 dp y
nt 2000 hs nn
ct 2000 PROCESSING
TRANSMITTER lb 4.00
tn C13 fn not used
sfrq 125.705 DISPLAY
tor 1913.9 sp 2955.5
tpwr 56 wp 16354.3
pw 10.400 rfl 11881.3
DECOUPLER rfp 9678.2
dn H1 rp -72.0
dof 0 lp 0
dm YYY PLOT
dscwava w wc 200
dpwr 40 sc 0
dmr 11293 vs 87496
th 1
al odc ph 1
```



Obr. 29 ^{13}C NMR spektrum (-)-stylopinu

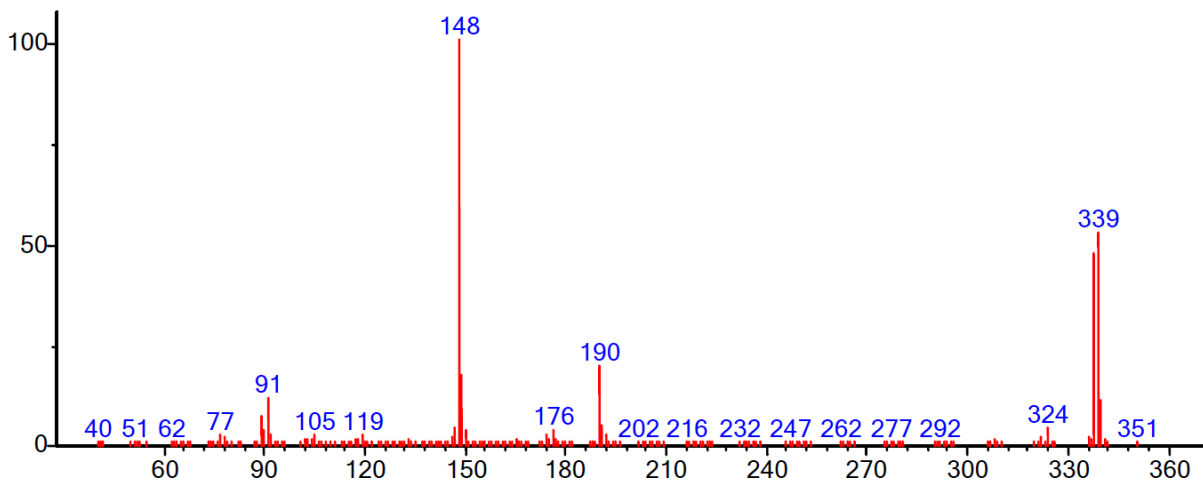
5.2 Struktúrní analýza (-)-sinaktinu (JK-2)



Obr. 30 (-)-sinaktin

5.2.1 MS (-)-sinaktinu

EI-MS (m/z) 339(54), 338(49), 324(5), 190(20), 148(100), 91(11), 89(7).



Obr. 31 EI-MS (-)-sinaktinu

5.2.2 NMR (-)-sinaktinu

Struktura (-)-sinaktinu byla určena na základě výsledků ^1H - a ^{13}C -NMR spekter a jejich srovnání s literaturou¹³³.

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): 6.73 (1H, s, H1), 6.69 (1H, d, $J = 8.2$ Hz, H11), 6.65 (1H, d, $J = 8.2$ Hz, H12), 6.62 (1H, s, H4), 5.96 (1H, d, $J = 1.5$ Hz, OCH_2O), 5.92 (1H, d, $J = 1.5$ Hz, OCH_2O), 4.12 (1H, d, $J = 14.9$ Hz, H8), 3.89 (3H, s, $\text{C2} - \text{OCH}_3$), 3.87 (3H, s, $\text{C3} - \text{OCH}_3$), 3.63 (1H, brd, $J = 10.2$ Hz, H14), 3.57 (1H, d, $J = 14.9$ Hz, H8), 3.28 (1H, dd, $J = 15.9, 3.7$ Hz, H13), 3.22-3.11 (2H, m, H5, H6), 2.84 (1H, dd, $J = 15.9, 10.9$ Hz, H13), 2.73-2.63 (2H, m, H5, H6).

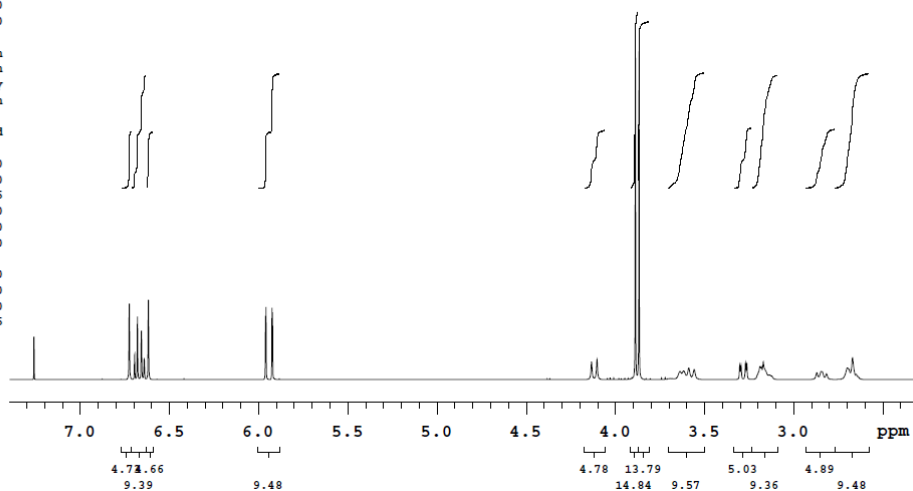
5/067

exp68 PROTON

```

SAMPLE      PRESATURATION
date Dec 17 2012 satmode n
solvent cdcl3 wet n
file /home/vnmr1/v- SPECIAL
nmrsva/data/Lucie/- temp 25.0
Fumaria_officinali- gain 30
s/5-067/5-067_H.f1- spin 20
d hst 0.008
ACQUISITION pw90 9.100
sw 4251.7 alfa 10.000
at 1.927
np 16384 il FLAGS
fb 4000 in n
bs 1 dp y
dl 3.000 hs nn
nt 32 PROCESSING
ct 32 fn not used
TRANSMITTER H1 sp DISPLAY
tn 1157.0
sfrq 499.865 wp 2539.0
tof -504.5 rfl 3767.5
tpwr 60 rfp 3629.0
pw 4.550 rp 83.0
DECOUPLER c13 lp 0
dn 0 wc PLOT
dof 0 wc 200
dm nnn sc 0
decwave W40_OneNMR- vs 50
_W018 th 45
dpwr 37 ai cdc ph
dmf 32258

```



Obr. 32 ^1H NMR (-)-sinaktinu

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3): 147.5 (C3), 147.4 (C2), 145.0 (C10), 143.3 (C9), 129.3 (C14a), 128.4 (C12a), 126.6 (C4a), 121.0 (C12), 116.6 (C8a), 111.3 (C4), 108.5 (C1), 106.8 (C11), 101.0 (OCH_2O), 59.4 (C14), 56.8 (C2 – OCH_3), 55.8 (C3 – OCH_3), 52.9 (C8), 51.3 (C6), 36.2 (C13), 28.9 (C5).

