

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE, FARMACEUTICKÁ FAKULTA
V HR. KRÁLOVÉ
KATEDRA FARMACEUTICKÉ BOTANIKY A EKOLOGIE

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Biologická aktivita obsahových látek rostlin VII.

Vliv alkaloidů z různých rostlinných taxonů na acetylcholinesterázu

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

Školitel: Doc. RNDr. Lubomír Opletal, CSc.

Hradec Králové, 2007

Jana Nováková

CHARLES UNIVERSITY IN PRAGUE, FACULTY OF PHARMACY IN
HR. KRÁLOVÉ
DEPARTMENT OF PHARMACEUTICAL BOTANY AND ECOLOGY

D I P L O M A T H E S I S

Biological activity of plant metabolites VII.

Influence of alkaloids from several taxons of plants on acetylcholinesterase

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

Supervisor: Doc. RNDr. Lubomír Opletal, CSc.

Hradec Králové, 2007

Jana Nováková

Na tom to místě bych velmi ráda poděkovala všem, kteří mi s vypracováním diplomové práce pomohli. Velké díky patří studentům postgraduálního studia Katedry farmaceutické botaniky a ekologie a spolupracovníci Lucii Řepové. Dále je třeba zmínit odbornou pomoc Mgr. Daniela Juna, PhD. Ovšem největší poděkování patří vedoucímu mé diplomové práce panu **Doc. RNDr. Lubomíru Opletalovi, CSc.**, jehož odborné znalosti, cenné rady a zkušenosti mi byly důležitým vodítkem při tvorbě této práce.

Obsah

1. ÚVOD	6
2. CÍL PRÁCE	9
3. TEORETICKÁ ČÁST	11
3.1 DEMENCE	12
3.2 ALZHEIMEROVA DEMENCE	13
3.2.1 Terapie	15
3.3 CORYDALIS SOLIDA (L.) SW.	21
3.3.1 Systematika	21
3.3.2 Botanický popis	21
3.3.3 Obsahové látky	22
3.3.4 Využití rostliny v praxi	24
3.3.5 Farmakologické účinky	24
3.4 ESCHSCHOLZIA CALIFORNICA CHAM.	25
3.4.1 Systematika	25
3.4.2 Botanický popis	25
3.4.3 Obsahové látky	26
3.4.4 Využití rostliny v praxi	28
3.4.5 Farmakologické účinky	28
3.5 CHELIDONIUM MAJUS L.	29
3.5.1 Systematika	29
3.5.2 Botanický popis	29
3.5.3 Obsahové látky	30
3.5.4 Využití rostliny v praxi	33
3.5.5 Farmakologické účinky	33
3.6 PAPAVER SOMNIFERUM L.	34
3.6.1 Systematika	34
3.6.2 Botanický popis	35
3.6.3 Obsahové látky	35
3.6.4 Využití rostliny v praxi	37
3.6.5 Farmakologické účinky	38
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	39
4.1 VŠEOBECNÉ POSTUPY	40
4.1.1 Úprava rostlinného materiálu	40
4.1.2 Úprava rozpouštědel destilací	40
4.1.3 Perkolace	40
4.1.4 Odpařování	41
4.1.5 Tenkovrstvá chromatografie (TLC)	41
4.2 POTŘEBY	41
4.2.1 Rozpouštědla	41
4.2.2 Chemikálie	42
4.2.3 Detekční činidla	42
4.2.4 Vytvářecí soustavy	43
4.2.5 Chromatografické adsorbenty	43
4.3 PŘÍPRAVA SEKVENČNÍCH EXTRAKTŮ	43
4.3.1 Materiál	43
4.3.2 Extrakce drogy a zpracování extraktu	44
4.3.3 Bioautografická metoda	46
5. VÝSLEDKY	48
5.1 CHELIDONIUM MAJUS L., NAŤ (CH-M/H)	49
5.2 CHELIDONIUM MAJUS L., KOŘEN (CH-M/R)	51
5.3 ESCHSCHOLZIA CALIFORNICA CHAM., NAŤ (E-C)	53
5.4 CORYDALIS SOLIDA (L.) SW., NAŤ (C-S)	55

5.5 PAPAVER SOMNIFERUM L., MAKOVINA (P-S).....	57
5.6 SROVNÁNÍ BIOAUTOGRAFICKÉ METODY V NEUTRÁLNÍ (S2) A BAZICKÉ (S1) VYVÍJECÍ SOUSTAVĚ.....	59
5.7 PŘEHLED POČTU INHIBITORŮ AChE V JEDNOTLIVÝCH VÝTŘEPCÍCH	60
6. DISKUSE.....	61
7. SOUHRN.....	70
8. SUMMARY	72
9. LITERATURA	75

