

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

DIPLOMOVÁ PRÁCE

**Studium biologické aktivity alkaloidů izolovaných z *Argemone grandiflora*
(Papaveraceae) I.**

**Study of biological activity of alkaloids isolated from *Argemone grandiflora*
(Papaveraceae) I.**

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

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

Hradec Králové, 2015

Markéta Adamcová

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

V Hradci Králové, 2015

.....

podpis

Tímto bych chtěla poděkovat především PharmDr. Jakobovi Chlebkovi, Ph.D. za odborné vedení, poskytnuté rady a materiály při vypracování mé diplomové práce a také za trpělivost při mé práci v laboratoři. Dále prof. RNDr. Lubomíru Opletalovi, CSc. a Ing. Kateřině Macákové, Ph.D. za změření cholinesterasových inhibičních aktivit izolovaných látek, Mgr. Martině Hrabínové za změření inhibice prolyloligopeptidasy, doc. PharmDr. Jiřímu Kunešovi, Ph.D. za změření a interpretaci NMR spekter a Ing. Miroslavu Ločárkovi za provedení GC-MS analýzy izolovaných látek. Celkově bych chtěla poděkovat všem pracovníkům na Katedře farmaceutické botaniky a ekologie za pomoc a skvělé pracovní podmínky.

OBSAH

PŘEHLED OBRÁZKŮ.....	8
PŘEHLED TABULEK.....	9
SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	10
1 ÚVOD	12
2 Cíl diplomové práce	13
3 Teoretická část.....	14
3.1 Alzheimerova choroba	14
3.1.1 Epidemiologie	14
3.1.2 Rizikové faktory	14
3.1.3 Patofyziologické změny u Alzheimerovy choroby	14
3.1.3.1 Amyloidové plaky.....	15
3.1.3.2 Neuronální klubka.....	16
3.1.3.3 Apolipoprotein E.....	17
3.1.3.4 Oxidační stres.....	17
3.1.3.5 Růstové faktory	17
3.1.3.6 Zánětlivé mechanismy	18
3.1.4 Klinický obraz	18
3.1.5 Léčba AD.....	19
3.1.5.1 Acetylcholin	19
3.1.5.2 AChE a BuChE	20
3.1.5.3 Inhibitory mozkových AChE a BuChE.....	20
3.1.5.3.1 Donepezil.....	20
3.1.5.3.2 Rivastigmin.....	21
3.1.5.3.3 Galanthamin.....	21
3.1.5.3.4 Huperzin A.....	21
3.1.5.4 Inhibitory NMDA receptorů.....	22
3.1.5.5 Terapie neodpovídající EBM	23
3.1.5.5.1 Extrakt Ginkgo biloba EGb761	23
3.1.5.5.2 Zhášeče volných kyslíkových radikálů.....	23
3.1.5.5.3 Nootropika	23
3.1.5.5.4 Prekurzory a stimulanty tvorby nervových růstových faktorů.....	23
3.1.5.5.5 Nesteroidní antiflogistika	24
3.1.5.5.6 Ostatní látky.....	24
3.1.5.6 Nové terapeutické přístupy v léčbě AD	24

3.1.5.6.1	Blokátory, modulátory a aktivátory sekretas	24
3.1.5.6.2	Blokátory agregace A β	25
3.1.5.6.3	Imunoterapie zaměřená proti A β	26
3.1.5.6.4	Blokáda enzymu GSK3 β	26
3.1.5.6.5	Stabilizátory mikrotubulů	26
3.1.5.6.6	Zvýšení τ -degradace	26
3.1.5.6.7	Ovlivnění mitochondriálních funkcí.....	27
3.1.5.6.8	Deriváty takrinu	27
3.1.5.6.9	Inhibitory prolyloligopeptidasy	27
3.2	<i>Argemone grandiflora</i> Sweet (Papaveraceae)	29
3.2.1	Taxonomické zařazení	29
3.2.2	Charakteristika čeledi Papaveraceae	29
3.2.3	Charakteristika rodu <i>Argemone</i> L.	30
3.2.4	Morfologický popis <i>Argemone grandiflora</i> Sweet.....	30
3.2.5	Účinky látek rodu <i>Argemone</i> L.	30
3.2.6	Obsahové látky <i>Argemone grandiflora</i> Sweet	31
3.2.6.1	Isochinolinové alkaloidy	31
3.2.6.1.1	Pavinanové alkaloidy.....	32
3.2.6.1.2	Protopinové alkaloidy.....	34
3.2.6.1.3	Benzylisochinolinové alkaloidy	35
3.2.6.1.4	Benzofenanthridinové alkaloidy.....	37
3.2.6.1.5	Aporfinové alkaloidy	38
3.2.6.1.6	Protoberberinové alkaloidy.....	39
3.2.6.2	Inhibice AChE a BuChE alkaloidy z čeledi Papaveraceae	40
4	Experimentální část	41
4.1	Materiál a vybavení	41
4.1.1	Rozpouštědla a chemikálie.....	41
4.1.2	Pomocné látky	41
4.1.3	Detekční činidla.....	41
4.1.4	Vyvíjecí soustavy pro tenkovrstvou chromatografii.....	41
4.1.5	Chromatografické adsorbenty	42
4.1.6	Přístrojové vybavení.....	42
4.2	Všeobecné postupy	42
4.2.1	Příprava a čištění rozpouštědel.....	42
4.2.2	Odpařování extraktů a frakcí.....	42
4.2.3	Sušení a skladování frakcí a izolovaných čistých látek	42
4.2.4	Chromatografie.....	42

4.2.4.1	Sloupcová chromatografie	42
4.2.4.2	Tenkvrstvá chromatografie	43
4.2.5	Strukturní analýza	43
4.2.5.1	GC-MS analýza.....	43
4.2.5.2	NMR analýza	43
4.2.5.3	Optická otáčivost	43
4.2.5.4	Teplota tání.....	43
4.3	Izolace alkaloidů	44
4.3.1	Výběr rostlinného materiálu.....	44
4.3.2	Rostlinný materiál	45
4.3.3	Extrakce drogy a zpracování extraktu	45
4.3.4	Sloupcová chromatografie.....	46
4.3.5	Separace a čištění alkaloidů z frakce č. 12 (18 mg)	48
4.3.6	Separace a čištění alkaloidů z frakce č. 13-14.....	48
4.3.7	Separace a čištění alkaloidů z frakce č. 15-36 (0,90 g, 27,6 mg).....	48
4.3.8	Separace a čištění alkaloidů z frakce č. 37-40.....	49
4.3.9	Separace a čištění alkaloidů z frakce č. 44-90 (0,506 g).....	49
4.4	Stanovení inhibičních aktivit alkaloidů a alkaloidních extraktů	49
4.4.1	Chemikálie	49
4.4.2	Materiál	50
4.4.3	Přístroje	50
4.4.4	Podmínky měření	50
4.4.5	Získání erythrocytární AChE a BuChE z plazmy	50
4.4.6	Stanovení cholinesterasové inhibiční aktivity.....	51
4.4.7	Stanovení prolyloligopeptidasové inhibiční aktivity.....	51
5	Výsledky.....	53
5.1	Strukturní analýza	53
5.1.1	(+)-Laudanosin (MA-1).....	53
5.1.1.1	NMR analýza	53
5.1.1.2	MS analýza.....	54
5.1.1.3	Optická otáčivost	54
5.1.1.4	Teplota tání.....	54
5.1.2	Protopin (MA-2).....	55
5.1.2.1	NMR analýza	55
5.1.2.2	MS analýza.....	56
5.1.2.3	Optická otáčivost	56
5.1.2.4	Teplota tání.....	57

5.1.3	(-)-Argemonin (MA-3)	57
5.1.3.1	NMR analýza	57
5.1.3.2	MS analýza.....	58
5.1.3.3	Optická otáčivost	58
5.1.3.4	Teplota tání.....	58
5.1.4	(-)-Platycerin (MA-4)	59
5.1.4.1	NMR analýza	59
5.1.4.2	MS analýza.....	60
5.1.4.3	Optická otáčivost	60
5.1.4.4	Teplota tání.....	60
5.2	Inhibiční aktivity izolovaných alkaloidů.....	61
6	Diskuze.....	62
7	Abstrakt	64
8	Abstract	65
9	Použitá literatura	66

PŘEHLED OBRÁZKŮ

Obr. 1 <i>Argemone grandiflora</i> Sweet	29
Obr. 2 pavinanové alkaloidy.....	34
Obr. 3 protopinové alkaloidy.....	35
Obr. 4 benzylisochinolinové alkaloidy	37
Obr. 5 benzofenanthridinové alkaloidy	38
Obr. 6 aporfinové alkaloidy.....	39
Obr. 7 protoberberinové alkaloidy	40
Obr. 8 Chromatogram natě GCMS.....	44
Obr. 9 Chromatogram kořene GCMS	45
Obr. 10 Kontrolní TLC spojených frakcí z alkaloidního výtřepku	48
Obr. 11 Struktura (+)-laudanosinu.....	53
Obr. 12 ¹ H NMR spektrum (+)-laudanosinu	53
Obr. 13 ¹³ C NMR spektrum (+)-laudanosinu	54
Obr. 14 EI-MS spektrum (+)-laudanosinu.....	54
Obr. 15 Struktura protopinu	55
Obr. 16 ¹ H NMR spektrum protopinu	55
Obr. 17 ¹³ C NMR spektrum protopinu	56
Obr. 18 EI-MS spektrum protopinu.....	56
Obr. 19 Struktura (-)-argemoninu	57
Obr. 20 ¹ H NMR spektrum (-)-argemoninu.....	57
Obr. 21 ¹³ C NMR spektrum (-)-argemoninu.....	58
Obr. 22 EI-MS spektrum (-)-argemoninu	58
Obr. 23 Struktura (-)-platycerinu	59
Obr. 24 ¹ H NMR spektrum (-)-platycerinu.....	59
Obr. 25 ¹³ C NMR spektrum (-)-platycerinu.....	60
Obr. 26 EI-MS spektrum (-)-platycerinu	60

PŘEHLED TABULEK

Tab. 1 Výskyt jednotlivých alkaloidů u některých druhů rodu <i>Argemone</i> L.	32
Tab. 2 Hodnoty IC ₅₀ ethanolových a ethylacetátových extraktů rodu <i>Argemone</i> L.	40
Tab. 3 Inhibiční aktivita alkaloidních extraktů nati a kořene <i>Argemone grandiflora</i> Sweet ...	44
Tab. 4 Výsledky sloupcové chromatografie	47
Tab. 5 Výsledky inhibičních aktivit izolovaných alkaloidů	61

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

A β	β -amyloid
ACh	acetylcholin
AChE	acetylcholinesterasa
AD	Alzheimerova choroba
AMK	aminokyselina
ApoE	apolipoprotein E
APP	amyloidní prekurzorový protein
ATP	adenosintrifosfát
BDNF	brain derived neurotrophic factor
BuChE	butyrylcholinesterasa
CDK5	cyklin dependentní kinasa
CNS	centrální nervová soustava
CYP	cytochrom P
DMSO	dimethylsulfoxid
DTNB	5,5-dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina
EBM	medicína založená na důkazech
EtOH	ethanol
GC	plynová chromatografie
GSK3	glykogen synthasa kinasa
GTP	guanosintrifosfát
HDL	lipoproteiny s vysokou hustotou
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HSP 90	protein teplotního šoku 90
HupA	huperzin A
IC	inhibiční koncentrace
LB	lékařský benzín
Mr	molekulární hmotnost
MS	hmotnostní spektrometrie
NGF	nervový růstový faktor
NMDA	<i>N</i> -methyl-D-aspartát
NMR	nukleární magnetická rezonance

NSAID	nesteroidní protizánětlivé léky
NT-3	neutrofin-3
POP	prolyl oligopeptidasa
Rf	retenční faktor
TLC	tenkovrstvá kapalinová chromatografie
TNF α	tumor nekrotizující faktor α
Trk	tropomyosin receptor kinase
UV	ultrafialová oblast
VLDL	lipoprotein s velmi nízkou hustotou

1 ÚVOD

V současné době stále více pacientů trpí duševními chorobami. Duševní poruchy mohou být dvojího původu. Buď se nemoc projeví již v raném či dospělém věku (nejčastěji deprese, úzkostné stavy, bipolární porucha) nebo porucha vzniká až v souvislosti s vyšším věkem pacienta (nejčastěji demence). Právě psychickými poruchami seniorů se dnes zabývá obor gerontopsychiatrie.¹

Tento obor se u nás začal rozvíjet v 50. letech 20. století a to hlavně díky tomu, že se prodlužuje průměrná délka života. Zatímco v minulosti se lidé nedoživali více než 65 let, nyní se průměrná délka života pohybuje kolem 80 let. S rostoucím věkem se zvyšuje riziko somatického onemocnění, ale také dochází ke změnám psychiky. U řady pacientů v pokročilejším věku bylo již zjištěno chronické onemocnění a někdy zdánlivé psychiatrické onemocnění vzniká v důsledku dekompenzace somatické choroby.¹

Demence je skupina duševních onemocnění, kdy dochází k poklesu kognitivních funkcí. Demence rozdělujeme na atroficko-degenerativní, mezi které patří Alzheimerova choroba (AD), dále vaskulární demence a ostatní. Právě AD se vyskytuje nejčastěji, představuje až 60 % všech demencí. Léčba zatím není bohužel kauzální, ale pouze symptomatická. Dostupné léky jsou schopny oddálit těžká stadia tohoto onemocnění. Stále však probíhá vývoj, izolace, syntéza nových látek s nadějí, že některá zastaví průběh nebo dokonce vyléčí toto onemocnění.¹

Nejstarším způsobem, jak byly získávány léčivé látky, byl sběr rostlinných nebo živočišných produktů a izolace látek z nich. Důležitým mezníkem byla izolace morfinu z opia v roce 1803 – 1806. Následovala izolace dalších látek – dusíkatých bází, které byly později nazvány alkaloidy.² V léčbě AD se využívají i látky, které byly izolovány z rostlin a další studie stále pokračují. Galanthamin je látka přírodního původu a využívá se k terapii AD. Mechanismus účinku spočívá v inhibici acetylcholinesterasy (AChE). AChE a butyrylcholinesterasa (BuChE) jsou enzymy, které rozkládají acetylcholin, jehož hladina se při Alzheimerově demenci výrazně snižuje.

Na Katedře farmaceutické botaniky a ekologie FaF UK bylo studováno již několik taxonů rostlin. Primárním screeningem bylo zjištěno, že pro další výzkum je mimo jiné vhodná čeleď Papaveraceae.³ V mé diplomové práci se zabývám izolací látek z rodu *Argemone* L. a jejich inhibičním účinkem na AChE, BuChE a prolyloligopeptidasu (POP).

2 Cíl diplomové práce

Cíle diplomové práce:

1. izolace obsahových látek za použití chromatografických metod z vybraných frakcí, získané na chromatografickém sloupci ze sumárního diethyletherového alkaloidního extraktu z *Argemone grandiflora*, obsahující terciární isochinolinové alkaloidy;
2. podíl na identifikaci obsahových látek spektrálními metodami (MS a NMR) a změření optické otáčivosti;
3. podíl na stanovení biologické aktivity čistých izolovaných látek vůči AChE, BuChE a POP.

3 Teoretická část

3.1 Alzheimerova choroba

AD je závažné neurodegenerativní onemocnění, jež nese jméno po profesorovi Aloisi Alzheimerovi, který jako první toto onemocnění popsal. Pacientkou byla paní Auguste D., která zemřela s diagnózou těžké demence. O jejím případě Alzheimer přednášel v roce 1906 na schůzi jihoněmeckých psychiatrů v Tübingenu.⁴

3.1.1 Epidemiologie

Pravděpodobnost demence se zvyšuje s rostoucím věkem. Vzhledem k tomu, že populace stárne, objevuje se i stále více případů tohoto onemocnění. Demence v dětském a středním věku jsou vzácné. První případy AD se začínají objevovat u pacientů okolo 40-50 let. Jedná se o AD s časným začátkem.⁵

Více případů pak pozorujeme až od 65. roku. V takto staré populaci je odhadováno, že demencí trpí 2,0-2,5 % lidí. Z toho nejméně polovinu tvoří AD. Statistiky však nejsou úplné a chybí údaje o lidech trpících lehkou demencí, kteří nejsou léčeni. Odhadem je, že v České Republice trpí touto nemocí 75 000 až 120 000 pacientů.⁵

3.1.2 Rizikové faktory

V současnosti není známa příčina AD. Jsou však známy potenciální rizikové faktory. Mezi nejvýznamnější rizikový faktor patří věk a genetická predispozice. Vyšší pravděpodobnost onemocnění souvisí s genetickou mutací na chromosomu 1, 14, 19 a 21, která vede ke spuštění tvorby a ukládání bílkoviny β -amyloidu (A β).⁶ Dalším rizikem je nosičství alely ϵ -4 genu pro apolipoprotein E (apoE).⁴ Prodělaný úraz hlavy, ženské pohlaví, kouření či nižší vzdělání jsou další z možných faktorů ohrožujících pacienta.⁷

Naopak mezi protektivní faktory můžeme zařadit vyšší vzdělání nebo duševní aktivitu i ve vyšším věku.⁷

3.1.3 Patofyziologické změny u Alzheimerovy choroby

Významným objevem v oblasti AD bylo zjištění deficitu cholinergní neurotransmise. Acetylcholin (ACH), neurotransmitter a neuromodulátor, je syntetizován z cholinu a acetyl-CoA, prostřednictvím enzymu zvaného cholinacetyltransferasa. ACH se dále váže na nikotinové nebo muskarinové receptory a ovlivňuje tím mnohé kognitivní funkce. Následuje

rozklad ACh v synaptické štěrbině prostřednictvím AChE nebo BuChE na cholin a kyselinu octovou.⁷

U AD je porušena tvorba a uvolňování ACh. Porušen je také mechanismus zpětného vychytávání cholinu do neuronu a tvorba acetyl-CoA je snížena v důsledku nedostatečné činnosti mitochondrií. V pozdějších stádiích se více uvolňují excitační aminokyseliny (glutamát, aspartát). Tyto aminokyseliny (AMK), především glutamát, způsobují zahlcení glutamátergních ionotropních receptorů (AMPA, NMDA).^{8,9}

V oblasti makroskopických změn je nejčastější atrofie ve spánkové a temenní kůře a dále atrofie hippocampu a amygdaly. Postranní komory bývají rozšířeny.⁵

Co se týče mikroskopickým změn, hlavní jsou změny neurofibril neboli neuronální klubka a amyloidové plaky s uloženinami A β .⁵

3.1.3.1 Amyloidové plaky

Hlavním znakem AD je ukládání nerozpustných amyloidových plaků. Hlavní složkou těchto plaků je protein A β , který je složen z 39-43 AMK a vzniká štěpením transmembránově uložené bílkoviny – amyloidového prekursorového proteinu (APP). APP se vyskytuje v celém těle, hlavně v epiteliálních buňkách různých orgánů, jako je štítná žláza nebo epidermis, ale nejčastějším výskytem je centrální nervová soustava (CNS). Podílí se na řadě buněčných činností, jako je např. růst axonů nebo plasticita synapsí.^{10,11,12}

Lidský gen pro APP je lokalizován na 21. chromozomu a skládá se z 695-770 AMK.¹³ APP s extracelulárním N-terminálním zakončením a intracelulárním C-terminálním zakončením je fyziologicky štěpen α -sekretasou a γ -sekretasou. Vznikají rozpustné peptidy o délce do 39 AMK, tzv. sekreční forma APP, která má za určitých podmínek neuroprotektivní účinek.¹²

V průběhu AD se více uplatňuje β -sekretasa spolu s γ -sekretasou, které odštěpují podstatně delší peptidy složené ze 40-42 AMK. Tyto nerozpustné částice se spojují do větších celků (oligomerů), které jsou velmi toxické a poškozují různé buněčné organely. Oligomery polymerují do fibril a vytvářejí tak základ amyloidových plaků. Tvorba A β je důsledkem mutací genu pro APP na 21. chromozomu. Až 90 % A β je tvořeno 40 AMK (A β ₄₀), zbylých 10 % je tvořeno 42 AMK (A β ₄₂). A β ₄₂ prokazuje zvýšenou schopnost agregace a je hlavní příčinou tvorby amyloidových plaků.^{5,13,14}

Po zásahu α nebo β -sekretasou zůstávají membránově vázané C-terminální fragmenty C83 nebo C99, které slouží jako substráty pro γ -sekretasu.¹⁵ γ -Sekretasa je proteolytický komplex potřebný pro aktivaci mnoha transmembránových proteinů. Produkty získané jejím

štěpením hrají důležitou roli v organismu. Skládá se ze 4 podjednotek – presenilinu, nicastrinu, APH-1 a Pen-2.¹⁶ Vznik A β není podmíněn pouze mutací genu pro APP na 21. chromozomu, ale také mutací genu pro presenilin 1 na 14. chromozomu a genu pro presenilin 2 na chromozomu 1. Presenilin 1 je složen ze 467 AMK a presenilin 2 ze 448 AMK.¹⁷

V současnosti je věnována pozornost sekretasam, protože bylo zjištěno více typů genetických mutací u pacientů s AD.⁶