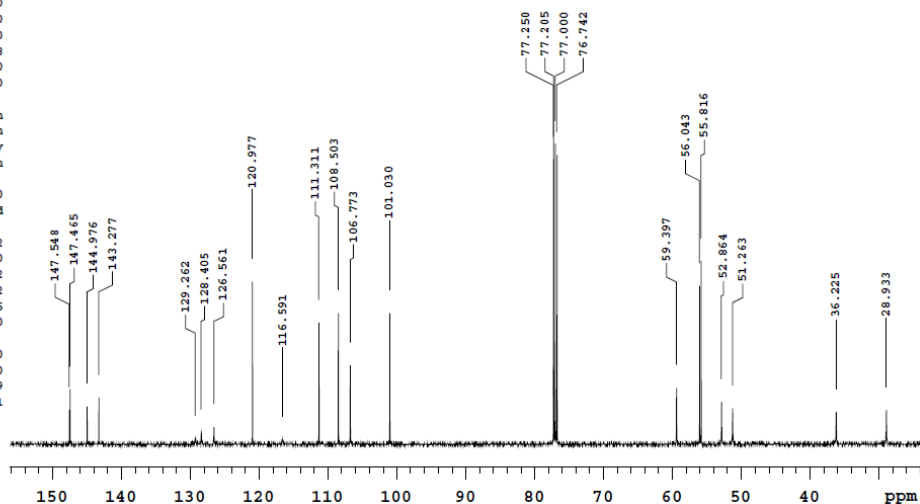
5/067

exp68 CARBON

```

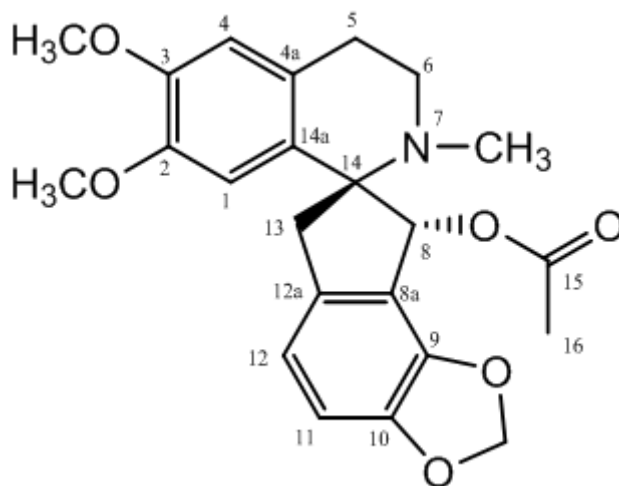
SAMPLE          PRESATURATION
date   Dec 17 2012  satmode      n
solvent  cdcl3  wet            n
file /home/vnmr1/v- SPECIAL
nmrsys/data/Lucie/- temp      25.0
Fumaria_officinali- gain      30
s/5-067/5-067_c.fi- spin     20
              d   hst      0.008
ACQUISITION  pw90     11.300
sw          31250.0  alfa     10.000
at          1.049          FLAGS
np          65536  il            n
fb          17000  in            n
bs          16     dp            y
dl          3.000  hs            nm
nt          3000          PROCESSING
ct          3000  lb            1.00
TRANSMITTER  fn      not used
tn          C13          DISPLAY
sfrq       125.705  sp      2947.2
tof        1913.9  wp      16675.0
tpwr       55     rfl     11483.2
pw         5.650  rfp     9678.2
DECOUPLER  rp      -75.5
dn          H1  lp            0
dof         0          PLOT
dm          YYY  wc           200
decwave    w    sc            0
dpwr       41    vs     20289
dmf        12346  th            1
ai          cdc  ph

```



Obr. 33 ^{13}C NMR (–)-sinaktinu

5.3 Strukturní analýza (–)-*O*-methylfumarofycinu (JK-3)

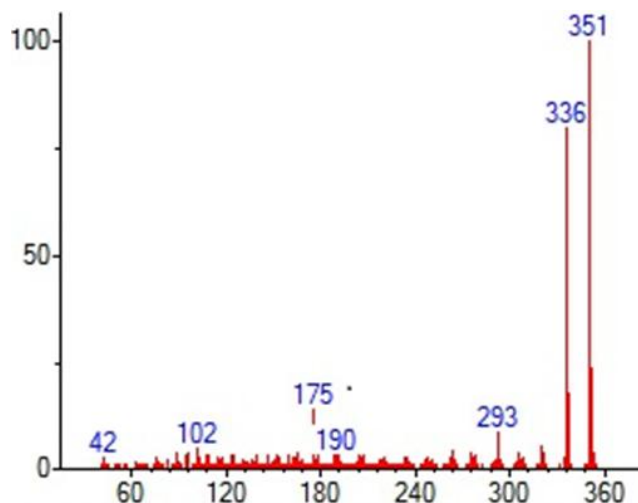


Obr. 34 (–)-*O*-methylfumarofycin

5.3.1 MS (–)-*O*-methylfumarofycinu

EI-MS (m/z) 351(100), 336(80), 293(10), 175(15), 102(5), 42(3)

ESI-MS (m/z) 412(35), 370(5), 352(100), 321(13), 309(4), 291(6).



Obr. 35 EI-MS (-)-*O*-methylfumarofycinu

5.3.2 NMR (-)-*O*-methylfumarofycinu

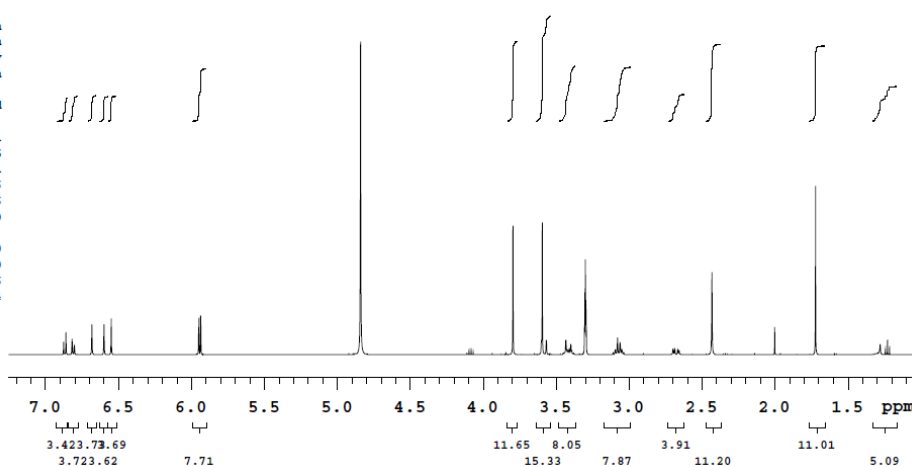
Struktura (-)-*O*-methylfumarofycinu byla určena na základě výsledků ^1H - a ^{13}C -NMR spekter a jejich srovnání s literaturou¹³².

^1H NMR (500 MHz, CD_3OD): 6.87 (1H, d, $J = 7.9$ Hz, H11), 6.81 (1H, d, $J = 7.9$ Hz, H12), 6.68 (1H, s, H4), 6.60 (1H, s, H8), 6.55 (1H, s, H1), 5.96 (1H, d, $J = 1.5$ Hz, OCH_2O), 5.93 (1H, d, $J = 1.5$ Hz, OCH_2O), 3.80 (3H, s, C3 – OCH_3), 3.60 (3H, s, C2 – OCH_3), 3.58 (1H, d, $J = 17.1$ Hz, H13A), 3.46-3.37 (2H, m, H6, H13B), 3.12-3.03 (2H, m, H5, H6), 2.68 (1H, dd, $J = 15.7, 6.0$ Hz, H5), 2.43 (3H, s, N – CH_3), 1.72 (3H, s, H16).