1. ÚVOD

Současný životní styl projevující se hlavně stravovacími návyky, uspěchaností spojenou se stresem, malou pohybovou aktivitou a znečištěným ovzduším, přispívá ke vzniku mnoha civilizačních chorob. Dochází k nárůstu cévních a srdečních onemocnění, rakovinných onemocnění, metabolických, imunitních, ale i neurodegenerativních poruch. Mnohaletý světový výzkum civilizačních nemocí ukázal, že tato velká skupina zdánlivě nesourodých nemocí má příčinu v nitrobuněčné metabolické poruše, při které dochází k zvýšení hladiny homocysteinu. Tato patologická aminokyselina se v těle hromadí vlivem úbytku zastoupení přirozených zdrojů folátů a pyridoxinu či jejich sníženou resorbci z trávicího traktu. Snížení je přímo úměrné množství spolupřítomného tuku. Tato onemocnění mají často také genetický podklad [1].

Veřejností méně zmiňovanou, ale rozšířenou skupinou civilizačních chorob jsou neurodegenerativní onemocnění, poruchy centrálního i periferního nervového systému. Nejrozšířenější z této skupiny jsou Parkinsonova a Alzheimerova choroba.

Parkinsonova choroba postihuje asi 1% osob starších 60 let. Příčinou je úbytek neuromediátoru dopaminu, což má za následek svalovou ztuhlost, zpomalení pohybů a třes, zejména na horních končetinách. Pacienti mají méně stabilní chůzi, chodí o drobnějších krůčcích. V pozdější fázi se často vyskytují psychické komplikace (demence, psychóza) a tzv. pozdní hybné komplikace (neschopnost začít pohyb, rozejít se aj.)

Alzheimerova choroba tvoří více než polovinu všech demencí. Vzniká především u lidí staršího věku. Ve skupině 65letých je postiženo zhruba 2 – 3% populace, se zvyšujícím se věkem toto procento významně stoupá. Ve věku 80 let je postižena polovina lidí.

Tato choroba se vyvíjí velmi nenápadně. Primárně je postižena paměť. Pacienti zapomínají jména rodinných příslušníků, ztrácejí povědomí o čase, později nepoznávají své blízké. V posledních stádiích nemoci jsou zcela odkázáni na pomoc druhých.

Komplexní znalost příčiny vzniku není doposud známa. Existuje řada rizikových faktorů, které zvyšují pravděpodobnost vzniku nemoci. Jsou to především vyšší věk a genetické dispozice, mezi neověřené faktory patří ženské pohlaví, nižší vzdělání, kouření, hypertenze, úraz hlavy, nezdravý životní styl a další [2].

Nejpostiženějším neuromediátorovým systémem je u Alzheimerovy choroby acetylcholinergní systém. Tato skutečnost vedla k hledání látek působících v této oblasti, které by v budoucnu mohly být použity pro farmakoterapii této choroby. Velmi důležitými zdroji účinných látek jsou zdroje přírodní. Potenciálními inhibitory acetylcholinesterázy mohou být některé isochinolinové alkaloidy především z rostlinných čeledí *Papaveraceae* a *Fumariceae*. Moje diplomová práce je příspěvkem k řešení tohoto problému.

2. CÍL PRÁCE

V rámci započatého výzkumného projektu na katedře farmaceutické botaniky a ekologie zabývajícího se screeningem rostlinných látek alkaloidní povahy (založené na struktuře různých heterocyklů) s potenciální anticholinesterázovou aktivitou bylo cílem diplomové práce:

1. vypracovat metodu pro hodnocení inhibice acetylcholinesterázy 2-6 typů předčištěných alkaloidních extraktů z různých rostlin čeledi *Papaveraceae* (Makovité) a *Fumariaceae* (Zemědýmovité) (slabě bazické, středně bazické a silně bazické terciární baze, případně jodidy kvarterních bazí získatelné z kyselého anebo bazického prostředí) za pomoci tenkovrstvé chromatografie,
2. porovnat je z hlediska biologického účinku se standardy (fysostigminem a galanthaminem),
3. v případě srovnatelné aktivity stanovit tuto aktivitu spektrofotometricky, metodou pomocí TLC, *in vitro* Elmannovou metodou,
4. vyhodnotit přípravu extraktů a navrhnout rámcový postup izolace účinných alkaloidů,
5. zpracovat tímto způsobem 5 morfologických částí rostlin: nať *Corydalis solida* (L.) SW., nať a kořen *Chelidonium majus* L., nať *Eschscholtzia californica* CHAM. a makovina *Papaver somniferum* L.