3.1.3.2 Neuronální klubka

Další neurobiologickou změnou u AD je degenerace τ -proteinu. τ -Protein, objevený v roce 1975, se vyskytuje hlavně v neuronech a jeho hlavní rolí je stabilizace cytoskeletu neuronů. Je nazýván jako protein asociovaný s mikrotubuly a je kódován genem na 17. chromozomu, který má nejméně 16 exonů.¹⁸ Skládá se ze 4 oblastí: kyselá N-terminální oblast, oblasti bohaté na prolin, oblasti zodpovědné za vazbu k mikrotubulům a C-terminální oblast.¹⁹

V průběhu AD dochází k fosforylaci τ -proteinu. Za normálních podmínek existuje při fosforylaci rovnováha mezi působením kinas a fosfatů. Porušením této rovnováhy pak dochází k agregaci τ -proteinu. Kinasy patří do skupiny enzymů nazývaných transferasy, protože k substrátu přenášejí fosfátovou skupinu z vysoce energetických molekul, jako je ATP nebo GTP. K hyperfosforylaci τ -proteinu dochází prostřednictvím enzymů GSK3 β (glykogen synthasa kinasa) a CDK5 (cyklin dependentní kinasa). GSK3 se mimo jiné podílí na proliferaci buněk, nervových funkcích, onkogenezi, apoptóze a embryonálním vývoji.^{5,8,19}

Fosforylovaný τ -protein se dále spojuje do vláken, která mají tvar dvojité šroubovice (tzv. párově heliakální filamenta). Ta jsou podkladem pro tvorbu neuronálních klubek (tangles). Neurony obsahující tato neurofibrilární klubka neplní svou funkci a podléhají apoptóze.^{5,8}

Bylo zjištěno, že v počátečních stádiích AD se objevily nejdříve neuronální klubka a poté amyloidové plaky (v 7 z 21 případů). V žádném z případů se neobjevily plaky dříve než klubka. Tato otázka je však stále otevřená, neboť některé plaky mohly být přehlédnuty, vzhledem k tomu, jak velká oblast mozku byla prozkoumávána.²⁰

Novými potenciálními přístupy v léčbě AD, které ale nejsou prozatím zkoušeny v praxi, jsou protilátky proti degenerovanému τ -proteinu nebo látky, které blokují účinek enzymu GSK3 β .^{5,8}

3.1.3.3 Apolipoprotein E

ApoE je multifunkční protein hrající hlavní roli v metabolismu lipidů, neurobiologii a neurodegenerativních onemocněních. Existuje ve třech izoformách: ApoE2, ApoE3, ApoE4. Každá izoforma vykazuje jiný účinek. Hlavní funkcí je zprostředkovat vazbu lipoproteinů nebo lipidových komplexů na specifické receptory. Tak se ApoE podílí na distribuci lipidů mezi různé tkáně a buňky v těle. Kromě toho se podílí na modulaci fyziologických a patologických procesů buňky, včetně mitochondriálních funkcí a dendritických funkcí. ApoE je ve velkém množství produkován v mozku a slouží jako hlavní transport lipidů v mozkomíšním moku. Hraje klíčovou roli v rozdělování lipidů při regeneraci axonů.²¹

ApoE2 a ApoE3 mají větší afinitu k HDL, kdežto ApoE4 preferuje VLDL částice.²¹ Nosičství alely ApoE4 se jeví jako rizikový faktor AD. Není nezbytné pro vznik AD, ale u takto nemocných pacientů se vyskytuje mnohem častěji než u ostatní populace. ApoE se společně s A β ukládá v amyloidových placích a váže se také na neuronální klubka.^{6,14}

3.1.3.4 Oxidační stres

AD je doprovázena oxidačním stresem probíhajícím v celém organismu. Vznikají kyslíkové radikály, což jsou fyziologické vedlejší produkty plnicí funkce signálních molekul, ale ve větším množství organismu spíše škodí, protože mohou oxidovat mnoho důležitých molekul, včetně nukleových kyselin, bílkovin a lipidů. Mozek je velmi citlivý na oxidační nerovnováhu v důsledku jeho vysoké poptávky po energii, vysoké spotřeby kyslíku, velkého množství peroxidovatelných polynenasycených mastných kyselin a také díky relativnímu nedostatku antioxidantů.²²

V důsledku oxidačního stresu dochází k poškození mitochondrií a neuronálních membrán. Mitochondrie jsou hlavním původcem oxidačního stresu, kvůli výrobě superoxidového aniontu, který je navzdory přítomnosti antioxidantního systému zodpovědný za vznik volných radikálů. Poškozená mitochondrie je méně efektivním výrobcem ATP, ale výkonnějším výrobcem volných radikálů a je zodpovědná za oxidační nerovnováhu vyskytující se u AD.²²

3.1.3.5 Růstové faktory

U pacientů s AD bylo zjištěno snížení tvorby nervových růstových faktorů (NGF). Jsou to látky, které si mozek tvoří sám a které slouží ke zvýšení tvorby nervových spojů, nových nervových buněk a k obnově poškozené nervové tkáně.⁶

NGF patří mezi neutrofiny, stejně jako proteiny BDNF (brain derived neurotrophic factor)

nebo neutrofin-3 (NT-3). Jsou důležité pro uchovávání paměti a podílejí se na elektrochemickém přenosu signálu mezi neurony. NGF se skládá ze 118 AMK a má 3 podjednotky. Je syntetizován jako prekurzor – proNGF. Není nezbytný pro přežití neuronů u dospělých jedinců, hraje však důležitou roli v udržení homeostázy a také při poškození neuronů. Jeho účinky závisí na typu receptoru, na který se váže. Vazbou na receptor TrkA (tropomyosin receptor kinase A) podporuje přežití buněk. Vazbou na receptor p75^{NTR} a sortilin vyvolává apoptózu buňky. TrkA patří mezi tyrozin kinásové receptory, podobně jako TrkB, který váže BDNF, a TrkC, vázající NT-3. p75^{NTR} patří mezi TNFR (tumor necrosis factor receptor) a mohou se na něj vázat všechny typy neutrofinů. Pro-NGF se na tento receptor váže s vyšší afinitou než NGF a navozuje tak apoptózu.²³

Novými potenciálními přístupy v léčbě AD je použití antagonistů p75^{NTR} nebo agonistů Trk.²⁴

3.1.3.6 Zánětlivé mechanismy

Pozitronovou emisní tomografií bylo dokázáno, že mozek pacientů s AD je postižen zánětem díky zvýšené aktivitě mikroglií. Buňky mikroglií se transformují do podoby makrofágů.⁹ Mají podobné funkce jako makrofágy v jiných tkáních, včetně fagocytózy, prezentace antigenu, produkce cytokinů, chemokinů, eikosanoidů, složek komplementu, volných radikálů a oxidu dusnatého.²⁵

Předpokládá se, že zánět je způsoben tvorbou A β a hyperfosforylací τ -proteinu. Tyto patologické změny pak stimulují mikrogliu k produkci cytokinů, včetně TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-8, makrofágového zánětlivého proteinu (MIP-1 α) a C-reaktivního faktoru (CRP). Zvýšená hladina cytokinů a CRP dále vede ke stimulaci tvorby A β a fosforylovaného τ -proteinu. Tento cyklus, ve kterém hrají roli zánětlivé mediátory, způsobuje neurodegeneraci.²⁶

Byly prováděny studie, které uvádějí, že nesteroidní protizánětlivé léky (NSAID) mohou zpomalovat nástup AD. Konkrétně užívání NSAID nejméně 2 roky před vypuknutím demence vedlo k oddálení jejího nástupu a metaanalýzy toto zjištění potvrdily. Nicméně v randomizované kontrolní studii tento účinek NSAID nebyl potvrzen.²⁶

3.1.4 Klinický obraz

AD se vyvíjí pomalu, plíživě. Na začátku je diagnostikována jako tzv. mírná porucha kognitivních funkcí. První příznakem bývá zapomínání běžných každodenních činností. AD lze rozdělit do tří stupňů: lehká, střední a těžká demence.⁶

Lehká demence je provázena poruchami paměti. Problémem bývá zapamatování si

nových věcí. Dlouhodobá paměť nebývá většinou postižena. Nastávají také poruchy orientace v prostoru i čase, zvláště na méně navštěvovaných místech. Objevují se i poruchy aktivit denního života a příznaky deprese, úzkosti či lability.⁵

Střední demence se vyznačuje prohlubováním deficitu kognitivních funkcí. Nadále se zhoršuje paměť, až do té míry, že pacient se není schopen vrátit domů bez bloudění. Slovní zásoba je stále chudší, komunikace s okolím horší. Pacient ztrácí zájem o sebe sama, nepečuje o sebe, nedbá na hygienu. Může být agresivní, může trpět bludy a hlavně přestává být soběstačný. Je závislý na pomoci okolí.⁵

U těžké demence pacienti přestávají poznávat své příbuzné, neorientují se nejen venku, ale také u sebe doma. Pomoc potřebují i s běžnými činnostmi, jako je jídlo a pití. Bývají inkontinentní, někteří se stanou imobilní.⁵

AD končí smrtí zpravidla po 7-15 letech od stanovení diagnózy. Příčinou úmrtí bývá většinou bronchopneumonie či dekubitální sepse.⁵

3.1.5 Léčba AD

V současné době neexistuje léčba, která by AD vyléčila, léčba je pouze symptomatická. Hlavním přístupem založeným na důkazech je ovlivnění acetylcholinergního a glutamátergního systému. Další terapeutické postupy jsou klinicky zkoušeny, zatím se ale nepoužívají v praxi.²⁷

Obecně platí, že čím dříve je léčba započnuta, tím větší úspěch můžeme očekávat.

3.1.5.1 Acetylcholin

ACH je neurotransmiterem parasymptiku. Jak bylo již zmíněno, je syntetizován v cytoplazmě neuronů z acetyl-CoA a cholinu enzymem cholinacetyltransferasou. Skladován je ve vezikulách v parasymptických nervových zakončeních. Mimo vezikuly v cytoplasmě se vyskytuje pouze malá část ACH. K jeho uvolnění dochází působením akčního potenciálu, který způsobí influx kalcia do nervového zakončení. Následuje splynutí membrány vezikul se synaptickou membránou, čímž dojde k vylití obsahu vezikul do synaptické štěrbině. ACH se váže na receptory na postsynaptické membráně. Jeho účinek netrvá dlouho. Hned poté je rozložen na cholin a kyselinu octovou prostřednictvím AChE nebo BuChE.²⁸

ACH se váže na receptory nikotinové, asociované s iontovým kanálem, a muskarinové, spřažené s G-proteinem. Rozlišujeme dva typy nikotinových receptorů. Muskulární receptory jsou lokalizovány na nervosvalové ploténce, neuronální receptory ve vegetativních gangliích.²⁸

Existuje 5 typů muskarinových receptorů (M_1 - M_5). M_1 receptor se vyskytuje hlavně v nervových buňkách a žaludečních buňkách. M_2 receptor můžeme nalézt v srdci, kde vyvolává účinek negativně chronotropní, dromotropní a ionotropní. M_3 receptor se nachází v hladkých svalích a žlázách. Jeho účinek spočívá ve zvýšení tonu svalů a zvýšení žlázné sekrece. Význam M_4 a M_5 receptorů nebyl zatím objasněn.²⁸

3.1.5.2 AChE a BuChE

Cholinesterasy jsou serinové hydrolytické enzymy rozkládající ACh na cholin a acetyl-CoA.²⁹

AChE je přítomna v nervové tkáni, svalích, plazmě a krevních buňkách. Je zapojena do procesů, jako je buněčná proliferace, diferenciace, reakce na různá poškození a tvorba amyloidu.²⁹ Ve zdravém mozku zajišťuje odbourávání až 80 % ACh. V nemocném mozku se nachází v placích a tangles a její aktivita je přímo úměrná množství amyloidu v CNS. Existuje 6 hlavních forem tohoto enzymu, z nichž nejdůležitější je forma G1 a G4. G4 forma převládá ve zdravém mozku, kdežto u pacientů s demencí se vyskytuje nejčastěji forma G1.⁹

Funkce BuChE u zdravého mozku není zcela objasněna. Můžeme ji najít v CNS, ve svalích a erythrocytech. V CNS se nenachází v neuronech tak jako AChE, ale je přítomna v gliích. Na odbourávání ACh se však podílí minimálně. U pacientů s AD její aktivita roste. V důsledku proliferace glií dochází ke zmnožení molekul BuChE. Její aktivita je také přímo úměrná množství amyloidu.⁹

3.1.5.3 Inhibitory mozkových AChE a BuChE

Inhibicí mozkových cholinesteras zvýšíme hladiny ACh, schopného vazby na nikotinové nebo muskarinové receptory. Zvýší se tím acetylcholinergní transmise. Inhibitory AChE a BuChE patří mezi léky první volby při léčbě AD, hlavně časných a středních stádiích. Jejich užívání může prodloužit život pacienta až o několik let.⁹

Prvním schváleným inhibítorem v léčbě AD byl takrin. Používal se v první polovině 90. let minulého století. Měl však řadu nežádoucích účinků, včetně hepatotoxicity, proto už se dnes nepoužívá.⁹ V dnešní době jsou používány 4 látky: donepezil, rivastigmin, galanthamin a huperzin A (HupA). HupA je již používán v Číně. V Evropě a v USA probíhají klinická hodnocení.³⁰

3.1.5.3.1 Donepezil

Donepezil je piperidinový derivát s eliminačním poločasem 70-80 hodin. Je inhibítorem AChE s velmi malou afinitou k BuChE. Vzhledem k dlouhému poločasu je možné podávat ho

v jedné denní dávce. Dávka je titrována, začíná se na 5 mg denně a při dobré toleranci se přechází po jednom měsíci na 10 mg denně. Zlepšení se projevuje již po třech týdnech od začátku terapie. Donepezil je odbouráván pomocí jaterních cytochromů CYP 3A4 a CYP 2D6. Nežádoucí účinky nejsou časté, ale může se objevit nauzea, zvracení, nechutenství nebo dyspepsie. Je kontraindikován u aktivní gastroduodenální vředové choroby a u těžších převodních poruch srdce. V retrospektivní analýze bylo prokázáno, že podávání donepezilu v denní dávce 10 mg výrazně oddálilo poruchy běžných denních činností a zlepšilo schopnosti pacientů vykonávat složitější úkoly.^{27,31,32,33,34}

3.1.5.3.2 Rivastigmin

Rivastigmin je pseudoreverzibilní inhibitor karbamátového typu. Pseudoreverzibilní znamená, že je sám odbouráván cholinesterasami. Schopnost odbourávat cholinesterasy trvá déle, než je přítomnost látky v plazmě. Na rozdíl od donepezilu účinkuje i v inhibici BuChE. Je možné ho podávat v perorální formě nebo ve formě náplasti. Při perorálním užití se mohou vyskytovat gastrointestinální nežádoucí účinky. Dávku je nutno titrovat. První měsíc se podává 2× denně 1,5 mg, druhý měsíc 2× denně 3,0 mg, třetí měsíc 2× 4,5 mg a po 12 týdnech 2×6,0 mg. Je zvláště vhodný u AD s poruchami chování a přidruženými psychotickými příznaky.²⁷

3.1.5.3.3 Galanthamin

Galanthamin je terciární alkaloid izolovaný z různých rostlin, včetně sněženky *Galanthus* z čeledi Amaryllidaceae. Vzhledem k omezeným zdrojům a vysokým nákladům na extrakci se vyrábí synteticky. Inhibuje AChE, inhibice BuChE je nevýznamná. Mimo to alostericky moduluje nikotinové receptory. Podává se perorálně jednou nebo dvakrát denně v závislosti na tom, jaká léková forma je použita. Dávka je titrována. Při použití formy s prodlouženým uvolňováním se podává první měsíc 8 mg 1× denně. Po měsíci je dávka zdvojnásobena na 1× 16 mg a třetí měsíc je navýšena na 1× 24 mg. Nežádoucí účinky jsou podobné jako u donepezilu a rivastigminu – gastrointestinální potíže. Dochází ke zlepšení a udržení kognitivních funkcí po dobu nejméně půl roku.⁹

3.1.5.3.4 Huperzin A

HupA je alkaloid poprvé izolovaný v roce 1986 z čínské rostliny *Huperzia serrata* Thunb., známé také pod názvem *Qian Ceng Ta*. Používá se již více než tisíc let na léčbu mnoha nemocí, jako je např. schizofrenie, myasthenia gravis nebo otoky či pohmožděnin.³⁰

Je silným inhibitorem AChE a ve studiích bylo prokázáno, že je schopen pronikat

hematoencefalickou bariérou lépe než galanthamin, rivastigmin nebo donepezil, má lepší biologickou dostupnost po perorálním podání a inhibuje AChE déle než tyto látky.³⁵ Výsledky studií dokazují, že HupA je účinný a bezpečný lék zmírňující projevy AD a zlepšující kognitivní funkce.³⁰ Mimo jiné bylo prokázáno, že antagonizací NMDA (*N*-methyl-D-aspartát) receptorů snižuje toxicitu způsobenou glutamátem.³⁶

HupA se stal předmětem mnoha výzkumů k objasnění vztahu mezi strukturou a jeho účinkem. Snahou bylo najít analoga a deriváty a byl objeven polosyntetický derivát ZT-1 s podobnou aktivitou jako HupA, menší toxicitou a selektivnějším účinkem k AChE.³⁵

V první fázi studie bylo podáváno 400 µg HupA 2× denně zdravým jedincům. HupA nezpůsobil závažné nežádoucí účinky. Druhé fáze se zúčastnilo 210 jedinců s mírnou až středně těžkou AD. Část dostávala placebo, část 200 µg HupA 2× denně a část 400 µg HupA 2× denně. Doba sledování byla minimálně 16 týdnů. Nižší dávky HupA neměly vliv na kognitivní funkce, ale vyšší dávky vykazovaly zlepšení. Jsou nutné další studie pro prokázání účinnosti při podávání vyšší dávek HupA.³⁶

3.1.5.4 Inhibitory NMDA receptorů

V pokročilejších stádiích AD bývá postižen glutamátergní systém (systém excitačních aminokyselin), který je důležitý pro paměť a jiné kognitivní funkce. Na NMDA ionotropních receptorech probíhá dlouhodobá potenciace – při opakovaném působení stejného podnětu je každý následující excitační postsynaptický potenciál větší než předchozí a výsledkem je zvýšená tvorba dendritických spinů a zlepšení poznávacích funkcí. Po navázání excitačních aminokyselin na AMPA receptor dojde k depolarizaci postsynaptické membrány. Tím se aktivují NMDA receptory, které otevírají kalciové kanály, a kalcium vstupuje do buněk.^{9,27}

U AD však dochází k excitotoxicitě – nadměrnému zasycení glutamátergních receptorů glutamátem, a snížení zpětného vychytávání glutamátu. Přívod kalcia do neuronů je nadměrný, dochází k aktivaci proapoptických faktorů a nakonec k neuronální apoptóze.²⁷

V terapii se používá memantin – nekompetitivní inhibitor NMDA receptorů. Po perorálním podání se dobře vstřebává a vyvolává minimum nežádoucích účinků. Dávka je titrována až do 20 mg/den buď v jedné denní dávce nebo ve dvou stejných denních dávkách.²⁷

Existují důkazy, že memantin chrání neurony před Aβ, snižuje riziko apoptózy a napravuje škody způsobené volnými radikály. Používá se pro léčbu středně těžkých a těžkých demencí.³⁷

3.1.5.5 Terapie neodpovídající EBM

Existuje mnoho farmakoterapeutických přístupů, jejichž použití není založeno na důkazech. Řada z nich je často používána, ale klinické studie nepotvrdily dostatečnou účinnost nebo studie nebyly prováděny.⁵

3.1.5.5.1 Extrakt Ginkgo biloba EGb761

Standardizované extrakty z listů *Ginkgo biloba* L. (EGb) patří mezi jedny z nejvíce používaných doplňků pro zlepšování paměti v mnoha zemích. Extrakt EGb761 obsahuje 24 % flavonoidních glykosidů, 6 % terpenoidů (konkrétně ginkgolidy A, B, C, J, bilobalidy) a organické kyseliny. Flavonoidy a terpenoidy jsou farmakologicky aktivní složky extraktu EGb761.³⁸

Bylo zjištěno, že podávání tohoto extraktu má pozitivní účinky u AD, ale tyto účinky jsou slabší v porovnání s inhibitory cholinesteras nebo memantinem. Extrakt je v praxi dost poddávkováván. Účinná dávka je 240 mg/den. Je podáván u lehčích forem AD, kde ještě není možné podávat inhibitory cholinesteras.³⁸

Předpokládá se, že by extrakt mohl mít účinky antioxidační, protizánětlivé, zabraňující apoptóze, dále chránící před mitochondriální dysfunkcí, agregací A β , amyloidogenezí. Klinická účinnost zůstává však stále nejasná.³⁸

3.1.5.5.2 Zhášedce volných kyslíkových radikálů

Mezi zhášedce, látky odstraňující kyslíkové radikály, patří mimo jiné vitamin E, C, retinol a β -karoten. V epidemiologických studiích bylo zjištěno, že nízký příjem těchto látek je spojen se zvýšeným rizikem demencí. Současné důkazy z klinických studií však toto nepotvrdily. Je spíše doporučováno užívat tyto vitaminy s opatrností kvůli nežádoucím účinkům, které byly hlášeny.³⁶

3.1.5.5.3 Nootropika

Nootropika jsou látky modulující různé funkce mozku a zlepšující kognitivní procesy, jako je učení, paměť, pozornost a vědomí. Zlepšují mozkovou látkovou přeměnu, využitelnost glukózy a dalších živin a působí proti nedostatku kyslíku. Patří mezi ně piracetam a pyritinol. Neexistují však přesvědčivé studie o jejich skutečném účinku.³⁹

Piracetam zlepšuje neuronální oxidativní metabolismus a plasticitu erytrocytů. Pyritinol vykazuje slabší protizánětlivý efekt a efekt při odstraňování volných kyslíkových radikálů.⁹

3.1.5.5.4 Prekurzory a stimulatory tvorby nervových růstových faktorů

Cerebrolysin je směs AMK a krátkých peptidů, vzniklých hydrolýzou vepřových

mozků. Slouží jako prekurzory tvorby NGF.⁹ V klinických studiích bylo potvrzeno, že má neuroprotektivní účinky a je schválen v řadě zemí na léčbu demence a cévní mozkové příhody. Nicméně dosavadní výsledky nejsou úplně přesvědčivé.⁴⁰

Estrogeny stimulací svých receptorů v mozku uvolňují NGF a zlepšují průtok krve v mozkových tepnách, působením na jejich hladkou svalovinu. Léčebný efekt u žen v postklimakteriu potvrzen nebyl, protektivní účinek je sporný.⁹

3.1.5.5.5 Nesteroidní antiflogistika

Mozek pacientů s AD bývá postižen zánětem, proto se předpokládalo, že protizánětlivá léčba tohoto onemocnění bude účinná. Epidemiologické studie určitý protektivní účinek potvrdily, ale klinické studie tento efekt nedokládají.⁵

Mezi potenciálně účinná léčiva patří ibuprofen, flurbiprofen, indometacin a sulindak. Největší přínos prokázal flurbiprofen, konkrétně jeho R-enantiomer, který má jen malý vliv na cyklooxygenasu. Snížil tvorbu a ukládání A β u myši.⁴¹ Další studie však stále probíhají.