FO_55-67-36-46-1 CD3OD

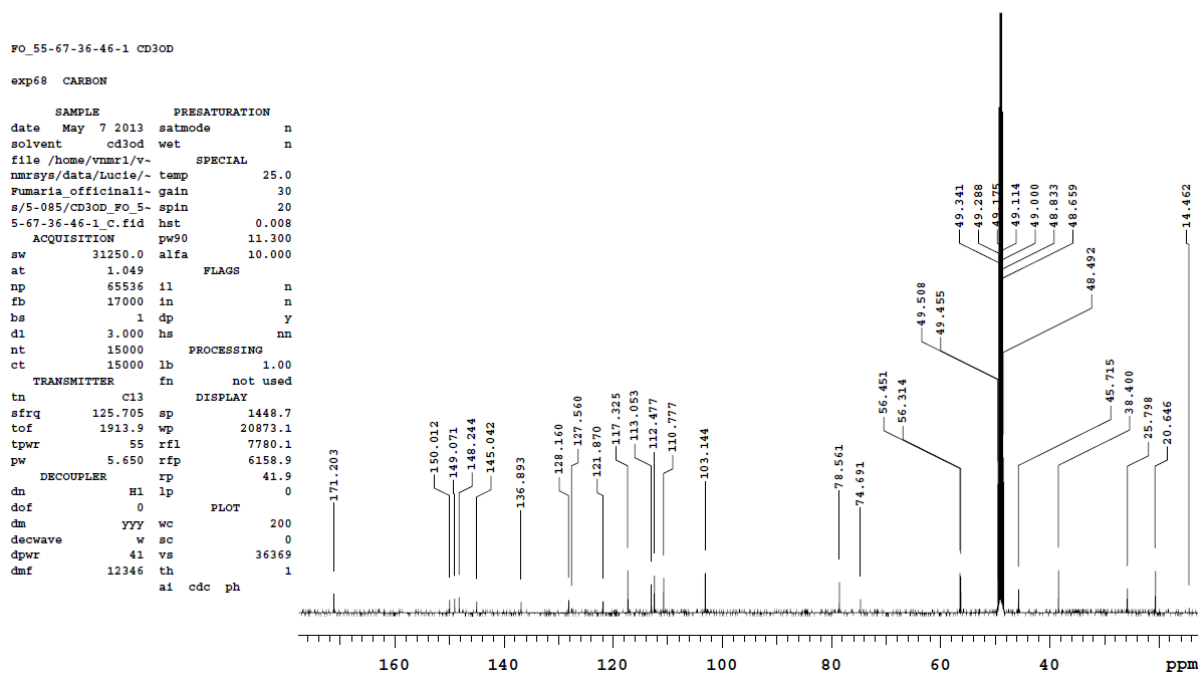
exp68 PROTON

SAMPLE		PRESATURATION	
date	May 7 2013	satmode	n
solvent	cd3od	wet	n
file	/home/vnmr1/v-	SPECIAL	
nmrsys/data/Lucie/v-	temp	25.0	
Fumaria_officinali-	gain	30	
s/5-085/CD3OD_PO_5-	spin	20	
5-67-36-46-1_H.fid	hst	0.008	
ACQUISITION		pw90	9.100
sw	4111.8	alfa	10.000
at	1.992	FLAGS	
np	16384	il	n
fb	4000	in	n
bs	32	dp	y
d1	1.000	hs	nn
nt	16	PROCESSING	
ct	16	fn	not used
TRANSMITTER		DISPLAY	
tn	H1	sp	499.1
sfrq	499.867	wp	3125.5
tof	-230.5	rfl	1445.1
tpwr	60	rfp	1649.6
pw	4.550	rp	-123.6
DECOUPLER		lp	0
dn	C13	PLOT	
dof	0	wc	200
dm	nnn	sc	0
decwave	W40_OneNMR-	vs	96
	_W018	th	24
dpwr	37	ai	cdc ph
dmf	32258		



Obr. 36 ^1H NMR (-)-*O*-methylfumarofycinu

^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD): 171.2 (C15), 150.0 (C3), 149.1 (C10), 148.2 (C2), 145.0 (C9), 136.9 (C12a), 128.2 (C4a), 127.6 (C14a), 121.9 (C8a), 117.3 (C12), 113.1 (C1), 112.5 (C4), 110.8 (C11), 103.1 (OCH₂O), 78.6 (C8), 74.7 (C14), 56.5 (C2 – OCH₃), 56.3 (C3 – OCH₃), 48.8 (C6), 45.7 (C13), 38.4 (N7 – CH₃), 25.8 (C5), 20.6 (C16).



Obr. 37 ^{13}C NMR (–)-*O*-methylfumarofycinu

5.4 Specifická optická otáčivost

Tabulka 4 Hodnoty specifické otáčivosti izolovaných alkaloidů

Alkaloid	Specifická optická otáčivost $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$
(–)-sinaktin	-347,7°; c 0,532 (CHCl_3)
(–)-stylopin	-120,5; c 0,024 (CHCl_3)
(–)- <i>O</i> -methylfumarofycin	-53,6 °; c 0,224 (CHCl_3)

5.5 Teploty tání

Tabulka 5 Hodnoty teploty tání izolovaných alkaloidů

Alkaloid	Teplota tání
(-)-sinaktin	174-175 °C
(-)-stylopin	206-207 °C
(-)- <i>O</i> -methylfumarofycin	122-124 °C

5.6 Výsledky inhibičních aktivit

Tabulka 6 Výsledky hodnot IC₅₀ izolovaných alkaloidů na AChE, BuChE a POP

	IC ₅₀ AChE (μM)	IC ₅₀ BuChE (μM)	IC ₅₀ POP
(-)-sinaktin	632,0 ± 68,12	8154,3 ± 981,42	52,9 ± 1,8 (μM)
(-)-stylopin	>1000	>1000	>1000 (mM)
(-)- <i>O</i> -methylfumarofycin	963,10 ± 135,98	1771,0 ± 380,94	neměřeno
Galanthamin	1,71 ± 0,07	42,30 ± 1,30	0
HupA	0,033 ± 0,001	>1000	0
fysostigmin	0,063 ± 0,001	0,130 ± 0,004	0
bajkalin	0	0	0,610 ± 0,021 (mM)
Z-Gly-Pro- <i>p</i> -nitroanilid	0	0	3,27 ± 0,02 (nM)

6 Diskuze

Mezi dnes nejčastěji používané léčivé látky pro léčbu AD patří inhibitory AChE. Podle nejnovějších studií se však prokázal i vliv BuChE na rozvoj AD, proto se výzkum v současnosti zaměřuje na potencionální inhibitory obou enzymů.

Alkaloidní extrakt z *F. officinalis* L. (*Fumariaceae*) vykazoval na základě screeningové studie (bioguided assay), provedené na katedře Farmaceutické botaniky a ekologie Faf UK, perspektivní inhibiční aktivitu vůči AChE a BuChE. Testování bylo provedeno Ellmanovou spektrofotometrickou metodou *in vitro*, inhibiční aktivita sumárního alkaloidního extraktu vůči AChE byla $IC_{50} = 39,2 \pm 1,96 \mu\text{g/ml}$ a BuChE $IC_{50} = 40,32 \pm 1,9 \mu\text{g/ml}$.

Cílem této diplomové práce bylo izolační zpracování spojené frakce č. 55-67 (A_2). Podle TLC byla ve frakci prokázána pomocí UV detekce přítomnost pět látek, které po reakci s Dragendorffovým činidlem byly detekovány jako alkaloidy. Tři látky byly z frakce izolovány v čisté formě, v množství umožňujícím jejich identifikaci, za použití sloupcové chromatografie, preparativní TLC a krystalizace. Zbylé dvě látky, (+)-fumarilin a (-)-fumaricin přítomné v této frakci nebyly izolovány, neboť byly izolovány z FO dříve D. Kassemovou a M. Šafratovou^{5,130}. Z látek, které byly izolovány, se biologická aktivita vůči lidským cholinesterasám (AChE a BuChE) a POP měřila u (-)-*O*-methylfumarofycinu, (-)-sinaktinu a (-)-stylopinu. Látky byly určeny pomocí GC-MS, NMR, optické otáčivosti a teploty tání.

První alkaloid, (-)-*O*-methylfumarofycin patří mezi spirobenzylisochinolinové alkaloidy a byl izolován pouze z rodu *Fumaria*. Byl identifikován například u druhu *Fumaria bastardi*, *Fumaria officinalis*, *Fumaria parviflora* a *Fumaria vaillantii*¹³⁴. Druhý alkaloid, (-)-sinaktin patří mezi protoberberinové alkaloidy a byl již dříve z této rostliny izolován. Látka byla dále identifikována v čeledích *Menispermaceae* (*Sinomenium acutum*) a *Papaveraceae* (rod *Corydalis*)¹³⁵. Třetí alkaloid, (-)-stylopin patří také mezi protoberberinové alkaloidy, který byl již dříve z *F. officinalis* izolován. Jeho přítomnost byla zjištěna i u dalších druhů rodu *Fumaria parviflora*, *Fumaria schleicheri* a *Fumaria vaillantii* a také v čeledi *Papaveraceae* (*Papaver rhoeas*, *Chelidonium majus*, *Corydalis bractea*, *Corydalis emanuelii*, *Corydalis stricta*)¹³⁶.