3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1 DEMENCE

Demence je syndrom způsobený chorobou mozku. Postižena je zejména paměť, myšlení, orientace, chápání, schopnost učení [3] a jiné kognitivní funkce. Nezřídka představují základní příčinu smrti. Mohou se projevit již v dětství, jejich výskyt však výrazně stoupá s věkem. Podle příčiny je lze rozdělit do tří skupin [4]:

- *atroficko-degenerativní demence* – mezi něž patří Alzheimerova nemoc, korová nemoc s Lewyho tělísky, demence při Parkinsonově chorobě aj;
- *ischemicko-vaskulární demence* - vznikající jako následek cévních postižení mozku. Do této skupiny patří například multiinfarktová demence, vaskulární demence s náhlým začátkem, nebo Binswangerova choroba;
- *symptomatické demence* - jsou způsobeny postižením mozkové funkce v důsledku jiných chorob, zraněním mozku nebo intoxikacemi.

Podle specifických znaků můžeme průběh demence rozdělit do tří stádií na demenci mírnou, středně těžkou a těžkou. Stádium mírné je charakterizováno poklesem paměti, což se projeví obtížemi při vykonávání běžných denních činností a těžším zapamatováním nových informací. V této fázi je však pacient schopen vést soběstačný život bez potřeby pomoci zvenčí. Středně těžká demence se vyznačuje značným porušením paměti ve všech jejích složkách, které ovlivňuje schopnost samostatného vykonávání smysluplné činnosti. Při demenci těžké jsou všechny složky paměti poškozeny natolik, že postižení nejsou schopni vykonávat ani rutinní činnosti a jsou plně odkázáni na péči okolí [4].

U demencí se vyskytují tři základní funkční okruhy postižení [3]:

- *okruh kognitivních funkcí* – jsou postiženy primárně. Na počátku bývají poruchy paměti, nejdříve novopaměti (špatně si zapamatovávají nové pojmy, jména ap.) a postupně i staropaměti (např. nepřesné vzpomínky);
- *behaviorální a psychologické příznaky demence* – patří sem psychologické poruchy chování, psychotické symptomy (halucinace, bludy, afektivní poruchy), poruchy emotivity, poruchy cyklu spánek – bdění;
- *aktivity denního života* - bývají u demence výrazně porušeny. Zpočátku dochází k úbytku profesních aktivit a koníčků, později zanikají i běžné denní aktivity.

Důležité je postihnout začátek demence, aby bylo možno včas udělat správnou diagnózu a zahájit terapii [3].

3.2 ALZHEIMEROVA DEMENCE

Alzheimerova choroba (ACH) je nejčastější příčinou demence vůbec (60-70% případů syndromu demence). Náleží mezi několik nejzávažnějších a nejnákladnějších chorob. Závažnost spočívá v četnosti, míře postižení kvality života nemocných i v tom, že představuje jednu z nejčastějších příčin smrti. S prodlužujícím se věkem narůstá počet alzheimerovských pacientů. Nemoc začíná velmi pomalu, plíživě, nenápadně. Primárně jsou postiženy kognitivní funkce – paměť, intelekt, motivace. Poměrně časně se vyvíjí porucha soudnosti a logického uvažování. Pacienti mají problémy s orientací v prostoru, s časovou lokalizací dějů, dochází k porušení výkonných funkcí. V pokročilých stádiích přestávají rozeznávat známé osoby, nakonec nepoznají ani své nejbližší příbuzné. V terminálních stádiích se vyskytuje inkontinence moči i stolice, nemocní se bez pomoci

nenajedí, neobléknou, jsou plně odkázáni na pomoc okolí – rodiny či instituce [5,6].

ACH má 3 formy, a to ranou (nástup příznaků do 60. roku života), pozdní (nástup příznaků po 60. roku života) a velmi pozdní (propuká ve věku 85 a více let). Etiologie ACH není plně objasněna [3].

Ověřenými rizikovými faktory pro vznik ACH jsou věk a familiární výskyt včetně genetických vlivů. Diskutovanými rizikovými vlivy jsou ženské pohlaví, poranění hlavy, nižší vzdělání, kouření a další. Mezi ochranné vlivy snižující výskyt choroby se řadí užívání nesteroidních antirevmatik, postmenopauzální estrogenová terapie a užívání statinů [3].

Anatomické změny mozku při ACH se do jisté míry překrývají se změnami doprovázející stárnutí. Numerická atrofie neuronů v průběhu nemoci převyšuje numerickou atrofii doprovázející stárnutí jak v mozkové kůře, tak v podkorových oblastech, mění se dendritické systémy. Destrukce neuronů je zejména v oblasti cholinergního systému [2, 3].