3.1.5.5.6 Ostatní látky

Mezi další používané látky s diskutabilním účinkem patří lecitin, koenzym Q10 a ω -3-nenasycené mastné kyseliny.

Lecitiny jsou lipofilní látky mající na glycerolovém jádře substituovaný fosfatidylcholin a ten se postupně uvolňuje jako prekurzor ACH.⁴² Nejvhodnější je sojový lecitin v dávce 10-20 g/den. Naopak nevhodné jsou lecitiny vaječné, především díky své hepatotoxicitě. Léčba samotným lecitinem příliš úspěšná nebyla, proto je vhodné užívat ho v kombinaci s jinými postupy.¹⁴

3.1.5.6 Nové terapeutické přístupy v léčbě AD

V současné době probíhá mnoho studií zaměřených na potenciální léčebné přístupy v terapii AD. Hlavním bodem zájmu je ovlivnění tvorby A β a neuronálních klubek. Mnoho potenciálních látek bylo zkoumáno v preklinických studiích, ale klinické studie nepřinesly očekávané výsledky.³⁷

3.1.5.6.1 Blokátory, modulátory a aktivátory sekretas

β -Sekretasa je prvním enzymem, který zpracovává APP na cestě vedoucí k tvorbě β -amyloidu. Inhibicí β -sekretas by mělo být dosaženo snížení tvorby A β a tím i amyloidových plaků. Delece genu pro β -sekretasu u myši nebyla doprovázena významnými nežádoucími účinky, z čehož vyplývá, že inhibice β -sekretasy u pacientů se jeví jako potenciálně bezpečná. Několik studií již dokázalo, že podání inhibitoru β -sekretasy, připojeného k nosnému peptidu

pro průnik hematoencefalickou bariérou, zlepšilo kognitivní funkce u myši.⁴³ Některé látky jsou již testovány v klinických studiích.³⁷

γ -Sekretasa se kromě zpracování APP podílí i na štěpení Notch receptoru, za vzniku intracelulární Notch domény, která ovlivňuje proliferaci, vývoj, diferenciaci, stav a přežití buněk. Existují dvě hlavní třídy ovlivňující tento enzym: inhibitory a modulátory γ -sekretasy. Inhibitory enzym zablokují, takže nemůže zpracovávat jiné proteiny. Inhibice Notch receptoru je nežádoucí.³⁷ Původně byly inhibitory γ -sekretasy vyvinuty k zabránění akumulace A β v mozku. V preklinických studiích bylo ale dokázáno, že inhibitory A β účinkují pouze profylakticky a v klinických studiích vyvolávaly tyto inhibitory mnoho nežádoucích účinků. Nebudou tedy pravděpodobně vhodné pro podávání asymptomatickým pacientům s rizikem AD.⁴⁴ Takovým inhibitorem je látka zvaná semagacestat. V klinických studiích vyvolávala gastrointestinální nežádoucí účinky nebo krvácení.³⁶

V některých studiích bylo zjištěno, že ačkoli se po podání inhibitorů γ -sekretas celkové množství A β snížilo, zvýšil se podíl jeho delších fragmentů. Proto se přešlo k výzkumu modulátorů γ -sekretas, které snižují tvorbu těchto delších fragmentů a neovlivňují ani Notch systém. Mezi tyto modulátory je řazen tarenflurbil (R-flurbiprofen).⁴⁴ V druhé fázi klinické studie vykazovala tato látka slibné účinky. Třetí fáze byla však velkým zklamáním, proto tato látka není používána.³⁷

Za fyziologických podmínek je APP štěpen α -sekretasou, bez následné tvorby A β . Snahou je tedy najít takové látky, které by zvýšily α -sekretasovou aktivitu. Potenciálním stimulatorem α -sekretasy je látka bryostatin. Momentálně se nacházející v druhé fázi klinické studie.³⁷

3.1.5.6.2 Blokátoři agregace A β

Tramiprosat je glykosaminoglykan, který se váže na A β a brání jeho oligomerizaci a agregaci. Vykazoval slibné účinky v druhé fázi klinického hodnocení, ale výsledky třetí fáze byly sporné. Nicméně sekundární analýzy dokázaly, že jeho podávání vedlo ke zlepšení kognitivních funkcí.³⁷

Kolostrinin je peptid izolovaný z ovčího kolostra. Ovlivňuje učení, paměť a celkově kognitivní funkce. Studie ukázala, že kolostrinin může inhibovat agregaci A β a rozkládat již vytvořené fibrily.³⁷

Antiagregační vlastnosti vykazoval i hormon melatonin. Podáváním melatoninu byla snížena tvorba plaků u myši. Nicméně zatím není jasné, zda se jedná o přímý účinek melatoninu nebo je za účinek zodpovědná jeho antioxidační a protizánětlivá aktivita.³⁷

3.1.5.6.3 Imunoterapie zaměřená proti A β

Vakcinace proti tvorbě amyloidových plak je dalším perspektivním přístupem léčby AD. V průběhu studie prvních vakcín se však u 6 % pacientů rozvinula meningoencefalitida, proto byl výzkum přerušeno. Později bylo ale dokázáno, že až 60 % pacientů si vytvořilo protilátky.³⁷

Bapineuzumab je monoklonální protilátka proti A β , vázající se s vysokou afinitou k N-konci A β , zvláště k A β již uloženému ve formě plaků. Jednalo se o první pasivní imunizaci zkoušenou u AD. Výsledky druhé fáze klinické studie však nebyly průkazné. Problémem této látky je hlavně častý výskyt vazogenního edému při jejím podávání.³⁷

Solanezumab je další monoklonální protilátkou, která dokončila třetí fázi klinického hodnocení. Váže se na jiné místo než bapineuzumab a mnohem více k volnému A β , než k tomu vázanému v placích. Byl dobře tolerován.³⁷

Slibné výsledky v preklinickém hodnocení vykazovala i látka gantenerumab. Momentálně probíhá třetí fáze klinického hodnocení.³⁷

3.1.5.6.4 Blokáda enzymu GSK3 β

Fosforylace τ -proteinu přispívá k nestabilitě mikrotubulů. Jedním z hlavních enzymů podílejících se na fosforylaci, je enzym GSK3 β . Lithium a valproát působí inhibičně na tento enzym. Menší studie účinek těchto látek prokázaly, ale větší kontrolované studie výsledky nepotvrdily.³⁷

Tideglusib je dalším inhibitorem GSK3 β . Studie neprokázaly protektivní účinek v léčbě AD, nicméně studie nebyla navržena jako terapeutická, ale bezpečnostní. Pro získání lepších výsledků je pravděpodobně potřeba zahájit terapii dříve a podávat látku déle.⁴⁵

3.1.5.6.5 Stabilizátory mikrotubulů

Jako stabilizátor mikrotubulů se osvědčila antimitotická sloučenina paklitaxel. Z důvodu jeho používání jako silného léku na rakovinu, existují obavy o bezpečnost používání u nemaligních onemocnění. Další látkou z této skupiny je epothilon D. Dlouhodobé podávání nízkých dávek vedlo ke stabilizaci mikrotubulů.³⁷

Nejvýznamnější látkou je pravděpodobně davunetid, peptid z osmi AMK odvozený od proteinu ADNP (activity-dependent neuroprotective protein), který je schopen snížit fosforylaci τ -proteinu a hladiny A β u zvířecích modelů. Přesný mechanismus davunetidu není znám. Klinicky testována byla nasální forma davunetidu. Nebyla však prokázána jeho účinnost.⁴⁶

3.1.5.6.6 Zvýšení τ -degradace

Další přístupem v terapii je zvýšit odbourávání τ -proteinu, což sníží jeho toxicitu.

Velkou roli zde hraje HSP 90 (protein teplotního šoku), který se podílí na skládání denaturované bílkoviny. Kurkumin inhibuje HSP 90, zmírňuje patologické projevy τ -proteinu u myši, tím že potlačí tvorbu neuronálních klubek a podpoří rozpouštění klubek již vytvořených.³⁷

3.1.5.6.7 Ovlivnění mitochondriálních funkcí

Antioxidanty účinkují při odstraňování volných kyslíkových radikálů, vhodnější by však bylo úplné zabránění jejich vzniku. Koenzym Q10, neboli ubichinon, je sloučenina s potenciálními neuroprotektivními účinky. Potlačuje tvorbu volných radikálů a stabilizuje mitochondriální funkce. V klinických studiích jeho účinek prokázán nebyl. Idebenon je ve vodě rozpustný analog ubichinonu, který byl rovněž testován na lidech. Studie však profit z léčby nepotvrdila. Nedostatečná účinnost těchto látek může být způsobena tím, že obě vyžadují neporušený a plně funkční elektronový transportní řetězec.³⁷

3.1.5.6.8 Deriváty takrinu

Takrin je nekompetitivní reverzibilní inhibitor AChE a BuChE, vázající se na katalytické místo AChE. Jeho hlavním problémem bránícím používání jsou četné nežádoucí účinky. Této problematice se věnuje řada pracovišť, včetně Fakulty vojenského zdravotnictví Univerzity obrany ve spolupráci s Katedrou farmaceutické chemie Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy. 7-MEOTA (7-methoxytakrin) je méně toxický derivát takrinu inhibující cholinesterasy.⁴⁷

Deriváty kumarinu mají celou řadu biologických účinků, včetně antioxidačních, antimikrobiálních, antikoagulačních, protizánětlivých a protinádorových. Nedávné studie také prokázaly, že analoga kumarinů vykazují inhibiční aktivitu vůči AChE. Výzkum se proto zaměřil na spojení takrinových derivátů s kumarinovými deriváty. Některé sloučeniny prokázaly větší inhibiční aktivitu než takrin a 7-MEOTA.⁴⁷

3.1.5.6.9 Inhibitory prolyloligopeptidasy

POP je cytosolová serinová peptidasa, která štěpí peptidové vazby na karboxylovém konci prolinu. Je rozšířena v četných orgánech lidského těla, hlavně v mozku. Je zapojena do různých aktivit, např. učení, paměť, dělení buněk a jejich diferenciaci, a také do mnoha psychologických poruch. V současné době je na ni zaměřena pozornost, jako na cíl pro léčbu schizofrenie, bipolární afektivní poruchy a AD. Proto jsou intenzivně hledány látky inhibující POP.⁴⁸

Mezi nejvíce testované inhibitory POP patří Z-Pro-Prolinal, JTP-4819, ONO-1603,

SUAM-1221 a S 17092. Ve své struktuře obsahují různě substituovaný pyrrolidin, kromě S 17092, který obsahuje thiazolidin.⁴⁹

3.2 *Argemone grandiflora* Sweet (Papaveraceae)

3.2.1 Taxonomické zařazení⁵⁰

Oddělení:	Magnoliophyta
Třída:	Magnoliopsida
Podtřída:	Magnoliidae
Řád:	Papaverales
Čeleď:	Papaveraceae
Rod:	<i>Argemone</i> L.
Druh:	<i>Argemone grandiflora</i> Sweet – pleskanka velkokvětá



Obr. 1 *Argemone grandiflora* Sweet⁵¹

3.2.2 Charakteristika čeledi Papaveraceae

Čeleď Papaveraceae (mákovité) zahrnuje jednoleté i vytrvalé byliny se střídavými, zpeřenými listy bez palistů, které jsou řapíkaté nebo přisedlé. Všechny druhy mají oboupohlavné, miskovité květy s jedním pestíkem a mnoha tyčinkami. Mají 2 nebo 3 kališní lístky a 4 až 12 samostatných okvětních lístků. Plodem je tobolka. Některé druhy jsou pichlavé. Rostliny se vyskytují hlavně v subtropickém a mírném pásu severní polokoule.⁵²

3.2.3 Charakteristika rodu *Argemone* L.

Rod *Argemone* L. zahrnuje jednoleté a vytrvalé byliny, zřídka i keře, vyskytující se převážně v teplých a suchých oblastech, původně Ameriky. Jeden druh, *Argemone glauca*, se vyskytuje na Havajských ostrovech a některé jiné druhy se rozšířily do celého světa.^{53,54} Vyskytují se již běžně v Indii, Nepálu, Bangladéši a na Mauriciu, a to až do nadmořské výšky 1500 m.⁵⁵

V severní Americe se tento rod vyskytuje hlavně na jihozápadě USA a severu Mexika. V jižní Americe je výskyt omezen převážně na oblast Chile.⁵³

Celkem rod *Argemone* L. zahrnuje 24 druhů.⁵⁴ Název je odvozen z latinského *argema*, což znamená v překladu „katarakta“. Některé druhy jsou pěstovány jako okrasné, většinou se však jedná o plevel.⁵⁵

Stonky rostlin jsou vzpřímené, větvené, 40-150 cm vysoké. Obsahují bílou nebo oranžovou mízu. Postavení listů je střídavé, listy jsou přisedlé a čepel zpeřeně laločnatá se zubatými okraji. Květy mají 2 nebo 3 kališní lístky, každý ukončený dutým hrotem. Okvětních lístků je 6, liší se barvou a velikostí u různých druhů. V rozkvětu má květ 4-15 cm. Většinou je bílý, žluté nebo růžové květy jsou méně časté. Parakarpní gyneceum je tvořeno 3-7 pestíky. Tyčinek je 20-250 nebo i více. Plodem je tobolka.^{54,55}

3.2.4 Morfologický popis *Argemone grandiflora* Sweet

Argemone grandiflora Sweet je jednoletá bylina, dorůstající do výšky 90-120 cm. Stonek je vzpřímený a větvený, listy přisedlé, kopinaté až eliptické, hrubě vykrajované s bílou žilnatinou. Na okrajích jsou opatřeny ostny. Kvete od června do října. Kalich je složen ze tří hladkých, oválných kališních lístků, zakončených ostrým hrotem, který odpadává, jakmile rostlina rozkvétá. Okvětní lístky jsou velké asi 10 cm, bílé a je jich 6 ve dvou řadách. U základu jsou úzké a postupně se rozšiřují. Okraje jsou zakulacené a mírně zvlňené. Typické je velké množství tyčinek obklopujících semeník. Blizny jsou čtyři, na okrajích jsou fialové. Tobolka je nejširší uprostřed, k okrajům se zužuje.^{56,57}

3.2.5 Účinky látek rodu *Argemone* L.

Semena rodu *Argemone* L. jsou podobná semenům brukve černé a je velmi riskantní podávat je v potravě hospodářským zvířatům, hlavně drůbeži. Již 1 % semen v krmivu jednodenního kuřete způsobí zpomalení růstu a smrt po dvou týdnech krmení. Krmení krys pouze těmito semeny u nich vyvolalo sedaci, edém a nakonec smrt. V oblasti patologických změn se u nich vyskytla hepatocelulární nekróza a jiné degenerativní změny jater a ledvin.⁵⁵

Olej získávaný ze semen těchto rostlin má emetický a pročišťovací účinek, i když mírnější než olej ricinový. Konzumace kontaminovaného oleje po delší dobu vyvolává řadu potíží, jako je gastroenteritida, erytém, oligurii a bolesti, hlavně v pánevní oblasti. Účinky se projevují i v jiných tkáních, v důsledku dilatace a zvýšené permeability kapilár. Někdy může dojít i k srdečnímu selhání.⁵⁵

Kontaminace pšenice semeny *Argemone* L. je rovněž starostí pro člověka, neboť může vyvolávat zácpu, edém, glaukom a vzácněji i smrt.⁵⁵

3.2.6 Obsahové látky *Argemone grandiflora* Sweet

3.2.6.1 Isochinolinové alkaloidy

Rostliny rodu *Argemone* L. jsou bohaté na obsah isochinolinových alkaloidů. Jednotlivé druhy se liší spektrem a množstvím alkaloidů.

Existuje několik typů isochinolinových alkaloidů, z nichž jsou v rodu *Argemone* L. přítomny tyto^{58,59}:

- typ pavinanový
- typ protopinový
- typ benzyloisochinolinový
- typ benzofenanthridinový
- typ aporfinový
- typ protoberberinový

Tab. 1 Výskyt jednotlivých alkaloidů u některých druhů rodu *Argemone* L.⁵⁸

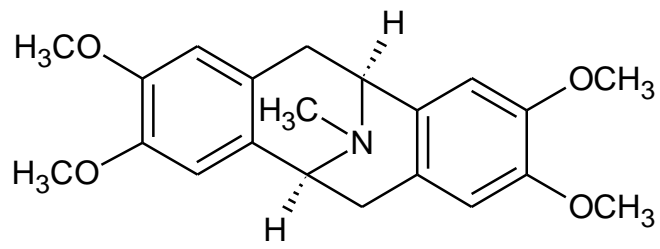
Alkaloidy	<i>A. grandiflora</i>	<i>A. ochroleucea</i>	<i>A. platyceras</i>
Armepavin	+	-	+
Retikulin	+	-	+
Escholtzin	+	-	+
Platycerin	+	-	+
Argemonin	+	-	+
Munitagin	+	-	-
Isonorargemonin	+	-	+
Glaucin	+	-	-
Bisnorargemonin	+	-	+
Protopin	+	+	+
Allokryptopin	+	+	+
Kryptokavin	+	+	+
Kryptopalmatin	+	-	+
Dihydrosanguinarin	+	+	-
Dihydrochelerythrin	-	+	-
Demethylchelerythrin	-	+	-

3.2.6.1.1 Pavinanové alkaloidy

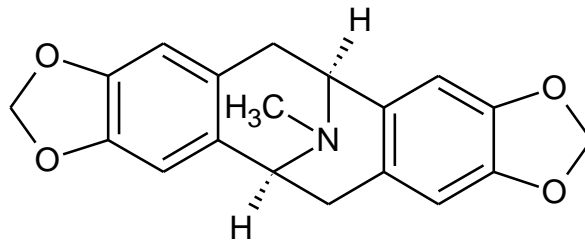
Mezi alkaloidy tohoto typu, vyskytující se u *Argemone grandiflora* Sweet, patří (-)-escholtzin, (-)-platycerin, (-)-argemonin, (-)-munitagin, (-)-isonorargemonin a (-)-bisnorargemonin.⁵⁸ Obecně je můžeme nalézt v čeledích Papaveraceae, Berberidaceae, Lauraceae a Ranunculaceae.⁶⁰

Jsou odvozeny z tetrahydrobenzylisochinolinového alkaloidu (+)-retikulinu. Prvním izolovaným alkaloidem byl (-)-argemonin, získaný z *Argemone hispida* a *Argemone munita*, známý také jako (-)-*N*-methylpavin.^{61,62}

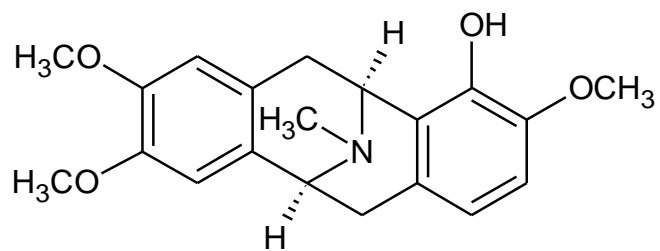
A. grandiflora a *A. platyceras* jsou podobné druhy, liší se však hlavně přítomností (-)-munitaginu, který nebyl přítomen v alkaloidním extraktu *A. platyceras*.⁵⁸