Inhibiční aktivita zmíněných alkaloidů vůči sérové BuChE, erytrocytární AChE byla stanovena *in vitro* Ellmanovou spektrofotometrickou metodou s použitím 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoové kyseliny a byla porovnána s inhibiční aktivitou standardů (galanthaminem, HupA, fyzostigminem). Galanthamin, jež se terapeuticky používá v terapii AD je silným

inhibitorem AChE ($IC_{50} \text{ AChE} = 1,71 \pm 0,07 \mu\text{M}$), inhibuje také BuChE ($IC_{50} \text{ BuChE} = 42,03 \pm 1,30 \mu\text{M}$). HupA, který je ve 2. fázi klinického zkoušení, vykazuje selektivní inhibici AChE ($IC_{50} \text{ AChE} = 0,033 \pm 0,001 \mu\text{M}$). HupA je vůči BuChE zcela neaktivní ($IC_{50} \text{ BuChE} > 1000 \mu\text{M}$). Fyzostigmin, který se v terapii AD již nepoužívá z důvodů silných nežádoucích účinků, byl vybrán jako standard pro inhibici AChE i BuChE ($IC_{50} \text{ AChE} = 0,063 \pm 0,001 \mu\text{M}$ a $IC_{50} \text{ BuChE} = 0,130 \pm 0,004 \mu\text{M}$). U (-)-stylopinu byly naměřené hodnoty IC_{50} vůči AChE a BuChE vyšší než 1000 μM , a byl tak shledán vůči cholinesterasám zcela neaktivní. (-)-*O*-methylfumarofycin vykazoval oproti cholinesterasám velmi slabou aktivitu ($IC_{50} \text{ AChE} = 963,10 \pm 135,98 \mu\text{M}$, $IC_{50} \text{ BuChE} = 1771,0 \pm 380,94 \mu\text{M}$). (-)-*O*-methylfumarofycin byl na cholinesterasovou inhibiční aktivitu testován poprvé. Nejlepší cholinesterasovou inhibiční aktivitu vykazoval (-)-sinaktin ($IC_{50} \text{ AChE} = 632,0 \pm 68,12 \mu\text{M}$, $IC_{50} \text{ BuChE} = 8154,3 \pm 981,42 \mu\text{M}$) nicméně z hlediska inhibice AChE se jedná téměř o neaktivní sloučeninu a nelze ji označit jako perspektivní inhibitor AChE.

Jako standardy při měření inhibiční aktivity vůči POP byly použity syntetická látka Z-Gly-Pro-*p*-nitroanilid ($IC_{50} \text{ POP} = 3,27 \pm 0,02 \text{ nM}$) a přírodní flavonoid bajkalin ($IC_{50} \text{ POP} = 0,610 \pm 0,021 \text{ mM}$). U (-)-stylopinu nabývaly hodnoty inhibiční aktivity proti POP (IC_{50}) větších než 1000 mM takže v tomto případě lze označit látku za neaktivní. Výsledek biologická aktivity (-)-*O*-methylfumarofycinu vůči POP není dosud znám, v současné době probíhá měření inhibiční aktivity vůči POP na pracovišti FVZ UO v HK. Výsledky inhibiční aktivity oproti POP u (-)-sinaktinu však dosahovaly velmi slibných hodnot ($IC_{50} \text{ POP} = 52,9 \pm 1,8 \mu\text{M}$). (-)-sinaktin vykazuje mnohem vyšší inhibiční aktivitu než použitý standard (bajkalin $IC_{50} \text{ POP} = 0,610 \pm 0,021 \text{ mM}$), nicméně aktivita byla nižší než u syntetické látky Z-pro-prolinal ($IC_{50} \text{ POP} = 3,27 \pm 0,02 \text{ nM}$).

Na závěr lze říci, že žádný z izolovaných alkaloidů nevykazoval lepší inhibiční aktivitu oproti cholinesterasám než standardy. A je zřejmé, že nejsou zodpovědné za inhibiční aktivitu sumárního alkaloidního extraktu. U POP se (-)-sinaktin jeví jako velmi aktivní látka, která vykazovala mnohem větší inhibiční aktivitu než použitý standard bajkalin. Přestože, až vyjímku ((-)-sinaktin), byly izolované látky neaktivní v *in vitro* testech na inhibici AChE, BuChE a POP, nelze je úplně zavrhnout z hlediska potenciální perspektivity v terapii AD, neboť tyto látky budou testovány na biologické aktivity v dalších *in vitro* testech (např. inhibice β -sekretasy a GSK-3 β).

7 ABSTRAKTY

Abstrakt

Kostelník J.: Studium biologické aktivity alkaloidů izolovaných z *Fumaria officinalis* L. (Fumariaceae) I. Diplomová práce, Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra farmaceutické botaniky a ekologie, Hradec Králové 2014, 63 s.

Cílem diplomové práce bylo izolační zpracování spojené frakce č. 55-67 (A₂) získané ze sumárního alkaloidního extraktu rostliny *Fumaria officinalis* L. (Fumariaceae). Za pomoci chromatografických metod byly izolovány tři alkaloidy, které byly dále identifikovány pomocí strukturní analýzy (GC-MS, NMR). Tyto tři alkaloidy byly určeny běžnými chromatografickými metodami a poté byly identifikovány na základě strukturní analýzy, optické otáčivosti a teploty tání jako (-)-*O*-methylyfumarofycin, (-)-sinaktin a (-)-stylopin.

U izolovaných látek byla stanovena inhibiční aktivita vůči lidské erytrocytární acetylcholinesterase, lidské sérové butyrylcholinesterase a prolyl oligopeptidase. Naměřené hodnoty byly vyjádřeny jako hodnoty IC₅₀ ((-)-stylopin: IC₅₀ AChE a IC₅₀ BuChE > 1000 μM, IC₅₀ POP > 1000 mM; (-)-*O*-methylyfumarofycin: IC₅₀ AChE = 963,10 ± 135,98 μM, IC₅₀ BuChE = 1771,0 ± 380,94 μM, IC₅₀ POP – neměřena; (-)-sinaktin IC₅₀ AChE = 632,0 ± 68,12 μM, IC₅₀ BuChE = 8154,3 ± 981,42 μM, IC₅₀ POP = 52,9 ± 1,8 μM). Žádný z izolovaných alkaloidů nevykazoval lepší inhibiční aktivitu oproti cholinesterasám v porovnání s galanhtaminem (IC₅₀ AChE = 1,71 ± 0,07 μM, IC₅₀ BuChE = 42,03 ± 1,30 μM), huperzinem A (IC₅₀ AChE = 0,033 ± 0,001 μM, IC₅₀ BuChE > 1000 μM) a fyzostigminem (IC₅₀ AChE = 0,063 ± 0,001 μM, IC₅₀ BuChE = 0,130 ± 0,004 μM). A je zřejmé, že nejsou zodpovědné za inhibiční aktivitu sumárního alkaloidního výtřepku (IC₅₀ AChE = 39,2 ± 1,96 μg/ml, IC₅₀ BuChE = 40,32 ± 1,9 μg/ml). Ve studii zaměřené na inhibici POP se (-)-sinaktin (IC₅₀ POP = 52,9 ± 1,8 μM) jeví jako velmi aktivní látka, která vykazovala mnohem větší inhibiční aktivitu než použitý standard bajkalin (IC₅₀ POP = 0,610 ± 0,021 mM), ale menší aktivitu než Z-pro-prolinal (IC₅₀ POP = 3,27 ± 0,02 nM).

Klíčová slova: acetylcholinesterasa, Alzheimerova choroba, butyrylcholinesterasa, *Fumaria officinalis* L, prolyl oligopeptidasa.

Abstract

Kostelník, J.: Study of biological activity of alkaloids isolated from *Fumaria officinalis* L. (Fumariaceae) I. Diploma thesis, Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Department of Pharmaceutical Botany and Ecology, Hradec Králové 2014, 63 p.

The aim of this study was to isolate alkaloids from joined fraction no. 55-67 (A2) obtained from the total alkaloid fraction of extract of *Fumaria officinalis* L. (Fumariaceae) plant. Using chromatography methods three alkaloids were isolated and then identified by structural analysis (GC-MS, NMR). Three alkaloids were isolated by using common chromatographic methods and then identified by structural analyses optical rotation and melting point as (–)-*O*-methylfumarophycine, (–)-sinactine and (–)-stylophine.