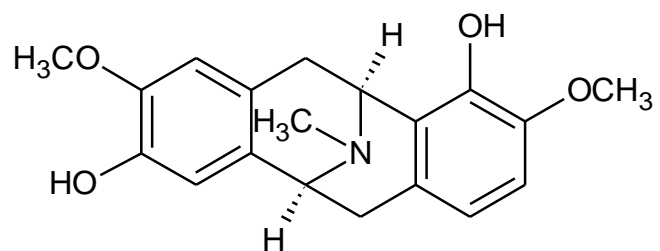
(-)-argemonin



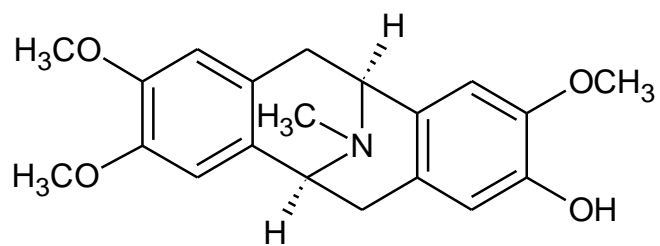
(-)-escholtzin



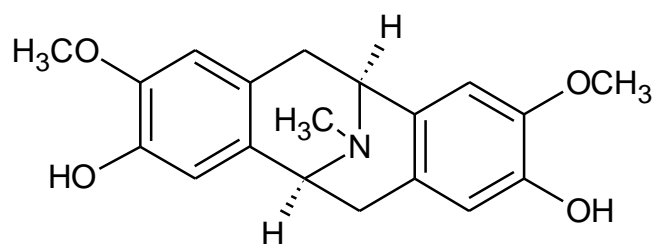
(-)-platycerin



(-)-munitagin



(-)-isonorargemonin



(-)-bisnorargemonin

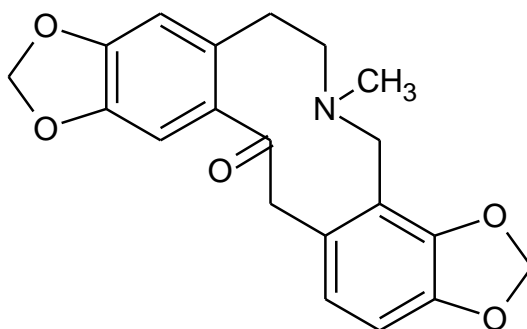
Obr. 2 pavinanové alkaloidy

3.2.6.1.2 Protopinové alkaloidy

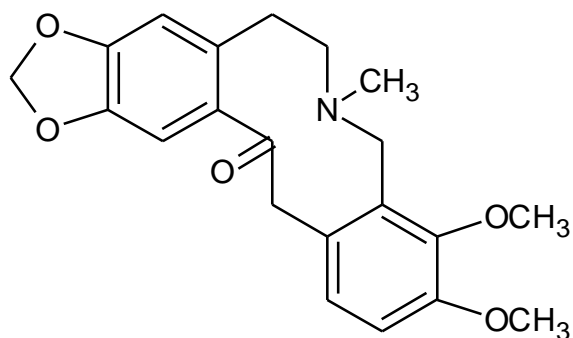
Z *Argemone grandiflora* Sweet byly vyizolovány protopinové alkaloidy a to konkrétně protopin, allokryptopin, kryptokavin a kryptopalmatin.⁵⁸ Vyskytují se nejčastěji v čeledích Fumariaceae, Papaveraceae, Ranunculaceae, Rutaceae a Sapindaceae.⁶³ Vznikají z protoberberinového alkaloidu (-)-skulerinu oxidací.⁶⁴

Bylo zjištěno, že protopin významně ovlivňuje kardiovaskulární systém. Má antiarytmické, antihypertenzivní, negativně ionotropní a vasodilatační účinky. Inhibuje vstup vápníku do buňky a výstup draslíku z buňky. Dalším jeho účinkem je účinek antitrombotický, protože inhibuje faktor aktivující destičky a syntézu tromboxanu. Vykazuje také anticholinergní, antihistaminové a antibakteriální účinky.⁶³

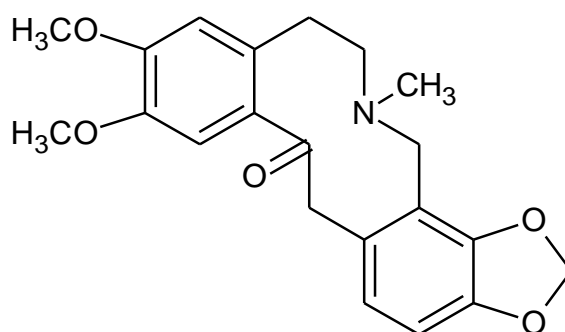
Allokryptopin má podobně jako protopin antiarytmické účinky. Oba navíc prokázaly neuroprotektivní účinek, jsou inhibitory AChE a protopin inhibuje mozkovou GABA.⁶³



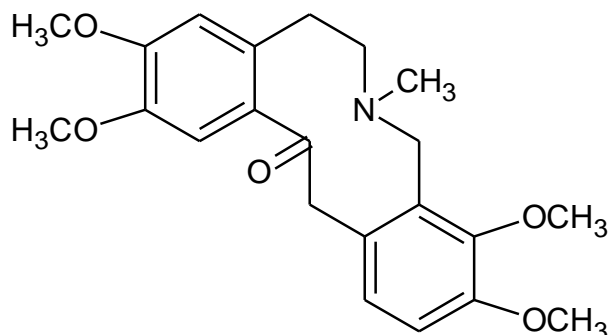
protopin



allokryptopin



kryptokavin



kryptopalmatin

Obr. 3 protopinové alkaloidy

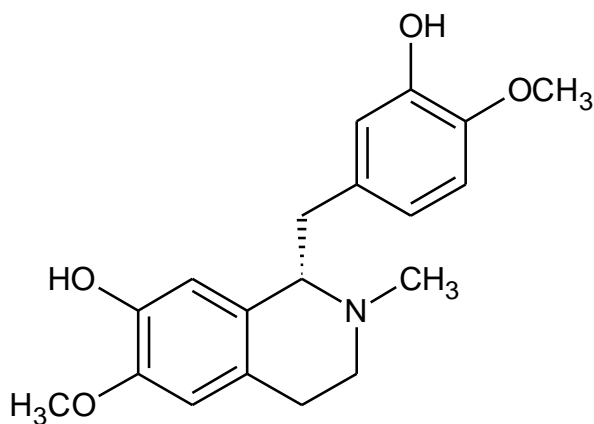
3.2.6.1.3 Benzylochinolinové alkaloidy

Tyto alkaloidy se vykytují hlavně v čeledích Berberidaceae, Papaveraceae, Ranunculaceae, Menispermaceae a Fumariaceae.⁶⁵ V *Argemone grandiflora* Sweet je přítomen (–)-armepavin a (+)-retikulin, (+)-laudanisin a (+)-kodamin.^{58,59}

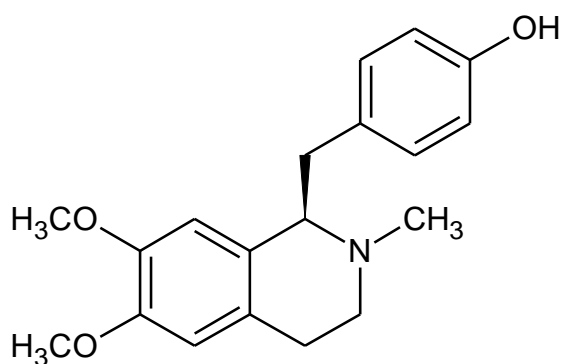
(+)-Retikulin je alkaloid vznikající z (+)-norkoklaurinu, přičemž dále se z něj tvoří (+)-skulerin, který je předlohou pro tvorbu berberinových, protopinových, pavinanových a benzofenanthridinových alkaloidů. Z (+)-retikulinu se tvoří také morfinanové alkaloidy,

morfin a kodein.⁶⁴ Bylo zjištěno, že retikulín má antifungální a antimalarický účinek.⁶⁶

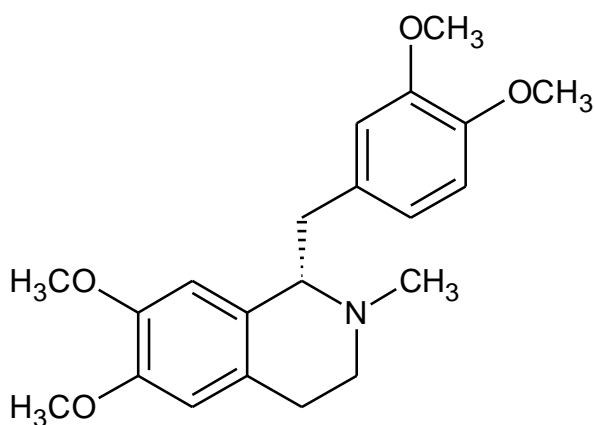
(+)-Laudanosin je metabolit atrakuria, periferního myorelaxancia. Má konvulzivní účinky a může způsobovat záchvaty epilepsie. Dále může vyvolávat hypotenzi.⁶⁷



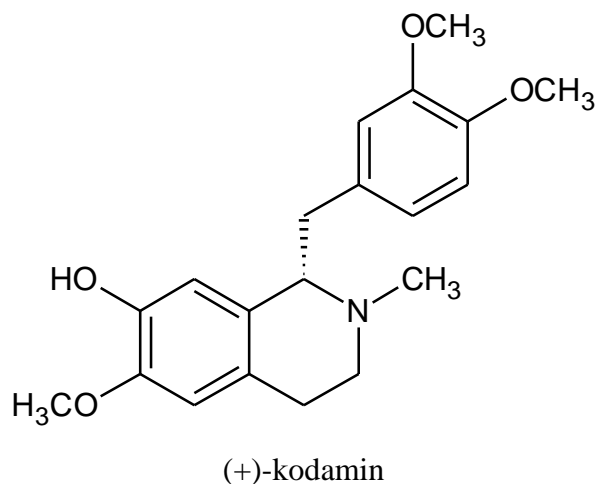
(+)-retikulín



(-)-armepavin



(+)-laudanosin



Obr. 4 benzyliisochinolinové alkaloidy

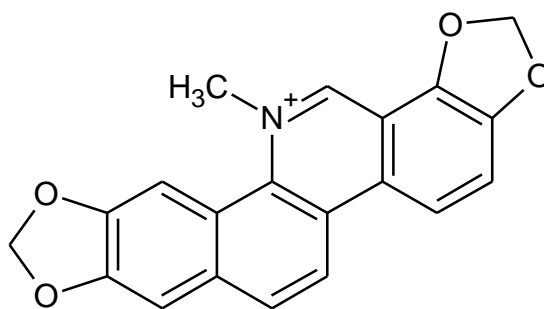
3.2.6.1.4 Benzofenanthridinové alkaloidy

Jak již bylo zmíněno, benzofenanthridinové alkaloidy vznikají z (+)-retikulinu cestou přes (+)-skulerin.⁶⁴ V *Argemone grandiflora* Sweet se vyskytuje alkaloid sanguinarin, dihydrosanguinarin a chelerythrin. V *Argemone ochroleucea* je navíc přítomen i dihydrochelerythrin a demethylchelerythrin.⁵⁸ Tyto alkaloidy mají hlavně účinky antibakteriální, protizánětlivé, lokálně anestetické, sympatolytické a cytotoxické.⁶⁸

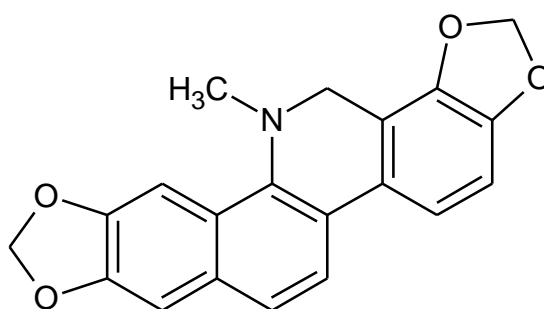
Sanguinarin je znám pro své antimikrobiální a antifungální účinky. Důležité jsou také jeho účinky antiproliferativní a cytotoxické. Rostliny syntetizují sanguinarin na obranu proti bakteriím nebo houbám. Pro vlastní ochranu mohou produkující buňky redukovat sanguinarin na méně toxický dihydrosanguinarin. Tento proces redukce sanguinarinu byl zamenám i u krys při testech *in vitro*.⁶⁹

Alkaloidy sanguinarin a dihydrosanguinarin jsou pravděpodobně zodpovědné za kontaminaci olejů ze semen *Argemone mexicana* a z vyvolání otrav u lidí. Bylo prokázáno, že dihydrosanguinarin má podobně jako sanguinarin cytotoxické účinky a vyvolává apoptózu a nekrózu buněk. Je však méně cytotoxický než sanguinarin.⁶⁹

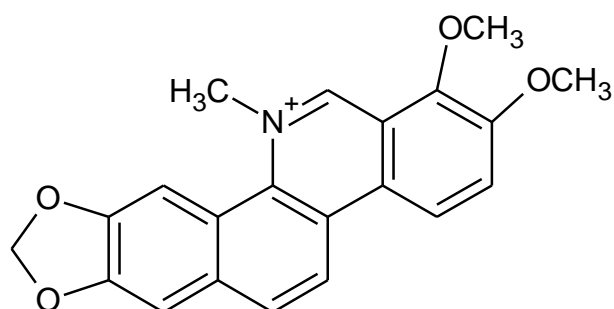
Chelerythrin je alkaloid mající protinádorové účinky, inhibuje proteinkinasu C a navozuje apoptózu v rakovinotvorných buňkách.⁷⁰



sanguinarin



dihydrosanguinarin



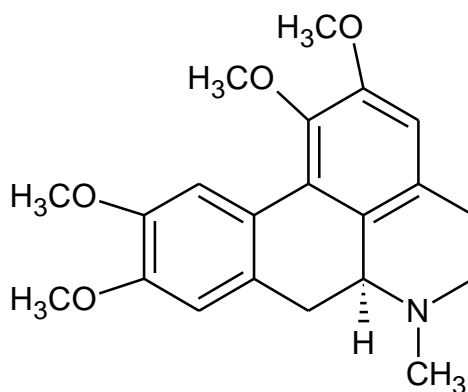
chelerythrin

Obr. 5 benzofenanthridinové alkaloidy

3.2.6.1.5 Aporfinové alkaloidy

Jediným zástupcem těchto alkaloidů u *Argemone grandiflora* Sweet je alkaloid (+)-glaucin. Vzniká z (\pm)-laudanosu a (\pm)-5-methoxylaudanosu.⁷¹

(+)-Glaucin je antitusikum s protizánětlivým a mírně analgetickým účinkem. Může způsobovat halucinace, únavu a ospalost.⁷²



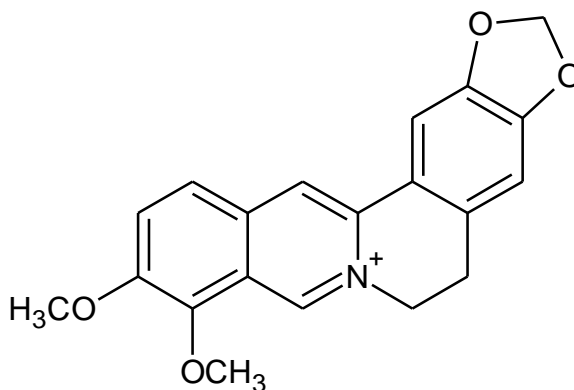
(+)-glaucin

Obr. 6 aporfinové alkaloidy

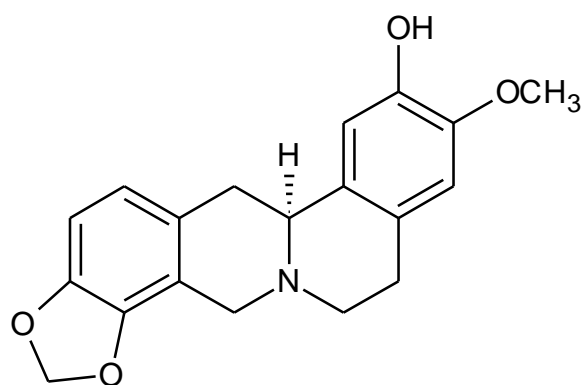
3.2.6.1.6 Protoberberinové alkaloidy

Tyto alkaloidy se vyskytují hlavně v čeledích Papaveraceae, Berberidaceae, Ranunculaceae, Menispermaceae a Rutaceae. Hlavním alkaloidem této skupiny je berberin, který byl vyizolován i z *Argemone grandiflora* Sweet. Dalším vyizolovaným alkaloidem je (–)-cheilanthifolin a (–)-korypalmin.^{62,59} Většina protoberberinových alkaloidů existuje v rostlinách ve formě tetrahydroprotoberberinové nebo jako kvarterní soli. Jejich hlavní účinky jsou: inhibice syntézy DNA, inhibice syntézy proteinů a membránové permeability.⁷³

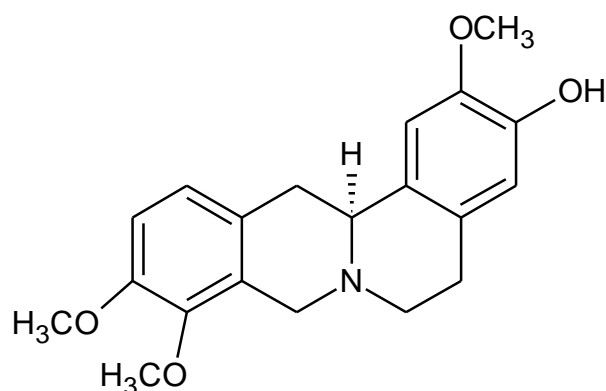
Berberin vzniká stejně jako protopin ze (–)-skulerinu.⁶⁴ Vykazuje účinky antibakteriální, používá se při očních infekcích nebo podráždění oka. Dále zvyšuje sekreci žluči a pravděpodobně je účinný při léčbě AIDS, neboť inhibuje HIV-1RT reverzní transkriptázu. Z jeho dalších účinků je třeba zmínit účinek protizánětlivý, antimalarický, antidiabetický a hepatoprotektivní. V tradiční medicíně se extrakt z kořenů obsahující berberin používal pro léčbu cholelitiázy a onemocnění jater.^{65,73} Je také významným inhibitorem AChE, BuChE a POP.



berberin



(-)-cheilanthifolin



(-)-korypalmin

Obr. 7 protoberberinové alkaloidy

3.2.6.2 Inhibice AChE a BuChE alkaloidy z čeledi Papaveraceae

Některé alkaloidy, vyskytující se u rostlin z čeledi Papaveraceae, inhibují lidské cholinesterasy. Inhibiční aktivitu vykazují také alkaloidní extrakty rodu *Argemone* L. Tato aktivita byla stanovena u ethanolových a ethylacetátových extraktů *A. grandiflora*, *A. ochroleuceae* a *A. platyceras*.³

Tab. 2 Hodnoty IC₅₀ ethanolových a ethylacetátových extraktů rodu *Argemone* L.³

	EtOH		EtOAc	
	IC ₅₀ µg/ml		IC ₅₀ µg/ml	
	AChE	BuChE	AChE	BuChE
Argemone grandiflora	44,87	109,7	17,35	45,57
Argemone platyceras	34,32	162,4	20,19	69,71
Argemone ochroleucea	20,53	108,1	21,93	49,62

4 Experimentální část

4.1 Materiál a vybavení

4.1.1 Rozpouštědla a chemikálie

- ethanol 95%, denaturovaný methanolem, p. a., (Penta a.s., ing. Švec) (EtOH)
- chloroform p. a. (Penta a.s., ing. Švec) (CHCl₃)
- diethylether č. (LachNer) (Et₂O)
- destilovaná voda (H₂O)
- kyselina chlorovodíková 35%, p. a. (Lachema) (HCl)
- lékařský benzín lékopisné kvality ČL 2009 (Penta a.s., ing. Švec) (LB)
- diethylamin p.a. (LachNer) (Et₂NH)
- n-hexan p.a. (Penta a.s., ing. Švec) (C₆H₁₄)
- toluen p. a. (Penta a.s., ing. Švec) (C₆H₅CH₃)
- cyklohexan p. a. (Penta a.s., ing. Švec) (C₆H₁₂)

4.1.2 Pomocné látky

- uhličitan sodný 10% roztok (w/w)
- kyselina sírová 2% (w/w)
- křemelina Celite C 535 John's Manville (Sigma-Aldrich)

4.1.3 Detekční činidla

- Dragendorffovo činidlo – skládá se z roztoku A a roztoku B v poměru 1:1,
roztok A vzniká rozpuštěním 1,7 g dusičnanu bismutitého zásaditého a 20 g kyseliny vinné v 80 ml vody
roztok B vzniká rozpuštěním 16 g jodidu draselného ve 40 ml vody
- Meyerovo činidlo – vzniká rozpuštěním 1,36 g chloridu rtuťnatého a 5 g jodidu draselného ve 100 ml vody

4.1.4 Vytvořené soustavy pro tenkovrstvou chromatografii

- C₆H₁₂ + C₆H₅CH₃ + Et₂NH (8:1:1, 7:2:1, 6:3:1, 45:45:10)
- C₆H₅CH₃ + Et₂NH (9:1)
- C₆H₁₂ + Et₂NH (9:1)

4.1.5 Chromatografické adsorbenty

- Oxid hlinitý (Al_2O_3) deaktivovaný 6% H_2O , stupeň deaktivace Brockmann III, velikost zrn 40-200 μm (ACROSS)
- Kieselgel SiO_2 60 F254, fa Merck, hliníková deska s vrstvou silikagelu pro TLC s hloubkou vrstvy 0,2 mm

4.1.6 Přístrojové vybavení

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

4.2 Všeobecné postupy

4.2.1 Příprava a čištění rozpouštědel

Všechna rozpouštědla byla před použitím pro chromatografii na sloupci přečištěna destilací, přičemž prvních 5 % bylo odstraněno (možný obsah vody) a zbylých asi 90 % rozpouštědla bylo vydestilováno a chráněno před světlem uchováváním v hnědých nádobách.

4.2.2 Odpařování extraktů a frakcí

Odpařování frakcí získaných při sloupcové nebo preparativní chromatografii bylo prováděno na vakuové odparce při 40 °C za sníženého tlaku.

4.2.3 Sušení a skladování frakcí a izolovaných čistých látek

Získané frakce a izolované čisté látky byly umístěny do exsikátoru na dobu nejméně 24 hodin a dále byly uchovávány při 2-8 °C v chladničce.

4.2.4 Chromatografie

4.2.4.1 Sloupcová chromatografie

Sloupcová chromatografie byla připravena naplněním kolony adsorbentem (oxid hlinitý neutrální - Al_2O_3 , fa ACROSS, velikost zrn 40-200 μm , deaktivovaný 6% H_2O , stupeň deaktivace Brockmann III) a navrstvením vzorku na adsorbent. Vzorek se nanáší v roztoku, ve směsi s adsorbentem (tzv. roztěr).

4.2.4.2 Tenkovrstvá chromatografie

Pro zjištění přítomnosti nebo čistoty alkaloidů se používá metoda vzestupné tenkovrstvé chromatografie. Vyvíjení probíhá v různě velkých uzavřených komorách nasycených parami mobilní fáze. Skvrny je možné pozorovat pod UV lampou při vlnové délce 254 nm a 366 nm. Zviditelnění skvrn alkaloidů se provádí Dragendorffovým činidlem, kdy skvrny mají oranžovou barvu.

4.2.5 Strukturní analýza

4.2.5.1 GC-MS analýza

Měření probíhalo na spektrometru Agilent 7890 GC 5975, pracujícím v režimu EI při 70 eV. Separace byla provedena na koloně DP-5 MS (30 m × 0,25 mm × 0,25 μ, výrobce Agilent Technologies Santa Clara, CA, USA). Teplota byla nastavena na 100 °C a dále se zvyšovala rychlostí 15 °C/min až do teploty 180 °C, která byla udržována po dobu 1 minuty. Teplota dále rostla do 300 °C rychlostí 5 °C/min a tato teplota byla udržována po dobu 40 minut. Teplota injektoru byla nastavena na 280 °C a průtok helia (nosného plynu) byl nastaven na 0,8 ml/min. Detekční rozmezí bylo m/z 35-600, teplota detektoru 200 °C. 1 μl alkaloidního roztoku (1 mg/ml) byl nastříknut ve „split mode“ při poměru 1:10. Alkaloidy byly identifikovány porovnáním jejich MS spektra se spektry v NIST knihovně, v literatuře a se spektry látek, které byly již izolovány na Katedře farmaceutické botaniky a ekologie FaF UK.

4.2.5.2 NMR analýza

Měření NMR spekter probíhalo na přístroji Varian Iniova 500. Pracovní frekvence pro jádra byla ^1H 499,9 MHz a ^{13}C 125,7 MHz. Spektra ^1H byla měřena v inverzní 5 mm ID PGF sondě s využitím standartních pulzních frekvencí. ^{13}C byla naměřena v 5 mm SW širokopásmové sondě. Měření bylo provedeno při 25 °C v deuteriochloroformu.

4.2.5.3 Optická otáčivost

Změření optické otáčivosti bylo provedeno zařízením Polarimetr P3000 (A. Krüss Optronic, Germany) při 25 °C v prostředí chloroformu.

4.2.5.4 Teplota tání

Teploty tání byly měřeny v bodotávku Büchi Melting Point B-450. Na začátku byl nastaven růst teploty 15 °C/min až do hodnoty o 10 °C nižší, než byla předpokládaná hodnota teploty tání dané látky. Poté byl růst teploty zpomalen na 0,5 °C/min až do teploty, která byla o

10°C vyšší, než byla předpokládaná teploty tání látky.

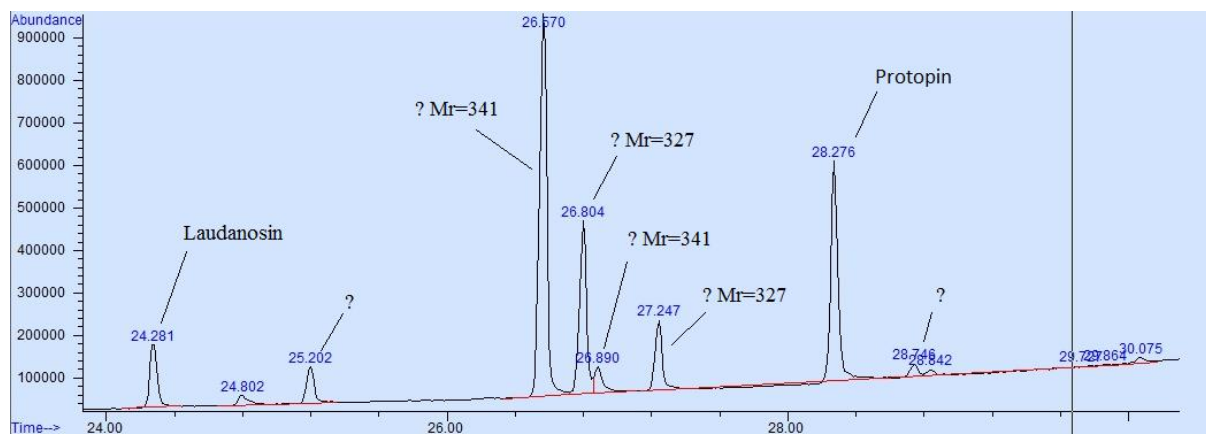
4.3 Izolace alkaloidů

4.3.1 Výběr rostlinného materiálu

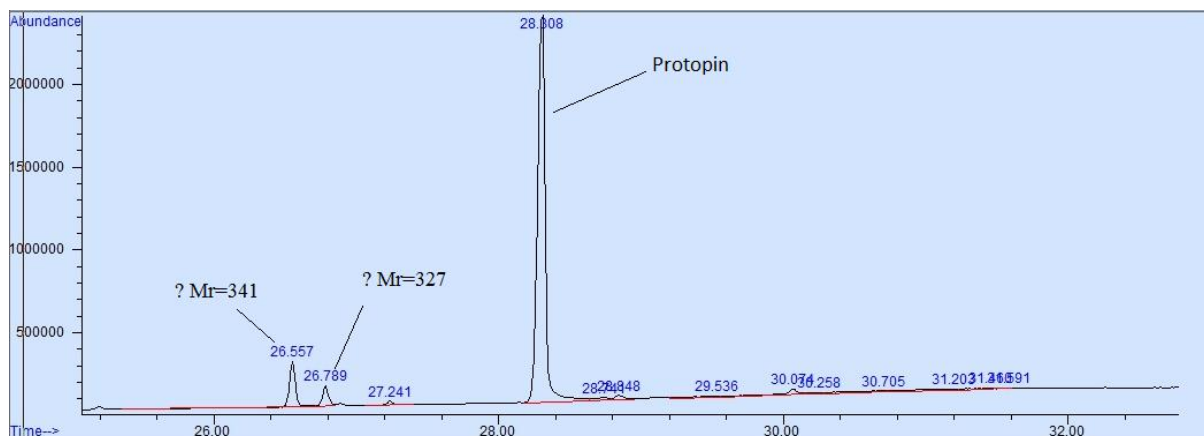
Argemone grandiflora Sweet byla vybrána na základě screeningu potenciálních inhibitorů cholinesteras na Katedře farmaceutické botaniky a ekologie. Příprava ethylacetátových extraktů pro screening probíhala podle postupu rigorózní práce Mgr. Petry Suchánkové.³ Kořeny i nať *Argemone grandiflora* Sweet byly zpracovávány dohromady, protože extrakty z obou částí rostlin vykazovaly jak podobný profil obsahových látek, tak i podobnou cholinesterasovou inhibiční aktivitu.

Tab. 3 Inhibiční aktivita alkaloidních extraktů nati a kořene *Argemone grandiflora* Sweet

Vzorek	IC ₅₀	
	AChE	BuChE
nať	15,75 ± 2,89 µg/ml	25,47 ± 1,82 µg/ml
kořen	17,60 ± 2,83 µg/ml	35,69 ± 6,57 µg/ml
galanthamin	1,710 ± 0,065 µM	42,30 ± 1,30 µM
huperzin A	0,033 ± 0,001 µM	>1000 µM
fysostigmin	0,063 ± 0,001 µM	0,130 ± 0,004 µM



Obr. 8 Chromatogram nati GCMS



Obr. 9 Chromatogram kořene GCMS

U kořenů AG byla jako hlavní určena látka protopin (98 % shoda s protopinem, procentuální zastoupení z 88,5 % z hlavních píků podle TIC). Nalezeny byly ještě 2 sloučeniny s Mr=341 (8.3%) a 327 (3.2 %) v minoritním zastoupení, které se podle databáze NIST nepodařilo identifikovat. Nať byla mnohem bohatší na spektrum obsahových látek. Celkově bylo nalezeno 11 látek, mezi majoritně kvantitativně zastoupené sloučeniny patřil opět protopin (Rt=28,276 min), dále sloučeniny s Mr=327 (Rt 26,804 min) a Mr=341 (Rt=26,570), které se nepodařilo identifikovat. Mezi majoritně zastoupené součeniny patřil laudanosin (Rt=24,281 min), sloučeniny s Mr=341 (Rt 26,890 min), Mr=327 (Rt 27,247 min).

4.3.2 Rostlinný materiál

6,22 kg natě a kořene *Argemone grandiflora* Sweet jsou původem z botanické zahrady Kraví Hora - vyseto 2007, sběr 30. 8. 2007. 1,726 kg natě a kořene pochází z Botanické zahrady léčivých rostlin FaF UK. Sběr byl proveden 2. 9. 2013.

4.3.3 Extrakce drogy a zpracování extraktu

6,22 kg drogy bylo extrahováno vyvařením 95% EtOH v poměru 1:6, dvakrát po dobu 30 minut. Ethanolové extrakty byly spojeny a odpařeny. Temně zelený olejovitý odparek byl smíchán s 1,5 litrem vody, rozeřtá na 80 °C. Byla přidána 2% HCl (pH 1) a suspenze byla zředěna vodou na 3 litry. Po zchlazení byl roztok zfiltrován přes vliselin (odstraněn chlorofyl a sedimenty). Vzniklo 2,7 litru vodného hnědého extraktu.

Tento extrakt byl zalkalizován 10% Na₂CO₃ na pH 9-10 a suspenze vytřepána 3x 700 ml CHCl₃. Chloroformové výtřepky byly odpařeny. Bylo získáno 15,6 g tmavě hnědého, velmi viskózního produktu.

Dále byl výtřeppek rozpuštěn za tepla (cca 70 °C) ve 200 ml 2% HCl, roztok byl zředěn vodou na 400 ml, sonikován, posléze zfiltrován, filtry promyty a filtráty spojeny. Celkový

obsah filtrátu byl po zředění 700 ml. Kyselý roztok alkaloidů (pH ~ 1) byl vytřepán 2x 200 ml Et₂O. Vodná fáze byla zalkalizována 10% Na₂CO₃ na pH 9-10 a vytřepána 4x 300 ml Et₂O. Tento Et₂O roztok byl promyt 4x 150 ml 2% HCl, 600 ml vodného roztoku alkaloidů zneutralizováno 10% Na₂CO₃ a suspenze alkaloidů vytřepána 3x 300 ml Et₂O. Tento postup čištění byl opakován ještě 2x (vždy vytřepání 1/3 objemu Et₂O). Získalo se 9,0 g bezbarvého, sklovitého, světle nahnědlého produktu.

Pro získání většího množství alkaloidního diethyletherového výtřepku, bylo extrakčně zpracováno ještě 1726 g nati a kořenů *A. grandiflora* (1300 g nati a 426 g kořenů).

1,73 kg bylo extrahováno vyvařením 95% ethanolem (1:6), dvakrát po dobu 30 minut. Ethanolové extrakty byly spojeny a odpařeny. Temně zelený olejovitý odparek byl smíchán s 1 litrem vody, byla přidána 5% H₂SO₄ (pH ~ 1). Suspenze byla zfiltrována přes vrstvu křemeliny a doplněna vodou na 2 litry vodného hnědého extraktu.

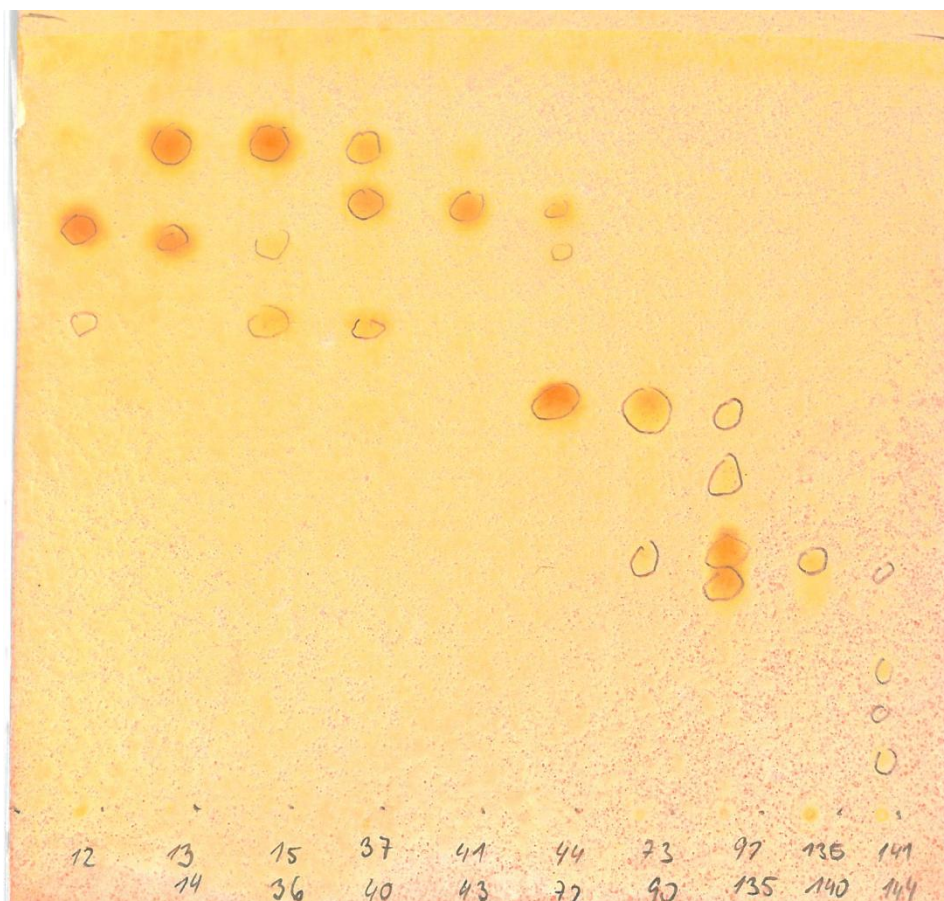
Tento extrakt byl rozdělen na dvě stejné části a každá byla zalkalizována 10% Na₂CO₃ na pH 9-10. Suspenze byla vytřepána 3x 300 ml CHCl₃. Chloroformové výtřepky byly pak spojeny. Spojený chloroformový výtřepok byl přečištěn vytřepáním s 4x 100 ml 2% H₂SO₄. Následně byla vodná fáze zalkalizována 10% Na₂CO₃ na pH 9-10 a suspenze byla vytřepána 4x 100 ml diethyletheru. Po odpaření diethyletheru bylo získáno 1,35 světle nahnědlého viskózního výtřepku, který byl přidán k předešlému etherovému výtřepku. Celkově bylo získáno 10,35 g etherového výtřepku.

4.3.4 Sloupcová chromatografie

Diethyletherový výtřepok byl dále podroben separaci na sloupcové chromatografii. Kolona o délce 63 cm a průměru 3,7 cm byla naplněna stacionární fází – oxidem hlinitým neutrálním (Al₂O₃, fa ACROSS, velikost zrn 40-200 μm) deaktivovaný 6% H₂O, stupeň deaktivace Brockmann III - v množství 670 g, což je poměr zhruba 65:1 k množství roztěru. Roztěr byl připraven rozpuštěním 10,35 g extraktu v 60 ml CHCl₃ a smíchán s 52 g Al₂O₃ (poměr 5:1). Jako mobilní fáze byla použita směs benzínu + CHCl₃ (4:1, 3:1, 7:3, 3:2, 1:1, 1:3), dále CHCl₃ a následně EtOH + CHCl₃ (1:1). Mrtvý objem kolony byl 510 ml. Eluát byl odebírán po 250 ml. Rychlost průtoku 500 ml/hod. Celkem bylo odebráno 144 frakcí, přičemž každá byla analyzována pomocí TLC. Frakce se shodnými TLC byly spojeny do celkem 9 frakcí. Byly použity tyto mobilní fáze: C₆H₁₂ + C₆H₅CH₃ + Et₂NH (8:1:1, 7:2:1, 6:3:1, 45:45:10), C₆H₅CH₃ + Et₂NH (9:1).

Tab. 4 Výsledky sloupcové chromatografie

Spojené frakce	Číslo frakce	Eluční systém	Hmotnost	
1-11	1-11	Benzín + CHCl ₃ (4:1)	0	
12	12		0,220 g	
13-14	13-14		0,650 g	
15-36	15-36		1,680 g	
37-40	37-38		Benzín + CHCl ₃ (3:1)	0,230 g
	39-40			
41-43	41-43	Benzín + CHCl ₃ (7:3)	0,066 g	
44-90	44-63		Benzín + CHCl ₃ (3:2)	3,237 g
	64-72			
	73-74			
	75-84			
91-135	85-90	Benzín + CHCl ₃ (1:1)	0,762 g	
	92-105	Benzín + CHCl ₃ (1:3)		
	106-122			
	123-133	CHCl ₃		
134-135	134-135	EtOH + CHCl ₃ (1:1)	0,311 g	
				136-140
141-144	141-144		0,353 g	



Obr. 10 Kontrolní TLC spojených frakcí z alkaloidního výtřepku (Adsorbent SiO_2 , MF: To + DEA 9:1, vyvíjeno 1 \times , detekce UV + Dragendorffovo činidlo)

4.3.5 Separace a čištění alkaloidů z frakce č. 12 (18 mg)

Frakce byla rozpustná v 2% HCl (10 ml) a po alkalizaci na pH 9-10 10% Na_2CO_3 byl alkaloid vytřepán do Et_2O . Dále pomocí TLC byla zjištěna shoda s alkaloidy první zóny frakce č. 15-36. Na základě GC-MS analýzy se pravděpodobně jedná o laudanosin.

Byla provedena preparativní TLC za použití 14 desek (adsorbent SiO_2 60 F254, fa Merck, 10 \times 20 cm, dráha 18 cm, vyvíjeno 2 \times) a C_6H_{12} + Et_2NH (9:1) jako mobilní fáze. Vyškrábán byl 1 alkaloid ze zóny s R_f 0,35, který byl eluován směsí EtOH a CHCl_3 . Bylo získáno 18 mg amorfni bílé sloučeniny.

4.3.6 Separace a čištění alkaloidů z frakce č. 13-14

Tato frakce nebyla zpracovávána, neboť na základě GC-MS analýzy bylo zjištěno, že obsahuje látku MA-1 a MA-2.

4.3.7 Separace a čištění alkaloidů z frakce č. 15-36 (0,90 g, 27,6 mg)

1,68 g frakce bylo rozpuštěno v EtOH a CHCl_3 a krystalizací bylo získáno 0,90 g látky

MA-2. Podle GC-MS analýzy se jedná pravděpodobně o protopin. Po odebrání krystalů látky MA-2 byla provedena TLC 0,720 g zbytku frakce (Adsorbent SiO₂, MF: C₆H₁₂ + C₆H₅CH₃ + Et₂NH 45:45:10, vyvíjeno 2x, detekce UV 254 nm + Deagendorffovo činidlo). Alkaloidy byly izolovány preparativní TLC za použití 40 desek (adsorbent SiO₂ 60 F254, fa Merck, 10 × 20 cm, dráha 18 cm, vyvíjeno 2×) a C₆H₁₂ + C₆H₅CH₃ + Et₂NH (45:45:10) jako mobilní fáze. Byly získány 2 zóny (R_f – 0,5; 0,37).

Zóny s látkami byly mechanicky separovány a eluovány směsí EtOH + CHCl₃. Po odpaření jednotlivé zóny vážily: 1. zóna 0,02 g, 2. zóna 0,09 g.