Inhibitory activity of isolated alkaloids was assessed against human erythrocyte acetylcholinesterase, human butyrylcholinesterase and prolyl oligopeptidase. The results were expressed as IC₅₀ values ((–)-stylophine: IC₅₀ AChE and IC₅₀ BuChE > 1000 μM, IC₅₀ POP > 1000 mM; (–)-*O*-methylfumarophycine: IC₅₀ AChE = 963.10 ± 135.98 μM, IC₅₀ BuChE = 1771.0 ± 380.94 μM, IC₅₀ POP – unmeasured; (–)-sinactine IC₅₀ AChE = 632.0 ± 68.12 μM, IC₅₀ BuChE = 8154.3 ± 981.42 μM, IC₅₀ POP = IC₅₀ POP = 52.9 ± 1.8 μM). None of alkaloids isolated showed better inhibitory activity against cholinesterases than galantamine (IC₅₀ AChE = 1.71 ± 0.07 μM, IC₅₀ BuChE = 42.03 ± 1.30 μM), huperzine A (IC₅₀ AChE = 0.033 ± 0.001 μM, IC₅₀ BuChE > 1000 μM) and physostigmine (IC₅₀ AChE = 0.063 ± 0.001 μM, IC₅₀ BuChE = 0.130 ± 0.004 μM). And it's obvious they are not responsible for inhibitory activity of the total alkaloid fraction (IC₅₀ AChE = 39.2 ± 1.96 μg/ml, IC₅₀ BuChE = 40.32 ± 1.9 μg/ml). At POP (–)-sinactine (IC₅₀ POP = 52.9 ± 1.8 μM) appears to be very active, with inhibitory activity exceeding inhibitory activity of the standard baicalin (IC₅₀ POP = 0.610 ± 0.021 mM), but not as strong as *Z*-pro-prolinol (IC₅₀ POP = 3.27 ± 0.02 nM).

Key words: acetylcholinesterase, Alzheimer's disease, butyrylcholinesterase, *Fumaria officinalis* L., prolyl oligopeptidase.

8 CITACE

- ¹ Mukherjee, P. K., Kumar, V., Mal, M., Houghton, P. J. Acetylcholinesterase inhibitors from plants. *Phytomedicine*, 14(4), 289-300, 2007.
- ² Rafii, M. S., Walsh, S., Little, J. T., Behan, K., Reynolds, B., Ward, C. Aisen, P. S.. A phase II trial of huperzine A in mild to moderate Alzheimer disease. *Neurology*, 76(16), 1389-1394, 2011.
- ³ Jiráček, R., & Slova, K. Farmakoterapie Alzheimerovy choroby, *Praktické lékařství*, 2008.
- ⁴ Koukolík, F., Jiráček, R.: Alzheimerova nemoc a další demence. Vyd. 1. Praha, Grada, Avicenum. 1998.
- ⁵ Kassemova, D.: Biologicky aktivní metabolity rostlin. 9. Alkaloidy *Fumaria officinalis* L. a jejich biologická aktivita, 2013.
- ⁶ Lincová, Dagmar, and Hassan Farghali. *Základní a Aplikovaná Farmakologie* 1. vyd. Praha: Galén, 2002.
- ⁷ Fratiglioni, L: Epidemiologi of Alzheimer disease and current possibilities for prevention, *Acta Neurol. Scand.*, suppl. 165, 33-40, 1996.
- ⁸ Letenneur, L – Commenges. D. – Dartigues, J. F. – Berberger-Gateau, P.: Incidence of dementia and Alzheimer's disease in elderly community residents of South-Western France, *Int. J. Epidemiol.* 23, 1256-1261, 1994.
- ⁹ Salib, E. – Hillier, V: A case-control study of Alzheimer's disease and aluminium occupation. *Br. J. Psychiatry* 168, s. 244-249, 1996.
- ¹⁰ Jiráček, R., & Koukolík, F. *Demence: neurobiologie, klinický obraz, terapie*. Galén, 2004.
- ¹¹ Bayles, Kathryn A.; Kaszniak, Alfred W.; Tomoeda, Cheryl K. *Communication and cognition in normal aging and dementia*. College-Hill Press/Little, Brown & Co, 1987.
- ¹² Koukolík, František. Já: O vztahu mozku, vědomí a sebevědomování. Univerzita Karlova, 2005.
- ¹³ Pollanen, M. S., Markiewicz P., Bergeron, C., Goh, M. C.: Paired helical filaments are twisted ribbons composed of two parallel and aligned components: image reconstruction and modeling of filament structure using atomic force microscopy. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 56, 79-85, 1997.
- ¹⁴ Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Quinlan, M., Tung, Y. C., Zaidi, M. S., Wisniewski, H. M.: microtubule-associated protein tau. A component of Alzheimer paired helical filaments. *J. Biol. Chem.* 261, 6084-6089, 1986.

-
- ¹⁵ Kosik, K. S., Orecchie, L. D., Binder, L., Trojanowsky, J. Q., Lee, V. M., Lee, G.: Epitopes that span the tau molecule are shared with paired helical filaments. *Neuron* 1, 817-825, 1988.
- ¹⁶ Iqbal K., Alonso Adel C., Chen S et al.: Tau pathology in Alzheimer's disease and other tauopathies. *Biochim. Biophys. Acta*, 1739, 198–210, 2005.
- ¹⁷ Oddo S., Vasilevko V., Caccamo A., Kitazawa M., Cribbs D. H., LaFerla F. M.: Reduction of soluble Aβ and tau, but not soluble Aβ alone, ameliorates cognitive decline in transgenic mice with plaques and tangles. *J. Biol. Chem.*, 281, 39413–39423, 2006.
- ¹⁸ Kang, J., Lemaire, H. G., Unterbeck, A.: The precursor of Alzheimer's disease amyloid beta A4 protein resembles a cell surface receptor. *Nature* 325, 733-736, 1987.
- ¹⁹ Haass C, Selkoe D. J.: Soluble protein oligomers in neurodegeneration: Lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 101–112, 2007.
- ²⁰ Pike, C. J., Burdick, D., Walencewicz, A. J., Glabe, C. G., & Cotman, C. W.: Neurodegeneration induced by beta-amyloid peptides in vitro: the role of peptide assembly state. *The Journal of neuroscience*, 13(4), 1676-1687, 1993.
- ²¹ Elleder, M – Amyloid a amyloidosis, 1 LF UK, <http://www1.lf1.cuni.cz/udmp/web2/cell/amyloid.pdf>, 2009.
- ²² Malamud, N.: Neuropathology. In: Stevens, H. A. – Hener, R. (Eds.) *Mental retardation: a review of research*. Chicago, University of Chicago Press, 429-452, 1964.
- ²³ Schmechel, D. E., Saunders, A. M., Strittmatter, W. J. et al: Increased amyloid beta-peptide deposition as a consequence of apolipoprotein E genotype in late-onset Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 9649-9653, 1993.
- ²⁴ Kim, J., Basak, J. M., Holtzman, D. M.. The role of apolipoprotein E in Alzheimer's disease. *Neuron*, 63(3), 287-303, 2009.
- ²⁵ Mahley, R. W.: Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science* 240, 622-630, 1988.
- ²⁶ Higgins, G A., Large, C. H., Rupniak, H. T., Barnes, J. C.: Apolipoprotein E and Alzheimer's disease: review of recent studies. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 56, 675-685, 1997.

-
- ²⁷ Tuppo, E. E., Arias, H. R.. The role of inflammation in Alzheimer's disease. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 37(2), 289-305, 2005.
- ²⁸ Akiyama, H., Barger, S., Barnum, S., Bradt, B., Bauer, J., Cole, G. M., et al.. Inflammation and Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, 21, 383–421, 2000.
- ²⁹ Rogers, J., Lue, L. F.: Microglial chemotaxis, activation, and phagocytosis of amyloid β -peptide as linked phenomena in Alzheimer's disease. *Neurochemistry International*, 39, 33–340, 2001.
- ³⁰ Lue, L. F., Walker, D. G., Brachova, L., Beach, T. G., Rogers, J., Schmidt, A. M., et al.: Involvement of microglial receptor for advanced glycation end products (RAGE) in Alzheimer's disease: identification of a cellular activation mechanism. *Experimental Neurology*, 171, 29–45, 2001.
- ³¹ Weldon, D. T., Rogers, S. D., Ghilardi, J. R., Finke, M. P., Cleary, J. P., O'Hare, E., et al.: Fibrillar beta-amyloid induces microglial phagocytosis, expression of inducible nitric oxide synthase, and loss of a select population of neurons in the rat CNS in vivo. *Journal of Neuroscience*, 18, 2161–2173, 1998.
- ³² Dickson, D. W.: The pathogenesis of senile plaques. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 56, 321– 339, 1997.