První zóna obsahovala podle GC-MS analýzy laudanosin. Alkaloid z druhé zóny byl přečištěn krystalizací z 25% vodného EtOH. Bylo získáno 27,6 mg krystalické bílé sloučeniny MA-3. Podle GC-MS analýzy se jedná pravděpodobně o argemonin.

4.3.8 Separace a čištění alkaloidů z frakce č. 37-40

Tato spojená frakce nebyla zpracovávána, neboť podle TLC a GC-MS analýzy obsahuje stejné látky jako spojená frakce č. 15-36 (protopin, argemonin) a frakce č. 41-43 (allokryptopin).

4.3.9 Separace a čištění alkaloidů z frakce č. 44-90 (0,506 g)

Frakce byla rozpuštěna v 20 ml 2% HCl. Rozpuštěná sloučenina byla vytřepána 3x 20 ml Et₂O. Vodná fáze byla zalkalizována 10% Na₂CO₃ na pH 9-10. Tato vodná fáze byla vytřepána 4x 30 ml Et₂O. Dle zkoušky s Meyerovým činidlem bylo zjištěno, že ve vodné fázi jsou stále přítomny alkaloidy. Proto byla vodná fáze vytřepána 2x 30 ml CHCl₃. Chloroformový a diethyletherový výtřepok byl spojen. Krystalizací z Et₂O byla získána bílá práškovitá sloučenina MA-4 (0,506 g).

4.4 Stanovení inhibičních aktivit alkaloidů a alkaloidních extraktů

4.4.1 Chemikálie

- acetylthiocholin jodid (Sigma-Aldrich) (použit 10mM roztok)
- butyrylthiocholin jodid (Sigma-Aldrich) (použit 10mM roztok)
- 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina ≥ 98% (Sigma-Aldrich) (použit 5mM roztok)
- 0,1 M fosfátový pufr, pH 7,4 (o složení: dihydrát dihydrogenfosforečnanu sodného (Lachema); dodekahydrát hydrogenfosforečnanu disodného (Lachema)

- galanthamin hydrobromid 95% (Changsha Organic Herb Inc., China)
- huperzin A 95% (TAZHONGHUI – Tai'an Zhonghui Plant Biochemical Co., Ltd., China)
- dimethylsulfoxid p.a. (Sigma-Aldrich) (DMSO)
- Z-Gly-Pro-*p*-nitroanilide (Sigma-Aldrich)
- prolyloligopeptidasa (Sigma-Aldrich)
- 0,01 M fosfátový pufr, pH 7,4 (složení: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl)
- bajkalin (Sigma-Aldrich)
- Z-Pro-prolinal
- 1,4-dioxan (Lachema)
- *p*-nitroaniline (Lachema)

4.4.2 Materiál

- zdroj AChE – hemolyzát lidských erytrocytů
- zdroj BuChE – lidská plazma

4.4.3 Přístroje

- Reader SynergyTM HT Multi-Detection Microplate Reader (BioTek, USA)
- ELISA reader EL800 (Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA)

4.4.4 Podmínky měření

- teplota 37 °C
- prostředí fosfátového pufru (pH 7,4)
- detekce pro spektrofotometrické stanovení vznikajících barevných produktů u cholinesterasové aktivity: 436 nm, pro stanovení inhibice POP: 405 nm
- mikrotitrační destičky

4.4.5 Získání erytrocytární AChE a BuChE z plazmy

Erytrocyty se získaly z čerstvě odebrané citrátované krve zdravých dobrovolníků (18 ml krve + 2 ml 3,4% roztoku citrátu). Krev byla ihned po odběru centrifugována rychlostí 4000 rpm při 4 °C po dobu 10 minut. Plazma se odebrala a zbytek se odsál bezpopelovým filtračním papírem s hlazeným povrchem. Odečetl se objem erytrocytární masy a zředil se takovým množstvím 5 mM fosfátového pufru pH 7,4, aby bylo 8 zkumavek a objem v každé z nich byl 10-12 ml. Znovu se provedla centrifugace. Promytí se provedlo 3× a poté se přidalo

takové množství 5 mM fosfátového pufru pH 7,4, aby byl objemový poměr erythrocyty:pufr 1 + 9. Směs se opět homogenizovala, přelila do Erlenmayerovy baňky a erythrocyty se ponechaly spontánně hemolyzovat za míchání teflonovým míchadlem při 300 rpm. Ihned se stanovila aktivita suspenze a hemolyzát se uchovával do doby použití při -22 °C.

4.4.6 Stanovení cholinesterasové inhibiční aktivity

Stanovení se provádělo Ellmanovou spektrofotometrickou metodou za použití 5,5-dithiobis-2-nitrobenzoové kyseliny (DTNB). Inhibiční aktivita (hodnoty IC₅₀) byla vypočítána z naměřených hodnot nelineární regrese v programu GraphPad Prism (verze 5.02 pro Windows, Graph Pad Software, San Diego, California, USA). Byla stanovena hodnota IC₅₀. Pro extrakty byla vyjádřena v µg/ml a pro čisté látky v µM.

Při měření aktivity enzymů se postupuje tak, že se do jamek mikrotitračních destiček napipetuje 8,3 µl plazmy nebo hemolyzátu, přidá se 283 µl 5 mM DTNB, 8,3 µl DMSO. Směs se inkubuje v komoře readeru při 37 °C po dobu 5 minut, potom se přidá 33,3 µl roztoku substrátu (10 mM acetylthiocholinjodidu nebo 10mM butyrylthiocholinjodidu) a zjistí se při příslušné vlnové délce absorbance (AChE-hemolyzát: 436 nm; BuChE-plazma: 412 nm).

Při stanovení aktivity látek je postup stejný, použijí se však koncentrace látky 40, 10, 4, 1, 0,4 mM. Při stanovení aktivity extraktů je postup také identický, koncentrace jsou ale 20, 2, 0,2, 0,02, 0,002 mg/ml.

Inhibice v % byla vypočítána podle vzorce:

$$I = 100 - (\Delta ABL / \Delta ASA) \times 100,$$

kde ΔABL je nárůst absorbance slepého vzorku za 1 minutu a ΔASA je nárůst absorbance měřeného vzorku.

Byla stanovena hodnota IC₅₀ v µg/ml a srovnána s referenčními látkami galanthaminem, hupA a fysostigminem.

4.4.7 Stanovení prolyloligopeptidasové inhibiční aktivity

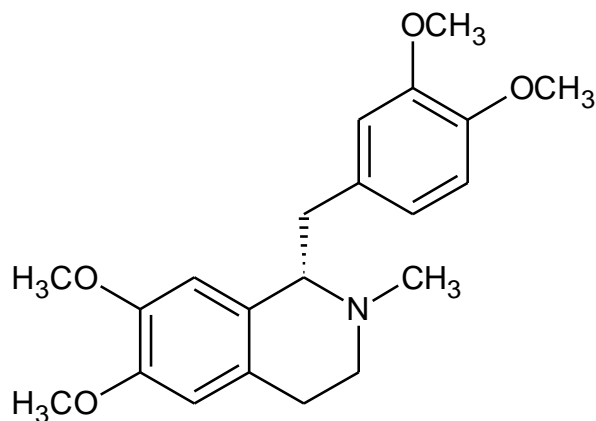
POP byla rozpuštěna v 0,01 M fosfátovém pufru (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl), její specifická aktivita byla 0,2 U/ml. Zásobní roztoky se připravily rozpuštěním v DMSO (10mM). Jednotlivá ředění se získala zředěním zásobních roztoků deionizovanou vodou. Kontrolní vzorek obsahoval stejnou koncentraci DMSO. Substrátem POP je Z-gly-pro-p-nitroanilid, který byl rozpuštěn ve 40% 1,4-dioxanu (10mM). Zkušební roztoky byly získány smísením 170 µl pufru, 5 µl testované látky a 5 µl roztoku POP. Po dobu 5 minut při 37 °C byla směs inkubována a poté se přidalo 20 µl substrátu a směs byla inkubována po dobu

dalších 30 minut při 37 °C. Přítomný barevný *p*-nitroanilid byl spektrofotometricky proměřem při vlnové délce 405 nm. Výsledky byly zpracovány v programech Microsoft Excel a GraphPad Prism.

5 Výsledky

5.1 Strukturní analýza

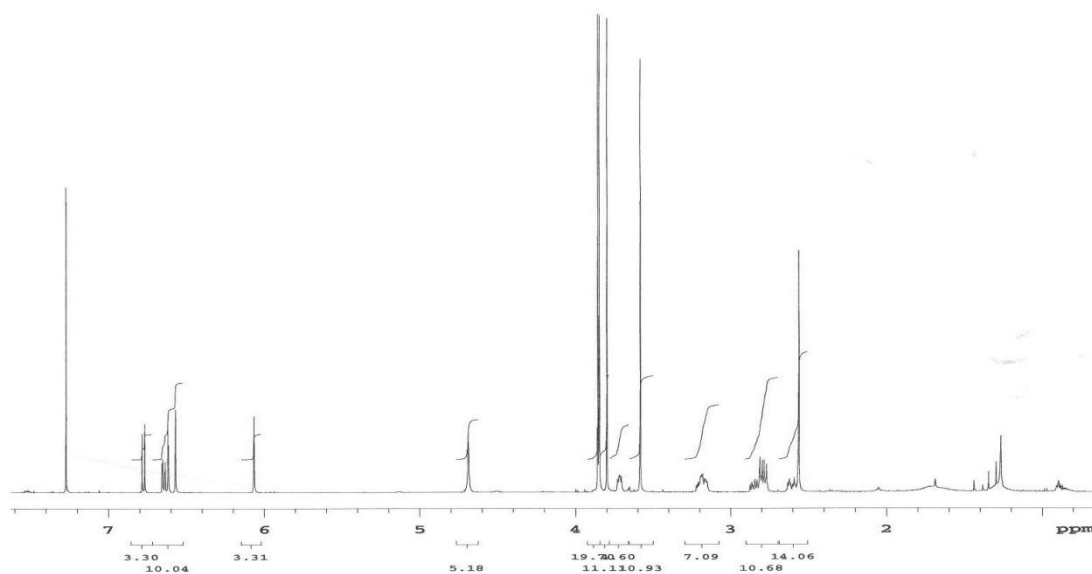
5.1.1 (+)-Laudanosin (MA-1)



Obr. 11 Struktura (+)-laudanosinu

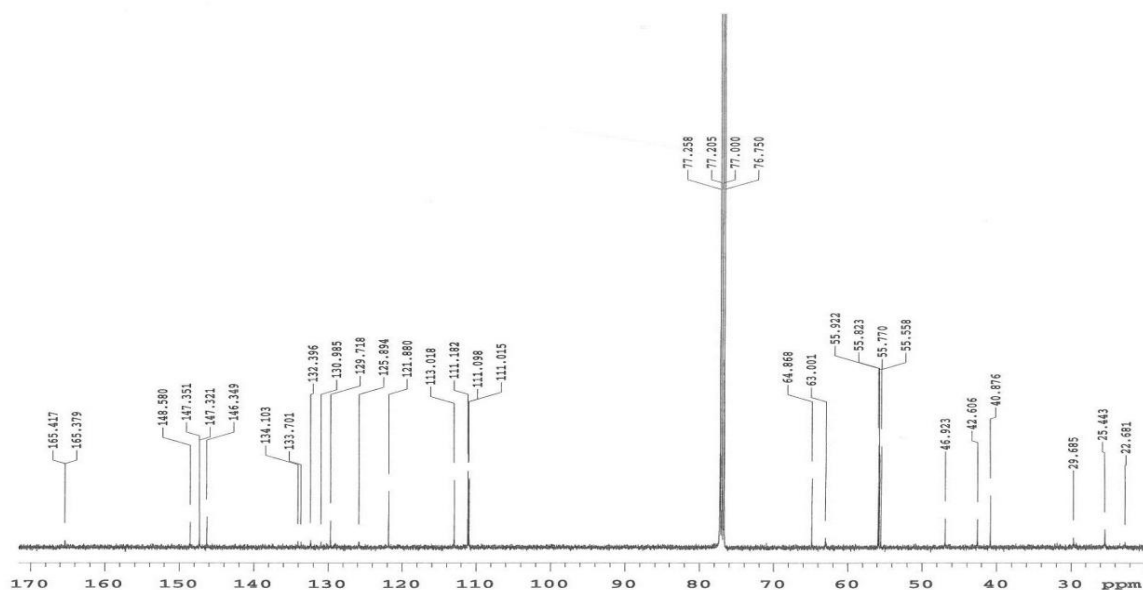
5.1.1.1 NMR analýza

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 6.78 (1H, d, $J=8.1$ Hz, H5'), 6.65 (1H, dd, $J=8.1$ Hz, $J=2.1$ Hz, H6'), 6.62 (1H, d, $J=2.1$ Hz, H2'), 6.57 (1H, s, H5), 6.07 (1H, s, H8), 3.86 (3H, s, OCH_3), 3.85 (3H, s, OCH_3), 3.80 (3H, s, OCH_3), 3.74-3.69 (1H, m, H1), 3.59 (3H, s, OCH_3), 3.23-3.13 (2H, m, H3, H1'), 2.89-2.75 (3H, m, H3, H4, H1'), 2.65-2.57 (1H, m, H4), 2.56 (3H, s, NCH_3)



Obr. 12 ^1H NMR spektrum (+)-laudanosinu

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ 148.6, 147.4, 147.3, 146.3, 132.4, 129.7, 125.9, 121.9, 113.0, 111.2, 111.1, 111.0, 64.9, 55.9, 55.8, 55.8, 55.6, 46.9, 42.6, 40.9, 25.4

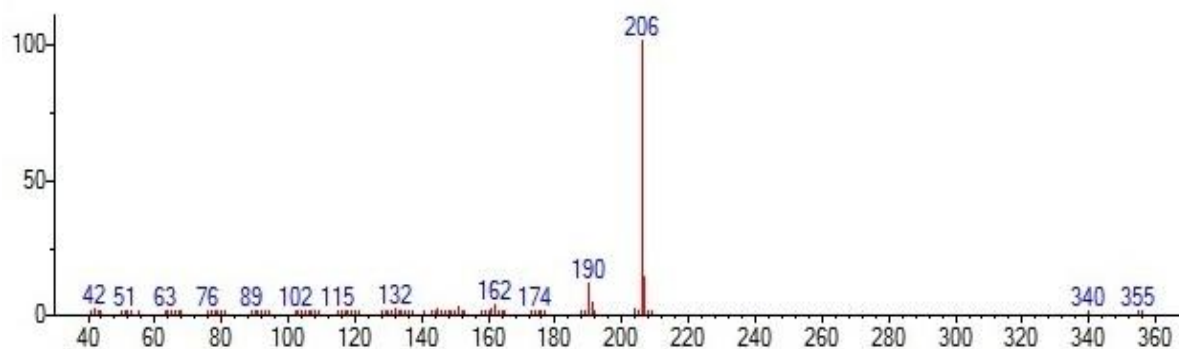


Obr. 13 ^{13}C NMR spektrum (+)-laudanosinu

5.1.1.2 MS analýza

EI-MS (m/z) 357(<1), 206(100), 190(12)

ESI-MS m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ 358(100), 218(10), 206(6)



Obr. 14 EI-MS spektrum (+)-laudanosinu

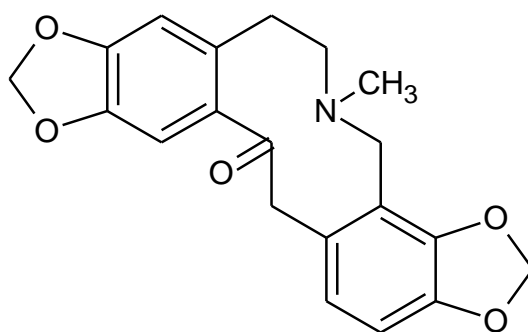
5.1.1.3 Optická otáčivost

$[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +34^\circ$ (c 1,96; CHCl_3)

5.1.1.4 Teplota tání

Byla získána amorfni bílá sloučenina, teplota tání nebyla stanovena.

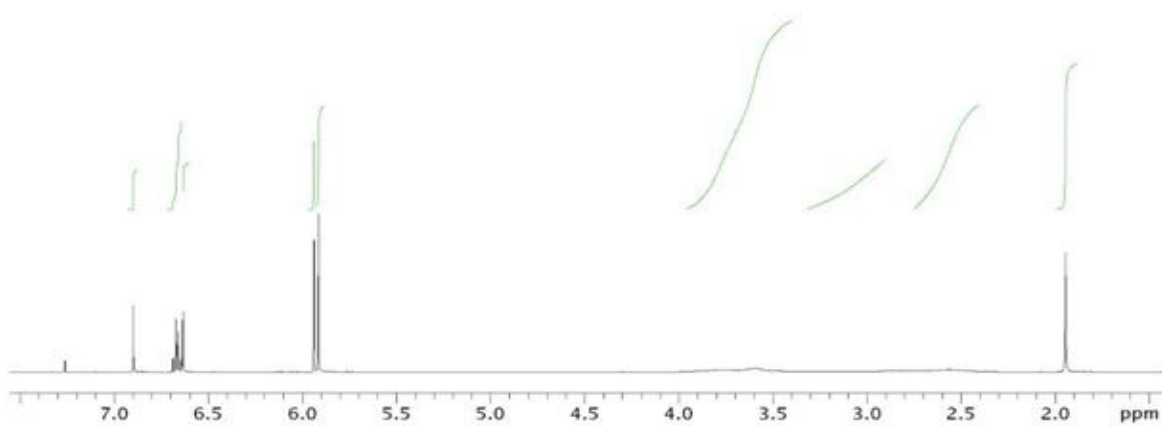
5.1.2 Protopin (MA-2)



Obr. 15 Struktura protopinu

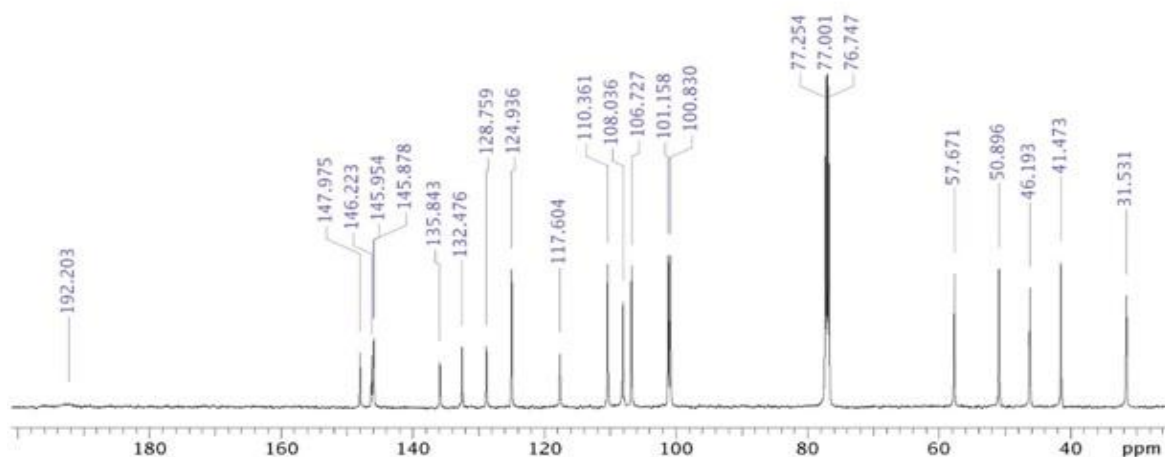
5.1.2.1 NMR analýza

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): 6.90 (1H, s, H1), 6.68 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H11), 6.65 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H12), 6.63 (1H, s, H4), 5.94 (2H, s, H15), 5.91 (2H, s, H16), 3.96-3.69 (2H, m, H13), 3.69-3.45 (2H, m, H8), 3.23-2.84 (1H, m, H5), 2.76-2.40 (3H, m, H5, H6, H6), 1.95 (3H, s, N- CH_3)



Obr. 16 ^1H NMR spektrum protopinu

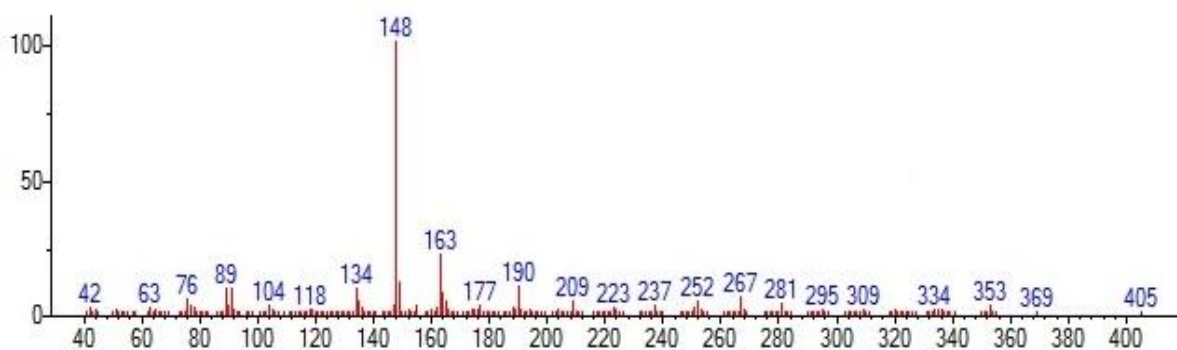
^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3): 192.4 (C14), 148.0 (C3), 146.2 (C9), 146.0 (C10), 145.9 (C2), 135.8 (C14a), 132.5 (C4a), 128.8 (C12a), 124.9 (C12), 117.6 (C8a), 110.4 (C4), 108.0 (C1), 106.7 (C11), 101.2 (C15), 100.8 (C16), 57.7 (C6), 50.9 (C8), 46.2 (C13), 41.5 (N - CH_3), 31.5 (C5)



Obr. 17 ^{13}C NMR spektrum protopinu

5.1.2.2 MS analýza

EI-MS (m/z): 353 (5), 190 (10), 163 (25), 148 (100)



Obr. 18 EI-MS spektrum protopinu

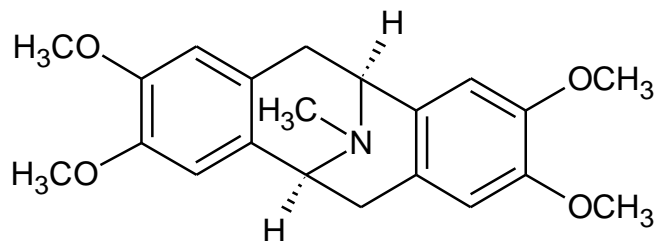
5.1.2.3 Optická otáčivost

Protopin je opticky neaktivní sloučenina – neměřeno.

5.1.2.4 Teplota tání

Bílá krystalická látka bez zápachu, teplota tání 205-206 °C.

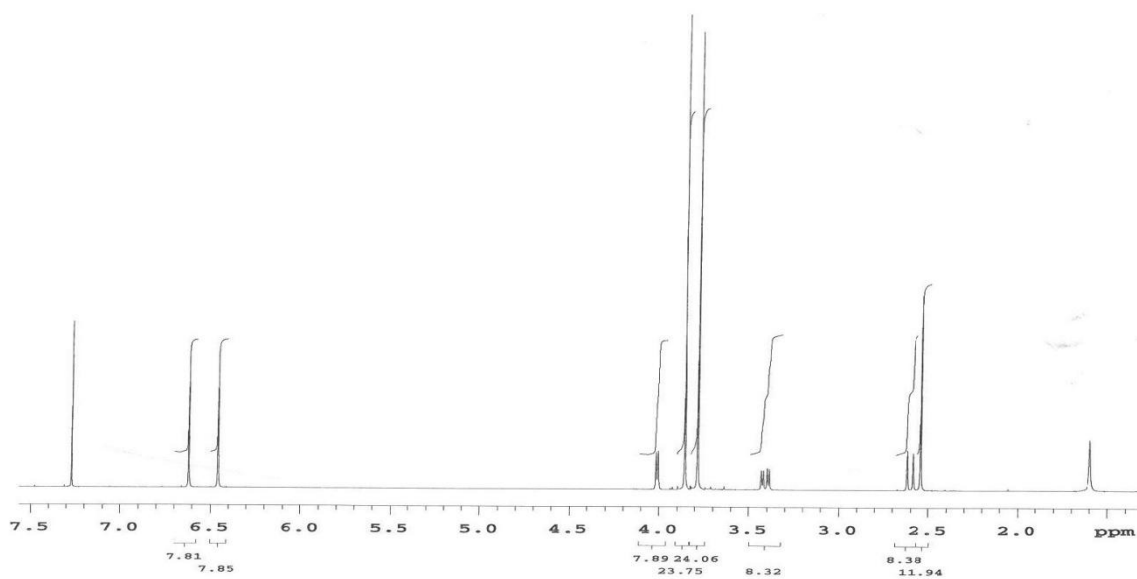
5.1.3 (-)-Argemonin (MA-3)



Obr. 19 Struktura (-)-argemoninu

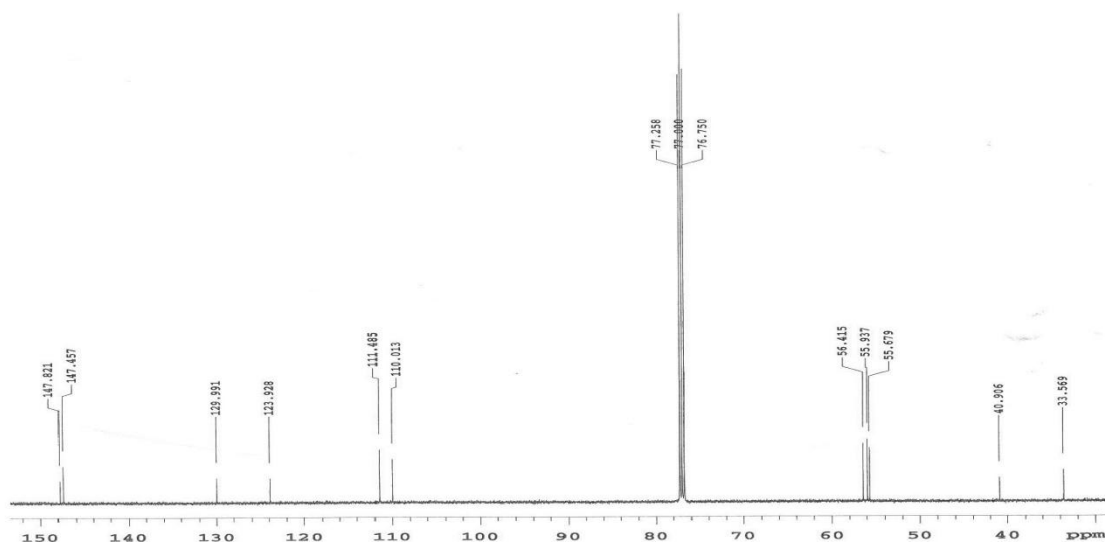
5.1.3.1 NMR analýza

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 6.62 (2H, s, H4, H10), 6.46 (2H, s, H1, H7), 4.01 (2H, d, $J=5.9$ Hz, H5, H11), 3.86 (6H, s, OCH_3), 3.79 (6H, s, OCH_3), 3.41 (2H, dd, $J=16.1$ Hz, $J=5.9$ Hz, H6, H12), 2.60 (2H, d, $J=16.1$ Hz, H6, H12), 2.54 (3H, s, NCH_3)



Obr. 20 ^1H NMR spektrum (-)-argemoninu

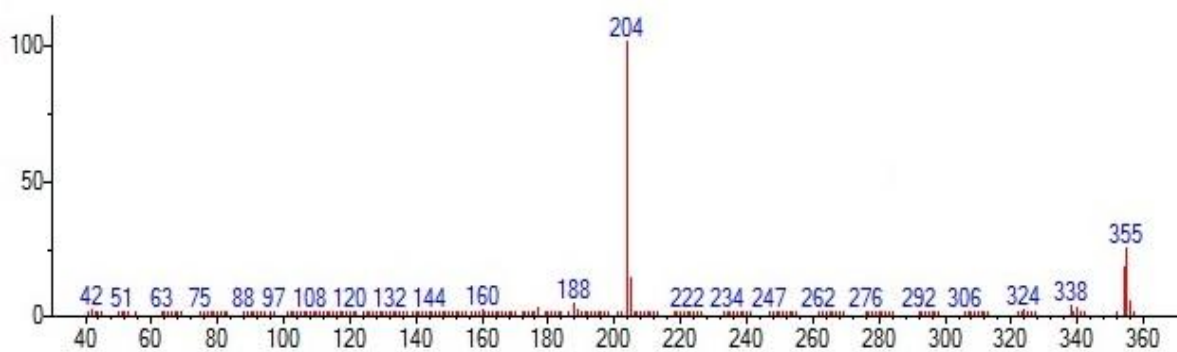
^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ 147.8, 147.5, 130.0, 123.9, 111.5, 110.0, 56.4, 55.9, 55.7, 40.9, 33.6



Obr. 21 ^{13}C NMR spektrum (-)-argemoninu

5.1.3.2 MS analýza

EI-MS (m/z): 355 (30), 354 (20), 204 (100)



Obr. 22 EI-MS spektrum (-)-argemoninu

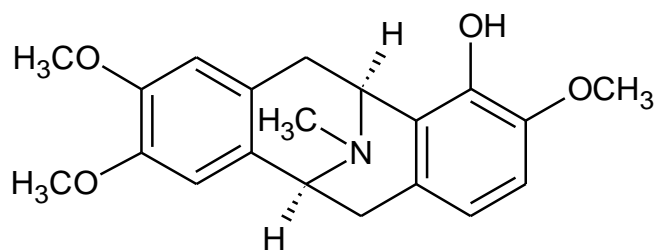
5.1.3.3 Optická otáčivost

$[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -202^\circ$ (c 0,51; CHCl_3)

5.1.3.4 Teplota tání

Bílá krystalická látka bez zápachu, teplota tání 152-153 °C.

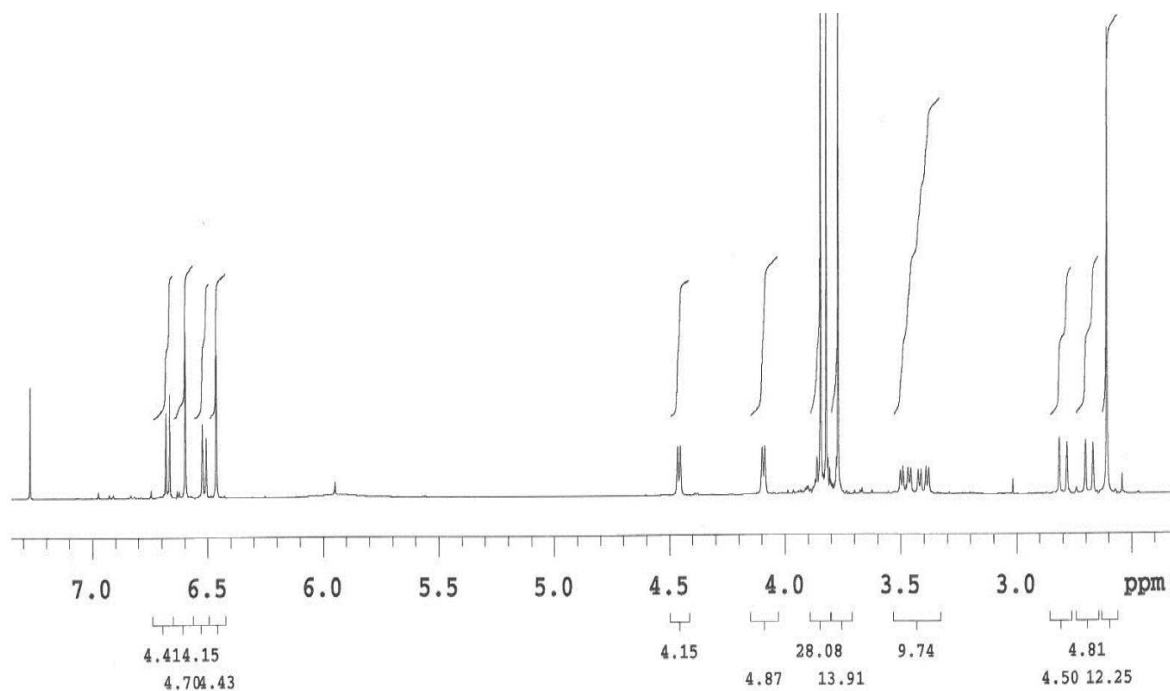
5.1.4 (-)-Platycerin (MA-4)



Obr. 23 Struktura (-)-platycerinu

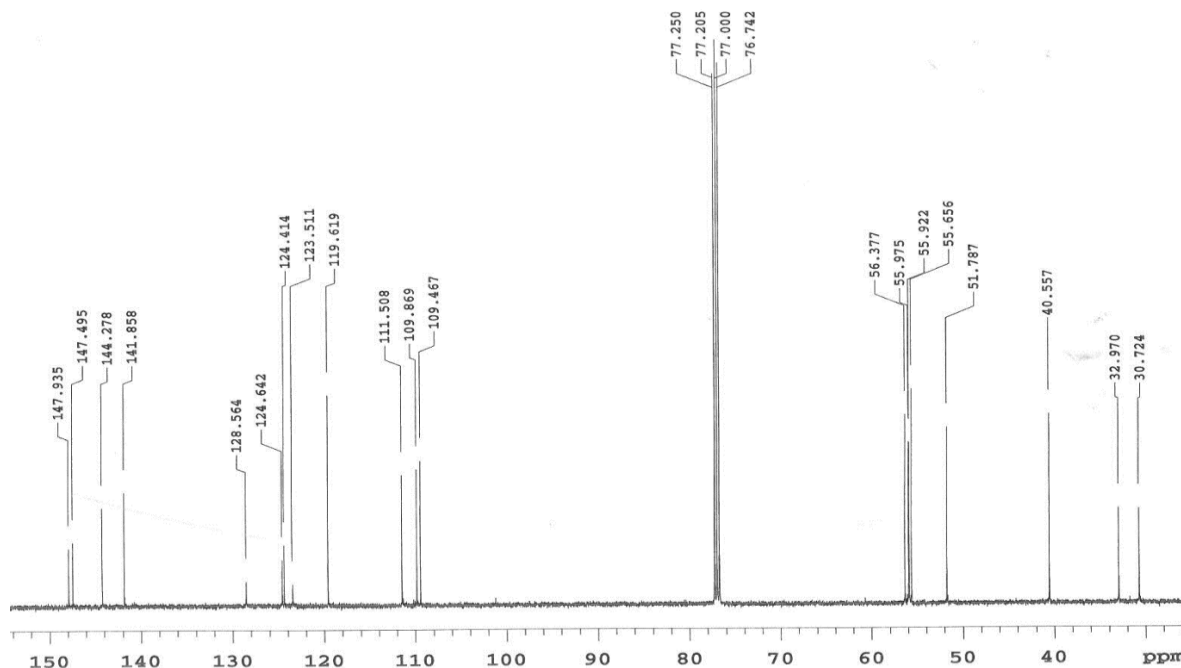
5.1.4.1 NMR analýza

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 6.67 (1H, d, *J*=8.3 Hz, H2), 6.60 (1H, s, H10), 6.52 (1H, d, *J*=8.3 Hz, H1), 6.46 (1H, s, H7), 5.97 (1H, bs, OH), 4.46 (1H, d, *J*=5.7 Hz, H5), 4.09 (1H, d, *J*=5.7 Hz, H11), 3.85 (3H, s, OCH₃), 3.82 (3H, s, OCH₃), 3.77 (3H, s, OCH₃), 3.48 (1H, dd, *J*=16.5 Hz, *J*=5.7 Hz, H12), 3.40 (1H, dd, *J*=16.5 Hz, *J*=5.7 Hz, H6), 2.80 (1H, d, *J*=16.5 Hz, H6), 2.69 (1H, d, *J*=16.5 Hz, H12), 2.61 (3H, s, NCH₃)



Obr. 24 ¹H NMR spektrum (-)-platycerinu

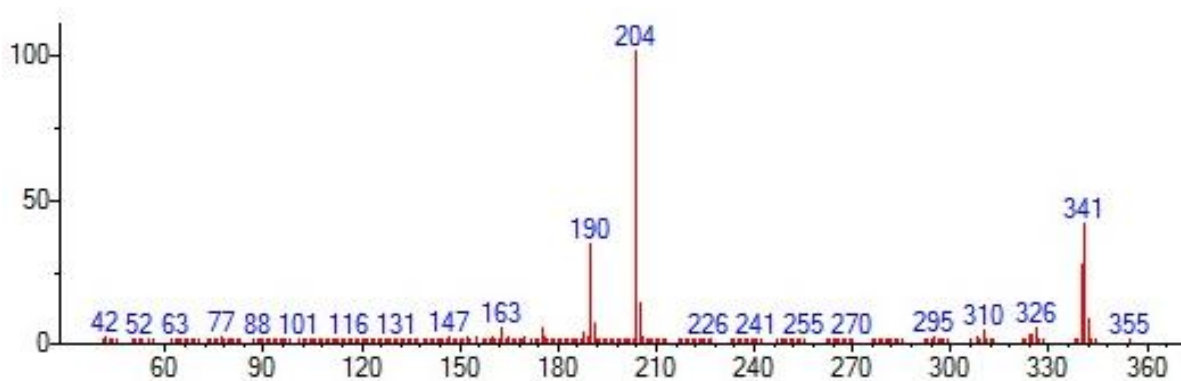
^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ 147.9, 147.5, 144.3, 141.9, 128.6, 124.6, 124.4, 123.5, 119.6, 111.5, 109.9, 109.5, 56.4, 56.0, 55.9, 55.7, 51.8, 40.6, 33.0, 30.7



Obr. 25 ^{13}C NMR spektrum (-)-platycerinu

5.1.4.2 MS analýza

EI-MS (m/z): 341(42), 340 (25), 204 (100), 190 (28)



Obr. 26 EI-MS spektrum (-)-platycerinu

5.1.4.3 Optická otáčivost

$[\alpha]_D^{25} = -264^\circ$ (c 0.428; CHCl_3)

5.1.4.4 Teplota tání

Bílá krystalická látka bez zápachu, teplota tání 130-131 $^\circ\text{C}$.

5.2 Inhibiční aktivity izolovaných alkaloidů

Tab. 5 Výsledky inhibičních aktivit izolovaných alkaloidů

Izolovaný alkaloid	IC ₅₀ (μM)		
	AChE	BuChE	POP
laudanisin	617,00 ± 46,55	644,77 ± 55,52	probíhá měření
protopin	229,98 ± 21,02	208,87 ± 17,67	> 1000
platycerin	223,65 ± 19,61	1651,25 ± 327,7	687 ± 74
argemonin	4677,75 ± 1241,08	885,45 ± 119,50	337 ± 83,1
galanthamin	1,710 ± 0,065	42,30 ± 1,30	-
huperzin A	0,033 ± 0,001	> 1000	-
fysostigmin	0,063 ± 0,001	0,130 ± 0,004	-
bajkalin	-	-	610 ± 21
Z-Pro-prolinal	-	-	3,27 ± 0,02 (nM)

6 Diskuze

V rámci screeningu provedeného na Katedře farmaceutické botaniky a ekologie bylo zjištěno, že alkaloidní extrakt z *Argemone grandiflora* Sweet vykazuje perspektivní inhibiční účinnost vůči lidským cholinesterasám. Prostřednictvím spektrofotometrické Ellmanovy metody *in vitro* byla naměřena inhibiční aktivita sumárního alkaloidního extraktu natě vůči AChE ($IC_{50} = 15,75 \pm 2,89 \mu\text{g/ml}$) a BuChE ($IC_{50} = 25,47 \pm 1,82 \mu\text{g/ml}$) a sumárního alkaloidního extraktu kořene vůči AChE ($IC_{50} = 17,60 \pm 2,83 \mu\text{g/ml}$) a BuChE ($IC_{50} = 35,69 \pm 6,57 \mu\text{g/ml}$).

Cílem této diplomové práce byla izolace obsahových látek za použití chromatografických metod z frakce 12, spojených frakcí 15-36 a frakcí 44-90. Celkem byly z těchto frakcí získány čtyři alkaloidy v čisté formě.

Na základě NMR a GC-MS analýz, měření teploty tání a optické otáčivost po porovnání s literaturou byly identifikovány látky (+)-laudanisin (MA-1), protopin (MA-2), (-)-argemonin (MA-3) a (-)-platycerin (MA-4).

U těchto alkaloidů byly určeny inhibiční aktivity prostřednictvím spektrofotometrické *in vitro* Ellmanovy metody. Tyto aktivity byly porovnány se standardy galanthaminem, HupA a fysostigminem. Galanthamin vykazuje silnou inhibiční aktivitu vůči AChE ($1,710 \pm 0,065 \mu\text{M}$), zatímco vůči BuChE je téměř neúčinný ($42,30 \pm 1,30 \mu\text{M}$). Podobně je tomu i u HupA, který inhibuje AChE ($0,033 \pm 0,001 \mu\text{M}$), ale BuChE nikoliv ($> 1000 \mu\text{M}$). Standard fysostigmin vykazuje aktivitu jak k AChE ($0,063 \pm 0,001 \mu\text{M}$), tak k BuChE ($0,130 \pm 0,004 \mu\text{M}$). Z izolovaných alkaloidů nejvyšší, přesto velmi slabou inhibiční aktivitu vůči AChE vykazoval (-)-platycerin ($223,65 \pm 19,61 \mu\text{M}$) a hned za ním protopin ($229,98 \pm 21,02 \mu\text{M}$). Jejich inhibiční aktivita vůči BuChE je rovněž slabá ($1651,25 \pm 327,7 \mu\text{M}$; $208,87 \pm 17,67 \mu\text{M}$). Zbývající alkaloidy (+)-laudanisin a (-)-argemonin vykazovaly ještě menší inhibiční aktivitu vůči AChE ($617,00 \pm 46,55 \mu\text{M}$; $4677,75 \pm 1241,08 \mu\text{M}$) a BuChE ($644,77 \pm 55,52 \mu\text{M}$; $885,45 \pm 119,50 \mu\text{M}$).