- ³³ Chao, C. C., Hu, S., Sheng, W. S., Bu, D., Bukrinsky, M. I., Peterson, P. K.: Cytokine-stimulated astrocytes damage human neurons via a nitric oxide mechanism. *Glia*, 16, 276–28, 1996.
- ³⁴ DiPatre, P. L., Gelman, B. B.: Microglial cell activation in aging and Alzheimer disease: Partial linkage with neurofibrillary tangle burdens in the hippocampus. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 56, 153-149, 1997.
- ³⁵ Opletal L., Chlebek J., Macáková K., Benešová N., Hošťálková A., Cahlíková L.: Antioxidanty a degenerativní onemocnění, *Praktické lékařství*, Solen, s. 135-138, 2013.
- ³⁶ Markesbery, W. R.: Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease. *Free Radic. Biol. Med.* 23, 134-137, 1997.
- ³⁷ Coyle, J. T., Puttfarcken, P.: Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders, *Science* 262, 689-695, 1993.
- ³⁸ Ledvina, M., Stoklasová, A., Cerman, J: *Biochemie pro studující medicíny*. Karolinum, 2009.
- ³⁹ Voet, Donald, and Judith G. Voet. *Biochemie*. Victoria publishing, 1995.

-
- ⁴⁰ Giacobini E.: Cholinesterase inhibitors: new roles and therapeutic alternatives. *Pharmacol. Res.*, 50, 433–440, 2004.
- ⁴¹ Geršl, V., Štěřba, M., *Farmakologie pro farmaceuty II*. 1. vyd. Praha, Karolinum, 2007.
- ⁴² Wilcock, G., Howe, I., Coles, H., Lilienfeld, S., Truyen, L., Zhu, Y. Kershaw, P.. A long-term comparison of galantamine and donepezil in the treatment of Alzheimer's disease. *Drugs & aging*, 20(10), 777-789, 2003.
- ⁴³ Rogers, Sharon L., and Lawrence T. Friedhoff: "The efficacy and safety of donepezil in patients with Alzheimer's disease: results of a US multicentre, randomized, double-blind, placebo-controlled trial." *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders* 7.6, 293-303, 1996.
- ⁴⁴ Birks, J., Harvey, R. J. Donepezil for dementia due to Alzheimer's disease (Review). *Cochrane Database of Systematic Reviews*, (1), 2006.
- ⁴⁵ Rösler, M., Anand, R., Cicin-Sain, A., Gauthier, S., Agid, Y., Dal-Bianco, P. Gharabawi, M.: Efficacy and safety of rivastigmine in patients with Alzheimer's disease: international randomised controlled trial. *BMJ: British Medical Journal*, 633-638, 1999.
- ⁴⁶ Jahodář, L. *Farmakobotanika: semenné rostliny*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2006.
- ⁴⁷ Švestka, J.: *Galantamin-dualistické kognitivum*, 2001.
- ⁴⁸ Krejčová, G., Ševelová, L.: Současné poznatky o galantaminu, reverzibilním inhibitoru acetylcholinesterázy. *Vojenské Zdravotnické Listy*, 72(2), 37-44, 2003.
- ⁴⁹ Herzon, S., Tun, M. K.: The pharmacology and therapeutic potential of (-)-huperzine A. *Journal of Experimental Pharmacology*, 113, 2012.
- ⁵⁰ Xu, S. S., Gao, Z. X., Weng, Z., Du, Z. M., Xu, W. A., Yang, J. S., Chai, X. S.: Efficacy of tablet huperzine-A on memory, cognition, and behavior in Alzheimer's disease. *Zhongguo yao li xue bao= Acta pharmacologica Sinica*, 16(5), 391-395, 1995.
- ⁵¹ Rafii, M. S., Walsh, S., Little, J. T., Behan, K., Reynolds, B., Ward, C. Aisen, P. S.: A phase II trial of huperzine A in mild to moderate Alzheimer disease. *Neurology*, 76(16), 1389-1394, 2011.
- ⁵² Xiao XQ, Wang R, Han YF and Tang XC: Protective effects of huperzine A on β -amyloid_{25–25} induced oxidative injury in rat pheochromocytoma cells. *Neurosci Lett* ;286:155–158, 2000.

-
- ⁵³ Zhang, H.Y., Tang, X.C.: Neuroprotective effects of huperzine A: new therapeutic targets for neurodegenerative disease. *Trends Pharmacological Science* 27, 619–625, 2006
- ⁵⁴ Cardoso-Lopes, E. M., Maier, J. A., Silva, M. R. D., Regasini, L. O., Simote, S. Y., Lopes, N. P., Young, M. C. M: Alkaloids from stems of *Esenbeckia leiocarpa* Engl.(Rutaceae) as potential treatment for Alzheimer disease. *Molecules*, 15(12), s. 9205-9213, 2010.
- ⁵⁵ Konrath, E. L., Passos, C. D. S., Klein-Júnior, L. C., Henriques, A. T. Alkaloids as a source of potential anticholinesterase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 65(12), 1701-1725, 2013.
- ⁵⁶ Chlebek, J., Macakova, K., Cahlikova, L., Kurfuerst, M., Kunes, J., Opletal, L. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory compounds from *Corydalis cava* (Fumariaceae). *Natural product communications*, 6(5), 607-610, 2001.
- ⁵⁷ Mukherjee, P. K., Kumar, V., Mal, M., Houghton, P. J. Acetylcholinesterase inhibitors from plants. *Phytomedicine*, 14(4), 289-300, 2007.
- ⁵⁸ Karimi, G., Iranshahi, M., Hosseinalizadeh, F., Riahi, B., Sahebkar, A.. Screening of acetylcholinesterase inhibitory activity of terpenoid and coumarin derivatives from the genus *Ferula*. *Pharmacologyonline*, 1, 566-574, 2010.
- ⁵⁹ Gliszczynska, A., Brodelius, P. E.. Sesquiterpene coumarins. *Phytochemistry Reviews*, 11(1), 77-96, 2012.
- ⁶⁰ Kornhuber, J., Weller, M., Schoppmeyer, K., Riederer, P. J.: Amantadine and memantine are NMDA receptor antagonists with neuroprotective properties. *Journal of neural transmission. Supplementum*, 43, s. 91-104, 1993.
- ⁶¹ Švestka, J.: Memantin - Necholinergní alternativa léčby Alzheimerovy a vaskulární demence, *Psychiatria pre praxi*, 154-159, 2004.
- ⁶² Reisberg, B., Doody, R., Stöffler, A., Schmitt, F., Ferris, S., Möbius, H. J.: Memantine in moderate-to-severe Alzheimer's disease. *New England Journal of Medicine*, 348(14), 1333-1341, 2003.
- ⁶³ Claus, J. J., Ludwig, C., Mohr, E., Giuffra, M., Blin, J., Chase, T. N.: Nootropic drugs in Alzheimer's disease Symptomatic treatment with pramiracetam. *Neurology*, 41(4), 570-570, 1991.
- ⁶⁴ Rusina, M. R., Sheardová, M. K., Vališ, M. M.: Diagnostikujeme a léčíme demence správně a včas? Výsledky průzkumu ve světle nových doporučení, 2009.

-
- ⁶⁵ Christen, Y.: Oxidative stress and Alzheimer disease. *The American journal of clinical nutrition*, 71(2), 621s-629s, 2000.
- ⁶⁶ van Dongen M, van Rossum E, Kessels A, Sielhorst H, Knipschild P.: Ginkgo for elderly people with dementia and age-associated memory impairment: a randomized clinical trial. *Journal of Clinical Epidemiology*; 56:367–376., 2003.
- ⁶⁷ Mazza, M., Capuano, A., Bria, P., Mazza, S.: Ginkgo biloba and donepezil: a comparison in the treatment of Alzheimer's dementia in a randomized placebo-controlled double-blind study. *European Journal of Neurology*, 13(9), 981-985, 2006.
- ⁶⁸ Higgins, J. P., Flicker, L.: Lecithin for dementia and cognitive impairment. *Cochrane Database Syst Rev*, 2., 2000.
- ⁶⁹ Higgins, J. P. T., Flicker, L.: Doubtful effect of lecithin as a treatment for dementia, 2009.
- ⁷⁰ Opletal, L., Šimerda, B.: Přírodní látky a jejich biologická aktivita. I. Přehled nutraceutik. B. Sekundární metabolismy rostlin. Karolinum, Praha, 2008.
- ⁷¹ Petersen, R. C., Thomas, R. G., Grundman, M., Bennett, D., Doody, R., Ferris, S., Thal, L. J.: Vitamin E and donepezil for the treatment of mild cognitive impairment. *New England Journal of Medicine*, 352(23), 2379-2388, 2005.
- ⁷² Sano, M., Ernesto, C., Thomas, R. G., Klauber, M. R., Schafer, K., Grundman, M., Thal, L. J.: A controlled trial of selegiline, alpha-tocopherol, or both as treatment for Alzheimer's disease. *New England Journal of Medicine*, 336(17), 1216-1222, 1997.
- ⁷³ Lehrer, S.: Nasal NSAIDs for Alzheimer's Disease. *American journal of Alzheimer's disease and other dementias*, 1533317513518658, 2014.
- ⁷⁴ Nieland, J. D.: "Inhibitors of Carnitin-Palmitoyl-Transferase-1 for the Treatment and prevention of disorders caused by delipidation of neural tissue." U.S. Patent Application 13/001,422, 2001.
- ⁷⁵ Panza, F., Solfrizzi, V., Frisardi, V., Capurso, C., D'Introno, A., Colacicco, A. M., Imbimbo, B. P. Disease-modifying approach to the treatment of Alzheimer's Disease. *Drugs & aging*, 26(7), 537-555, 2009.
- ⁷⁶ Greeve, I., Kretschmar, D., Tschäpe, J. A., Beyn, A., Brellinger, C., Schweizer, M., Reifegerste, R.: Age-dependent neurodegeneration and Alzheimer-amyloid plaque formation in transgenic *Drosophila*. *The Journal of neuroscience*, 24(16), 3899-3906, 2004.

-
- ⁷⁷ Ghosh, A. K., Brindisi, M., Tang, J.: Developing β -secretase inhibitors for treatment of Alzheimer's disease. *Journal of neurochemistry*, 120(s1), 71-83, 2012.
- ⁷⁸ Murata, K., Matsuda, H., Yoshioka, Y., Matsumura, S.: Identification of β -secretase inhibitors in various plant resources. *Planta Medica*, 78(11), PI263, 2012.
- ⁷⁹ Citron, M.: Alzheimer's disease: treatments in discovery and development. *Nature neuroscience*, 5, 1055-1057, 2002.
- ⁸⁰ Citron, M.: Strategies for disease modification in Alzheimer's disease. *Nature Reviews Neuroscience*, 5(9), 677-685, 2004.
- ⁸¹ Wisniewski T, Sadowski M. Preventing beta-amyloid fibrillization and deposition: betasheet breakers and pathological chaperone inhibitors. *BMD Neuroscience*, 9:S5, 2008.
- ⁸² Caltagirone, C., Ferrannini, L., Marchionni, N., Nappi, G., Scapagnini, G., Trabucchi, M.: The potential protective effect of tramiprosate (homotaurine) against Alzheimer's disease: a review. *Aging clinical and experimental research*, 24(6), 580-587, 2012.
- ⁸³ Jiráková, R., & Slova, K. *Farmakoterapie Alzheimerovy choroby*, Praktické lékařství, 2008.
- ⁸⁴ Saumier, D., Duong, A., Haine, D., Garceau, D., Sampalis, J.: Domain-specific cognitive effects of tramiprosate in patients with mild to moderate Alzheimer's disease: ADAS-cog subscale results from the Alphase Study. *J. Nutr. Health Aging* 13, 808e812, 2009.
- ⁸⁵ Vališ, M. M., Kalnická, M. D.: Novinky ve farmakoterapii demencí, *Neurol. pro praxi* 12(1), 33-36, 2011.
- ⁸⁶ Schenk, D.: Amyloid- β immunotherapy for Alzheimer's disease: the end of the beginning. *Nature Reviews Neuroscience*, 3(10), 824-828, 2002.
- ⁸⁷ Alvarez, A., Toro, R., Cáceres, A., Maccioni, R. B.: Inhibition of tau phosphorylating protein kinase cdk5 prevents β -amyloid-induced neuronal death. *FEBS letters*, 459(3), 421-426, 1999.
- ⁸⁸ Meijer, L., Skaltsounis, A. L., Magiatis, P., Polychronopoulos, P., Knockaert, M., Leost, M., Greengard, P.: GSK-3-selective inhibitors derived from Tyrian purple indirubins. *Chemistry & biology*, 10(12), 1255-1266, 2003.
- ⁸⁹ Badiola, N., Alcalde, V., Pujol, A., Munter, L.M., Multhaup, G., Lleo, A., Coma, M., Soler-Lopez, M., Aloy, P., The proton-pump inhibitor lansoprazole enhances amyloid beta production. *PLoS One* 8, e58837, 2013.

⁹⁰ Congdon, E.E., Wu, J.W., Myeku, N., Figueroa, Y.H., Herman, M., Marinec, P.S., Gestwicki, J.E., Dickey, C.A., Yu, W.H., Duff, K.E.: Methylthioninium chloride (methylene blue) induces autophagy and attenuates tauopathy in vitro and in vivo. *Autophagy* 8, 609e622, 2012.

⁹¹ Anand, R., Gill, K. D., Mahdi, A. A.: Therapeutics of Alzheimer's disease: past, present and future. *Neuropharmacology*, 76, 27-50, 2014.

⁹² Wischik, C.M., Bentham, P., Wischik, D.J., Seng, K.M., O3-04-07: tau aggregation inhibitor (TAI) therapy with rember_ arrests disease progression in mild and moderate Alzheimer's disease over 50 weeks. *Alzheimer's Demen. The J. Alzheimer's Assoc.* 4, T167, 2008.

⁹³ 5th Conference Clinical Trials on Alzheimer's Disease. *The Journal of Nutrition, Health & Aging* 16, 795e872., 2012.

⁹⁴ Sabbagh M.N., Shill H.A.: Latrepirdine, a potential novel treatment for Alzheimer's disease and Huntington's chorea. *Curr Opin Invest Drugs*;11:80–91, 2010.

⁹⁵ Polgár, L.: The prolyl oligopeptidase family. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 59.2, s. 349-362, 2002.

⁹⁶ Goossens, F., De Meester, I., Vanhoof, G., Scharpé, S.: Distribution of prolyl oligopeptidase in human peripheral tissues and body fluids. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 34(1), 17-22, 1996

⁹⁷ Roßner, S. Schulz, I., Zeitschel, U., Schliebs, R., Bigl, V., Demuth, H. U: Brain prolyl endopeptidase expression in aging, APP transgenic mice and Alzheimer's disease. *Neurochemical research*, 30(6-7), s. 695-702, 2005.

⁹⁸ Männistö, P. T., Venäläinen, J., Jalkanen, A., García-Horsman, J. A: Prolyl oligopeptidase: a potential target for the treatment of cognitive disorders. *Drug News Perspect*, 20(5), 293-305, 2007.

⁹⁹ Venäläinen, J. I., Juvonen, R. O., Männistö, P. T.: Evolutionary relationships of the prolyl oligopeptidase family enzymes. *European Journal of Biochemistry*, 271(13), 2705-2715, 2004.

¹⁰⁰ Toide, K., Okamiya, K., Iwamoto, Y., Kato, T.: Effect of a Novel Prolyl Endopeptidase Inhibitor, JTP-4819, on Prolyl Endopeptidase Activity and Substance P-and Arginine-Vasopressin-Like Immunoreactivity in the Brains of Aged Rats. *Journal of neurochemistry*, 65(1), 234-240, 1995.

-
- ¹⁰¹ Adolpho, L. O., Marin, D., Puigpinos, A., Mendieta, L., Tarragó, T., Morel, A. F., Dalcol, I. I. : In Vitro Evaluation of Caffeyol and Cinnamoyl Derivatives as Potential Prolyl Oligopeptidase Inhibitors. *Planta medica*, 79(16), 1531-1535, 2013.
- ¹⁰² Cahlíková, L., Hrabínová, M., Kulhánková, A., Benesova, N., Chlebek, J., Jun, D., Opletal, L.: Alkaloids from *Chlidanthus fragrans* and their acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase and prolyl oligopeptidase activities. *Natural product communications*, 8(11), 1541-1544, 2013.