Látky byly dále testovány na inhibici POP. Pouze (-)-argemonin ($337 \pm 83,1 \mu\text{M}$) vykazoval vyšší inhibiční aktivitu vůči standardu bajkalinu. Hodnota u protopinu byla větší než $1000 \mu\text{M}$, takže tato látka je považována za neaktivní. Biologická aktivita (-)-platycerinu vůči POP je rovněž velmi slabá ($687 \pm 74 \mu\text{M}$). Inhibiční hodnoty POP (+)-laudanisinu nejsou doposud známy, protože stále probíhá měření.

Ve zkratce můžeme konstatovat, že žádná z izolovaných látek nevykazuje výhodnější inhibiční vlastnosti vůči cholinesterasám. Pouze (-)-argemonin vykazoval vyšší inhibiční

aktivitu vůči POP než použitý standard bajkalin.

Je tedy zřejmé, že tyto alkaloidy nejsou příčinou inhibiční aktivity sumárního alkaloidního extraktu. V rámci dalších testů *in vitro* bude pokračovat zkoumání jejich biologické aktivity.

7 Abstrakt

Adamcová, M.: Studium biologické aktivity alkaloidů izolovaných z *Argemone grandiflora* (Papaveraceae) I. Diplomová práce, Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra farmaceutické botaniky a ekologie, Hradec Králové 2015.

Cílem této práce byla izolace obsahových látek ze sumárního diethyletherového alkaloidního extraktu z *Argemone grandiflora* Sweet, jejich identifikace a určení inhibiční aktivity vůči lidské acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase a prolyloligopeptidase. S využitím chromatografických metod byly získány 4 alkaloidy, které byly identifikovány jako (+)-laudanisin, protopin, (-)-argemonin a (-)-platycerin.

Tyto látky byly testovány na jejich inhibiční aktivitu IC_{50} : (+)-laudanisin ($IC_{50\text{ AChE}} = 617,00 \pm 46,55 \mu\text{M}$, $IC_{50\text{ BuChE}} = 644,77 \pm 55,52 \mu\text{M}$, $IC_{50\text{ POP}} = \text{dosud nezměřeno}$); protopin ($IC_{50\text{ AChE}} = 229,98 \pm 21,02 \mu\text{M}$, $IC_{50\text{ BuChE}} = 208,87 \pm 17,67 \mu\text{M}$, $IC_{50\text{ POP}} > 1000 \mu\text{M}$); (-)-argemonin ($IC_{50\text{ AChE}} = 4677,75 \pm 1241,08 \mu\text{M}$, $IC_{50\text{ BuChE}} = 885,45 \pm 119,50 \mu\text{M}$, $IC_{50\text{ POP}} = 337 \pm 83,1 \mu\text{M}$); (-)-platycerin ($IC_{50\text{ AChE}} = 223,65 \pm 19,61 \mu\text{M}$, $IC_{50\text{ BuChE}} = 1651,25 \pm 327,7 \mu\text{M}$, $IC_{50\text{ POP}} = 687 \pm 74 \mu\text{M}$). V porovnání se standardy galanthaminem ($IC_{50\text{ AChE}} = 1,710 \pm 0,065 \mu\text{M}$, $IC_{50\text{ BuChE}} = 42,30 \pm 1,30 \mu\text{M}$) a huperzinem A ($IC_{50\text{ AChE}} = 0,033 \pm 0,001 \mu\text{M}$, $IC_{50\text{ BuChE}} > 1000 \mu\text{M}$) nevykazovaly látky vyšší inhibiční aktivity vůči AChE a BuChE. Pouze (-)-argemonin vykazoval vyšší inhibiční účinek vůči POP než použitý standard bajkalin.

Klíčová slova: *Argemone grandiflora*, Papaveraceae, isochinolinové alkaloidy, izolace, biologická aktivita in vitro, acetylcholinesterasa, butyrylcholinesterasa, prolyloligopeptidasa, Alzheimerova choroba

8 Abstract

Adamcová, M.: Study of biological activity of alkaloids isolated from *Argemone grandiflora* (Papaveraceae) I. Diploma thesis, Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Department of Pharmaceutical Botany and Ecology, Hradec Králové 2015.

The aim of this study was isolation of substances from total diethyl ether alkaloid extract of *Argemone grandiflora* Sweet, their identification and assessment of their inhibition activity towards acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase and prolyl oligopeptidase. Using common chromatographic methods, four alkaloids were isolated, that was identified as (+)-laudanosine, protopine, (–)-argemonine a (–)-platynerine.

These substances was tested for their inhibition activity IC_{50} : (+)-laudanosine ($IC_{50\text{ AChE}} = 617,00 \pm 46,55 \mu\text{M}$, $IC_{50\text{ BuChE}} = 644,77 \pm 55,52 \mu\text{M}$, $IC_{50\text{ POP}} = \text{not measured yet}$); protopine ($IC_{50\text{ AChE}} = 229,98 \pm 21,02 \mu\text{M}$, $IC_{50\text{ BuChE}} = 208,87 \pm 17,67 \mu\text{M}$, $IC_{50\text{ POP}} > 1000 \mu\text{M}$); (–)-argemonine ($IC_{50\text{ AChE}} = 4677,75 \pm 1241,08 \mu\text{M}$, $IC_{50\text{ BuChE}} = 885,45 \pm 119,50 \mu\text{M}$, $IC_{50\text{ POP}} = 337 \pm 83,1 \mu\text{M}$); (–)-platynerine ($IC_{50\text{ AChE}} = 223,65 \pm 19,61 \mu\text{M}$, $IC_{50\text{ BuChE}} = 1651,25 \pm 327,7 \mu\text{M}$, $IC_{50\text{ POP}} = 687 \pm 74 \mu\text{M}$). In comparison with the standards galanthamine ($IC_{50\text{ AChE}} = 1,710 \pm 0,065 \mu\text{M}$, $IC_{50\text{ BuChE}} = 42,30 \pm 1,30 \mu\text{M}$) and huperzine A ($IC_{50\text{ AChE}} = 0,033 \pm 0,001 \mu\text{M}$, $IC_{50\text{ BuChE}} > 1000 \mu\text{M}$), none of the substances showed better inhibition activity towards AChE and BuChE. Only (–)-argemonine showed better inhibition activity towards POP, then baikaline, used as a standard.

Key words: *Argemone grandiflora*, Papaveraceae, isoquinoline alkaloids, isolation, in vitro biological activity, acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase, prolyl oligopeptidase, Alzheimer's disease

9 Použitá literatura

- ¹ Lužný, J.: *Gerontopsychiatrie*. Triton, Praha 2012.
- ² Hartl, J., Palát, K.: *Farmaceutická chemie I*. 2.vyd. Karolinum, Praha 2007.
- ³ Suchánková, P.: *Rigorózní práce*. Univerzita Karlova, Hradec Králové 2012.
- ⁴ Koukolík, F., Jiráček R.: *Alzheimerova nemoc a další demence*. Grada, Praha 1998.
- ⁵ Jiráček, R. et al.: *Gerontopsychiatrie*. Galén, Praha 2013
- ⁶ Jiráček, R., Holmerová, I., Borzová, C. a kol.: *Demence a jiné poruchy paměti*. Grada, Praha 2009
- ⁷ Hořejší, J.: *Symposium nakladatelství Galén. Praha, Akademický klub 1. LF UK, Faustův dům, 2. března 1999, Alzheimerova choroba* (Houdek L., ed.), str. 15, Galén, Praha 1999.
- ⁸ Waldemar, G., Dubois, B., Emre, M., Georges, J., McKeith, I. G., Rossor, M., Scheltens, P., Tariska, P., Winblad, B.: Recommendations for the diagnosis and management of Alzheimer's disease and other disorders associated with dementia: EFNS guideline. *Eur. J. Neurol.* 2007, *14*, e1-e26.
- ⁹ Pidrman, V.: *Demence*. Grada, Praha 2007.
- ¹⁰ Rogeberg, M., Furlund, C. B., Moe, M. K., Fladby, T.: Identification of peptide products from enzymatic degradation of amyloid beta. *Biochimie* 2014, *105*, 216-220.
- ¹¹ Schmitz, A., Tikkanen, R., Kirfel, G., Herzog, V.: The biological role of the Alzheimer amyloid precursor protein in epithelial cells. *Histochem. Cell Biol.* 2002, *117*, 171-180.

-
- ¹² Xu, Y., Wang, D., Luo, Y., Li, W., Shan, Y., Tan, X., Zhu, C.: Beta amyloid-induced upregulation of death receptor 6 accelerates the toxic effect of N-terminal fragment of amyloid precursor protein. *Neurobiol. Aging* 2015, 36, 157-168.
- ¹³ Fodero-Tavolletti, M., T., Villemagne, V. L., Rowe, Ch. C., Masters L. C., Barnham, K. J., Cappai, R.: Amyloid- β : The seeds of darkness. *Int. J. Biochem.*, 2011, 43, 1247-1251
- ¹⁴ Koukolík, F., Jiráček, R.: *Diagnostika a léčení syndromu demence*. Grada, Praha 1999.
- ¹⁵ Hare, J.: Trafficking of amyloid b-precursor protein products C83 and C99 on the endocytic pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2010, 401, 219-224.
- ¹⁶ Cheng, Y., Choi, I., Sobey, Ch. G., Arumugam T. V., Jo, D.: Emerging roles of the γ -secretase-notch axis in inflammation. *Pharmacol. Ther.* 2015, 147, 80-90.
- ¹⁷ Xia, W.: Role of presenilin in γ -secretase cleavage of amyloid precursor protein. *Exp. Gerontol.* 2000, 35, 453-460.
- ¹⁸ Martin, L., Latypova, X., Terro, F.: Post-translational modifications of tau protein: Implications for Alzheimer's disease. *Neurochem. Int.* 2011, 58, 458-471.
- ¹⁹ Martin, L., Latypova, X., Wilson, C. M., Magnaudeix, A., Perrin, M., Yardin, C., Terro, F.: Tau protein kinases: Involvement in Alzheimer's disease. *Ageing Res. Rev.*, 2013, 12, 289-309.
- ²⁰ Schönheit, B., Zarski, R., Ohm, T. G.: Spatial and temporal relationships between plaques and tangles in Alzheimer-pathology. *Neurobiol. Aging* 2004, 25, 697-711.
- ²¹ Huang, Y., Mahley, R. W.: Apolipoprotein E: Structure and function in lipid metabolism, neurobiology, and Alzheimer's diseases. *Neurobiol. Dis.* 2014, 72, 3-12.
- ²² Wang, X., Wang, W., Li, L., Perry, G., Lee, H., Zhu, X.: Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease. *Biochim. Biophys. Acta* 2014, 1842, 1240-1247.

-
- ²³ Niewiadomska, G., Mietelska-Porowska, A., Mazurkiewicz, M.: The cholinergic system, nerve growth factor and the cytoskeleton. *Behav. Brain Res.* 2011, 221, 515-526.
- ²⁴ Allen, S. J., Watson, J. J., Shoemark, D. K., Barua N. U., Patel N. K.: GDNF, NGF and BDNF as therapeutic options for neurodegeneration. *Pharmacol. Ther.* 2013, 138, 155-175.
- ²⁵ Benveniste E. N., Nnguyen N. T., O'Keefe, G. M.: Immunological aspects of microglia: relevance to Alzheimer's disease. *Neurochem. Int.* 2001, 39, 381-391.
- ²⁶ Kamer A. R., Craig, R. G., Dasanayake A. P., Brys, M., Glodzik-Sobanska, L., Leon, M. J.: Inflammation and Alzheimer's disease: Possible role of periodontal diseases. *Alzheimer's Dementia* 2008, 4, 242-250.
- ²⁷ Jirák, R.: Farmakoterapie Alzheimerovy choroby. *Prakt. lékařem.* 2012, 8(3), 107-108.
- ²⁸ Lincová, D., Farghali, H. et al.: *Základní a aplikovaná farmakologie 2. vyd.* Galén, Praha 2007
- ²⁹ Talesa, V. N.: Acetylcholinesterase in Alzheimer's disease. *Mech. Ageing Dev.* 2001, 122, 1961-1969
- ³⁰ Ma, X., Tan, Ch., Zhu, D., Gang, D. R., Xiao, P.: Huperzine A from *Huperzia* species—An ethnopharmacological review. *J. Ethnopharmacol.* 2007, 113, 15-34.
- ³¹ Birks, J., Harvey, R. J.: Donepezil for dementia due to Alzheimer's disease. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2006, 25(1), CD001190.
- ³² Black, S. E., Doody, R., Li, H., McRae, T., Jambor, K. M., Xu, Y., Permodo, C. A., Perdomo, C. A., Richardson, S.: Donepezil preserves cognition and global function in patients with severe Alzheimer disease. *Neurology* 2007, 69(5), 459-469.

-
- ³³ Howard, R., McShane, R., Psych, F. R. C. et al.: Donepezil and Memantine for Moderate-to-Severe Alzheimer's Disease. *N. Engl. J. Med.* 2012, *366*(10), 893-903.
- ³⁴ Dooley, M., Lamb, H. M.: Donepezil. *Drugs Aging* 2000, *16*(3), 199-226.
- ³⁵ Ishiuchi, K., Park, J., Long, R. M., Gang, D. R.: Production of huperzine A and other Lycopodium alkaloids in *Huperzia* species grown under controlled conditions and in vitro. *Phytochemistry* 2013, *91*, 208-219.
- ³⁶ Tayeb, H. O., Yang H. D., Price, B. H., Tarazi, F. H.: Pharmacotherapies for Alzheimer's disease: Beyond cholinesterase inhibitors. *Pharmacol. Ther.* 2012, *134*, 8-25.
- ³⁷ Anand, R., Gill, K. D., Mahdi, A. A.: Therapeutics of Alzheimer's disease: Past, present and future. *Neuropharmacology* 2014, *76*, 27-50.
- ³⁸ Shi, Ch., Liu, J., Wu, F., Yew, D. T.: Ginkgo biloba extract in Alzheimer's disease: From action mechanisms to medical practice. *Int. J. Mol. Sci.* 2010, *11*, 107-123.
- ³⁹ Rao, M. G., Holla, B., Varambally, S., Raveendranathan, D., Venkatasubramanian, G., Gangadhar, B. N.: Piracetam treatment in patients with cognitive impairment. *Gen. Hosp. Psychiat.* 2013, *35*, 451.e5-451.e6
- ⁴⁰ Lucas, B., Pinkernelle, J., Fansa, H., Keilhoff, G.: Effects of cerebrolysin on rat Schwann cells in vitro. *Acta Histochem.* 2014, *116*, 820-830.
- ⁴¹ Gasparini, L., Ongini, E., Wilcock, D., Morgan, D.: Activity of flurbiprofen and chemically related anti-inflammatory drugs in models of Alzheimer's disease. *Brain Res. Rev.* 2005, *48*, 400-408.
- ⁴² Jiráček, R. a kol.: *Demence*. Maxdorf, Praha 1999
- ⁴³ Ghosh, A. K., Gemma, S., Tang, J.: β -Secretase as a Therapeutic Target for Alzheimer's Disease. *Neurotherapeutics* 2008, *5*, 399-408.

-
- ⁴⁴ Golde, T. E., Koo, E. H., Felsenstein, K. M., Osborne, B. A., Miele, L.: γ -Secretase inhibitors and modulators. *Biochim. Biophys. Acta* 2013, 1828, 2898-2907.
- ⁴⁵ Armagan, G., Keser, A., Atalayın, C., Dagcı, T.: Tideglusib protects neural stem cells against NMDA receptor overactivation. *Pharmacol. Rep.* 2015, 272, 1-9.
- ⁴⁶ Medina, M., Avila, J.: New perspectives on the role of tau in Alzheimer's disease. Implications for therapy. *Biochem. Pharmacol.* 2014, 88, 540-547.
- ⁴⁷ Hamuláková, S., Janovec, L., Hrabínová, M., Spilovská, K., Koráběčný, J., Kristian, P., Kuča, K., Imrich, J.: Synthesis and Biological Evaluation of Novel Tacrine Derivatives and Tacrine–Coumarin Hybrids as Cholinesterase Inhibitors. *J. Med. Chem.* 2014, 57, 7073-7084.
- ⁴⁸ Cahlíková L., Hulová L., Hrabínová, M., Chlebek, J., Hošťálková, A., Adamcová, M., Šafratová, M., Jun, D., Opletal, L., Ločárek, M., Macáková, M.: Isoquinoline alkaloids as prolyl oligopeptidase inhibitors. *Fitoterapia* 2015, 103, 192-196.
- ⁴⁹ García-Horsman, J. A., Mänistö, P. T., Venäläinen, J. I.: On the role of prolyl oligopeptidase in health and disease. *Neuropeptides* 2007, 41, 1-24.
- ⁵⁰ Brahmachari, G., Gorai, D., Roy, R.: *Argemone mexicana*: chemical and pharmacological aspects. *Rev. Bras. Farmacogn.* 2013, 23(3), 559-575.
- ⁵¹ Obrázek stažen ze stránky <http://lambley.com.au/plant/argemone-grandiflora>, 19.4.2015.
- ⁵² Kubitzki, K., Rohwer, J. G., Bittrich, V. (Eds.): *The Families and Genera of Vascular Plants: Vol. II.: Flowering plants: dicotyledons, magnoliid, hamamelid and cyryophyllid families*. Springer, Berlin 1993.
- ⁵³ Ownbey, G. B.: The genus *Argemone* in South America and Hawaii. *Brittonia*. 1961, 13, 91-109.

-
- ⁵⁴ Schwarzbach, A. E., Kadereit, J. W.: Phylogeny of prickly poppies, *Argemone* (Papaveraceae), and the evolution of morphological and alkaloid characters based on ITS nrDNA sequence variation. *Plant. Syst. Evol.* 1999, 218, 257-279.
- ⁵⁵ Burrows, G. E., Tyrl, R. J.: *Toxic Plants of North America*. 2nd ed. John Wiley and Sons, Inc. 2013.
- ⁵⁶ Miller, P.: *The gardener's dictionary: Vol I*. 9th ed. London 1835.
- ⁵⁷ Sweet, R.: *The British flower garden: Vol. III*. James Ridgway and Sons, London 1838.
- ⁵⁸ Cahlíková, L., Kučera, R., Hošťálková, A., Klimeš, J., Opletal, L.: Identification of Pavinane Alkaloids in the Genera *Argemone* and *Eschscholzia* by GC-MS. *Nat. Prod. Commun.* 2012, 7(10), 1279-1281.
- ⁵⁹ Benn, M. H., Mitchell, R. E.: Alkaloids of *Argemone grandiflora*. *Phytochemistry*. 1972, 11(1), 461-464.
- ⁶⁰ Gözler, B., Lantz, M. S, Shamma, M.: The pavine and isopavine alkaloids. *J. Nat. Prod.* 1983, 46(3), 293-309.
- ⁶¹ Shamma, M.: *The isoquinoline alkaloids Chemistry and pharmacology (Organic chemistry; a series of monographs: Vol. 25)*. Academic Press, London 1972.
- ⁶² Bentley, K. W.: *The isoquinoline alkaloids*. Harwood academic publishers, Amsterdam 1998.
- ⁶³ Saeed, S. A., Gilani, A. H., Majoo, R. U., Shah, B. H.: Anti-thrombotic and anti-inflammatory activities of protopine. *Pharmacol. Res.* 1997, 36(1), 1-7.
- ⁶⁴ Bowsher, C., Steer, M., Tobin, A.: *Plant biochemistry*. Garland Sciencies, New York 2008.

-
- ⁶⁵ Roberts, M. F., Wink, M.: *Alkaloids: Biochemistry, Ecology, and Medicinal Applications*. Plenum Press, New York 1998.
- ⁶⁶ Pelletier, S. W.: *Alkaloids: chemical & biological perspectives: Vol. 11*. Pergamon 1996.
- ⁶⁷ Chapple, D. J., Miller, A. A., Ward, J. B., Wheatley, P. L.: Cardiovascular and neurological effects of laudanosine. Studies in mice and rats, and in conscious and anesthetized dogs. *Br. J. Anaesth.* 1987, 59(2), 218-225.
- ⁶⁸ Zdařilová, A., Vrzal, R., Rypka, M., Ulrichová, J., Dvořák, Z.: Investigation of sanguinarine and chelerythrine effects on CYP1A1 expression and activity in human hepatoma cells. *Food Chem. Toxicol.* 2006, 44, 242-249.
- ⁶⁹ Vrba, J., Doležel, P., Vičar, J., Ulrichová, J.: Cytotoxic activity of sanguinarine and dihydrosanguinarine in human promyelocytic leukemia HL-60 cells. *Toxicol. In Vitro.* 2009, 23, 580-588.
- ⁷⁰ Vieira, S. M., Oliveira, V. H., Valente, R. C., Moreira, O. C., Fontes, C. F. L., Mignaco, J. A.: Chelerythrine inhibits the sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase and results in cell Ca²⁺ imbalance. *Arch. Biochem. Biophys.* 2015, 570, 58-65.
- ⁷¹ Atta-ur-Rahman: *Studies in Natural Product Chemistry: Vol. 16: Stereoselective Synthesis (Part J)*. Elsevier, Amsterdam 1995.
- ⁷² Aronson, J. K.: *Side Effects of Drugs Annual: Annual 35*. Elsevier, Amsterdam, 2014.
- ⁷³ Grycová, L., Dostál, J., Marek, R.: Quaternary protoberberine alkaloids. *Phytochemistry* 2007, 68, 150-175.