- ¹⁰³ Yoon, H. R., Paik, Y. S.: Prolyl Endopeptidase Inhibitory Activity of Two Styrylpyranones from *Phellinus linteus*. *Journal of Applied Biological Chemistry*, 56(3), 183-185, 2013.
- ¹⁰⁴ Hwang, J. S., Song, K. S., Kim, W. G., Lee, T. H., Koshino, H., Yoo, I. D.: Polyozellin, a new inhibitor of prolyl endopeptidase from *Polyozellus multiplex*. *Journal of antibiotics*, 50(9), 773-777, 1997.
- ¹⁰⁵ Obrázek stažen ze stránky http://www.biotox.cz/botanicus/index.php?id=bph_0433, 2014.
- ¹⁰⁶ Jirásek, V., Starý, F.: *Atlas léčivých rostlin*. Státní pedagogické nakladatelství, 1989.
- ¹⁰⁷ Hejný, S., Slavík B.: *Květena ČR 2*. Academia, Praha., 2003.
- ¹⁰⁸ Atlas rostlin, review stažené ze stránky: <http://rostliny.prirodou.cz/zemedymovite/zemedym/zemedym-lekarsky/>, 2014.
- ¹⁰⁹ Jaroš, Z.: *Léčivé látky z rostlin*. Dona, 1992.
- ¹¹⁰ Sengul, M., Yildiz, H., Gungor, N., Cetin, B., Eser, Z., Ercisli, S.: Total phenolic content, antioxidant and antimicrobial activities of some medicinal plants. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 22(1), 2009.
- ¹¹¹ Klejdus, v., Kubáň, B.: Rostlinné fenoly v allelopatii. *Chem. Listy*, 93, 243-248, 1999.
- ¹¹² Soušek, J., Vavreckova, C., Psotova, J., Ulrichova, J., Šimánek, V.: Antioxidant and antilipoperoxidant activities of alkaloid and phenolic extracts of eight *Fumaria* species. In II WOCMAP Congress Medicinal and Aromatic Plants, Part 2: Pharmacognosy, Pharmacology, Phytomedicine, Toxicology 501, 239-244, 1997.
- ¹¹³ Pelletier, S. W.: *Alkaloids: chemical and biological perspectives* (Vol. 10, p. 15), Pergamon, 1996.
- ¹¹⁴ Soušek J., Valešová M.: Obsahové látky rodu *Fumaria*. *Chem. listy*, 89, 489, 1995.
- ¹¹⁵ Bhakuni, D. S., Jain, S.: Protoberberine alkaloids. *The Alkaloids: Chemistry and Pharmacology*, 28, 95-181, 1986.

-
- ¹¹⁶ Lin, Ch.-Ch., Ng, L. T., Hsu, F.-F., Shieh, D.-E., Chiang, L.Ch.: Cytotoxic effects of *Coptis chinensis* and *Epimedium sagittatum* extracts and their major constituents (berberine, coptisine and icariin) on hepatoma and leukaemia cell growth. *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology* 31(1-2), 65-69, 2004.
- ¹¹⁷ Yan, D., Jin, Ch., Xiao, X.-H., Dong, X.-P.: Antimicrobial properties of berberines alkaloids in *Coptis chinensis* Franch by microcalorimetry. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 70(6), 845-849, 2008.
- ¹¹⁸ Mištová, T.: Alkaloidy obsažené v rostlinách čeledi Papaveraceae, Juss, 2009.
- ¹¹⁹ Vichkanova, S. A., Tolkachev, O. N., Martynova, R. G., Arzamastsev, E. V.: Sanguiritrin, a new antimicrobial drug. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 16(12), 925-929, 1982.
- ¹²⁰ de Sousa Falcão, H., Leite, J. A., Barbosa-Filho, J. M., de Athayde-Filho, P. F., de Oliveira Chaves, M. C., Moura, M. D. Batista, L. M., Gastric and duodenal antiulcer activity of alkaloids: a review. *Molecules*, 13(12), 3198-3223, 2008.
- ¹²¹ Burtsev, V. N., Dormidontov, E. N., Saliaev, V. N.: [Prevention of ventricular fibrillation with the aid of protopine in animal experiments]. *Kardiologiya*, 18(4), 76-79, 1978.
- ¹²² Wang G. X., Zhou Z., Jiang D. X., Han J., Wang J. F., Zhao L. W., Li J.: In vivo anthelmintic activity of five alkaloids from *Macleaya microcarpa* (Maxim) Fedde against *Dactylogyrus intermedius* in *Carassius auratus*. *Vet. Parasitol.*, 171, 305–313, 2010.
- ¹²³ Nagatsu, T., Kato, T., Numata, Y., Ikuta, K., Kuzuya, H., Umezawa, H., Takeuchi, T.: Dopamine β -hydroxylase and tyrosine hydroxylase activities in spontaneously hypertensive rats after NaCl administration. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 31(7), 767-768, 1975.
- ¹²⁴ Paulová, H., Bochořáková, H., Bártová, I., Studničková, M., & Táborská, E. : Aporfinové alkaloidy a jejich antioxidační vlastnosti, Masarykova univerzita, 2002.
- ¹²⁵ Zetler, G.: Neuroleptic-like, anticonvulsant and antinociceptive effects of aporphine alkaloids: bulbocapnine, corytuberine, boldine and glaucine. *Archives internationales de pharmacodynamie et de thérapie*, 296, 255-281, 1987.
- ¹²⁶ Adersen, A., Kjølbye, A., Dall, O., Jäger, A. K.: Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory compounds from *Corydalis cava*, Schweigg. & Kort. *Journal of ethnopharmacology*, 113(1), 179-182, 2007.
- ¹²⁷ Blaskó, G., Hussain, S. F., Freyer, A. J., Shamma, M.: A new class of isoquinoline alkaloids: The indenobenzazepines. *Tetrahedron Letters*, 22(33), 3127-3130, 1981.

-
- ¹²⁸ Orhan, I., Şener, B., Choudhary, M. I., Khalid, A.: Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory activity of some Turkish medicinal plants. *Journal of ethnopharmacology*, 91(1), 57-60, 2004.
- ¹²⁹ Sener, B., Orhan, İ.: Exploring Turkish biodiversity: A rich source of chemical diversity for drug leads discovery. *Pure & Applied Chemistry*, 83(9), 2011.
- ¹³⁰ Šafratová, M.: Biologicky aktivní metabolity rostlin 10. Alkaloidy *Fumaria officinalis* L. a jejich biologická aktivita, Faf UK, 2013.
- ¹³¹ Cahlíková, L., Macakova, K., Zavadil, S., Jiros, P., Opletal, L., Urbanova, K., Jahodar, L.: Analysis of Amaryllidaceae alkaloids from *Chlidanthus fragrans* by GC-MS and their cholinesterase activity. *Natural product communications*, 6(5), 603-606, 2011.
- ¹³² Bozhadze, A., Mshvildadze, V., Vachnadze, V., Tsitsishvili, V., Bakuridze A.: Analytical studies of (+)-chelidonine, protopine, and l-stylopine in *chelidonium majus* growing in georgia using high-performance liquid chromatography. *Chemistry of Natural Compounds*, 47, 477-480, 2011.
- ¹³³ Seger, CH., Sturm, S., Strasser, E. M., Ellmerer, E., Stuppner, H.: ¹H and ¹³C NMR signal assignment of benzyloquinoline alkaloids from *Fumaria officinalis* L. (Papaveraceae). *Magnetic Resonance in Chemistry*, 42, 882-886, 2004.
- ¹³⁴ Păltinean, R., Toiu, A., Wauters, J. N., Frederich, M., Tits, M., Angenot, L., Crişan, G.: Identification and determination of alkaloids in *fumaria* species from romania, *Digest Journal of Nanomaterials & Biostructures (DJNB)*, 8(2), 2013.
- ¹³⁵ Bhakuni, D. S., Chaturvedi, R.: The alkaloids of *Corydalis meifolia*. *Journal of natural products*, 46(4), 466-470, 1983.
- ¹³⁶ Haisova, K., Slavik, J.: Alkaloids of the Papaveraceae. II. On alkaloids from *Argemone ochroleuca* SWEET. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*, 38(8), 2307-2312, 1973.