Klasickými diagnostickými znaky doprovázející Alzheimerovu nemoc jsou senilní plaky a neuronální klubka (tangles):

- senilní plaky jsou nepravidelně okrouhlé útvary velké 10-200 μm , které obsahují amyloid. Vzniká štěpením transmembránového amyloidového prekurzorového proteinu APP β -sekretasou. Amyloidový β -protein snadno agreguje a akumuluje. Agregovaný β -amyloid poškozuje neurony;
- neuronální klubka, Alzheimerovy změny neurofibril, se jeví v mikroskopu jako chomáče hrubších vláken. Základní složkou spirálních vláken je τ -protein, protein s vyšší molekulovou hmotností (podmíněno nadměrnou fosforylací) než τ -protein zdravého mozku [3].

Mechanismem poškozujícím mozkovou tkáň v průběhu vývoje ACH je i zánětlivá odpověď. V průběhu onemocnění se prokazuje

abnormální ukládání složek komplementu, reaktantů akutní fáze, různých cytokinů a vyšší aktivita cyklooxygenasy [3].

3.2.1 Terapie

Ideální terapie je terapie kauzální. Doposud bohužel neznáme komplexní etiologii Alzheimerovy choroby, a proto využíváme postupy, které ovlivňují známé patologické řetězce, nebo se snažíme ovlivnit jednotlivé symptomy choroby [6].

Terapie demencí by se neměla omezovat pouze na jeden přístup (např. na farmakoterapii), ale měla by být kombinovaná a zahrnovat jak biologické, tak psychosociologické přístupy.

Nejdůležitější, stejně jako u jiných onemocnění, je včasná a správná diagnóza. Ta je základem pro zahájení účinné farmakologické terapie a zachování uspokojivého funkčního stavu. Bohužel je zatím obecně známou skutečností, že od prvních příznaků demence uplyne mnoho měsíců, než se pacient rozhodne vyhledat lékařskou pomoc [5].

3.2.1.1 Terapie kognitivních poruch

Léčba kognitivních poruch využívá farmaka (kognitiva), která ovlivňují pozitivně centrální acetylcholinergní systém. Cholinergní systém je nejpostiženější ze všech neuromediátorových systémů. Je snížena hladina enzymu syntetizujícího acetylcholin – cholinacetyltransferáza (CAT). Acetylcholin je syntetizován z acetylkoenzymu A a z cholinu. Acetylkoenzym A je tvořen v Krebsově cyklu. Cholin není tvořen v mozku a velmi obtížně přechází přes hematoencefalickou bariéru. K tvorbě acetylcholinu je získáván především z látek, které jej obsahují, jako je fosfatidylcholin. Po uvolnění z presynaptického zakončení se acetylcholin váže na své postsynaptické i presynaptické muskarinové i nikotinové receptory. Tyto receptory bývají u ACH zachovány. Po uvolnění z vazby na receptory je acetylcholin odbouráván enzymy acetylcholinesterázami a u Alzheimerovy choroby i butyrylcholinesterázami. Acetylcholinesterázy

mají několik forem. V mozku zdravého člověka převládá tetramerní forma G4 a pouze minoritní je monomerní forma G1. U ACH roste výrazně podíl formy G1 a klesá podíl G4. Navíc u ACH se uplatňuje další enzym, který je za normálních podmínek zcela minoritní – butyrylcholinesteráza. Ta je novotvořena aktivovanými gliovými elementy v oblasti alzheimerovských plaků a podílí se na odbourávání acetylcholinu [3, 5].

Cholinesterázy se také podílejí na tvorbě β -amyloidu, a tak zasahují přímo do základních neurodegenerativních mechanismů ACH [3].

K látkám ovlivňujícím cholinergní systém patří:

- *prekurzory tvorby acetylcholinu* - Acetylcholin má velmi krátký poločas, a proto je nepoužitelný. Cholin velmi špatně prochází hematoencefalickou bariérou, lecitin pomalu uvolňuje cholin (výsledky klinických studií byly neuspokojivé). Lepší výsledky byly získány při použití cholin-alfoscerát (Gliatilin). Zkoušeny jsou také fosfatidylserin a fosfatidylinositol [3];
- *inhibitory cholinesteráz* - užití inhibitorů mozkových cholinesteráz je nejužívanější postup v terapii ACH, především lehkých až středních forem. U této choroby je porušena především presynaptická část acetylcholinergního neuronu, je sníženo uvolňování acetylcholinu z presynaptického zakončení [6].

Inhibitory cholinesteráz zablokuje nadměrné odbourávání acetylcholinu, udržují molekuly acetylcholinu ve stavu, kdy jsou schopné navázat se na své pre- i postsynaptické receptory. Některé inhibitory inhibují pouze acetylcholinesterázy, jiné odbourávají kromě toho i butyrylcholinesterázu. Od centrálních inhibitorů esteráz je očekáváno, že budou dobře procházet přes hematoencefalickou bariéru, že budou specificky inhibovat

mozkové, nikoliv periferní formy acetylcholinesteráz, a že budou dobře tolerovány. Mezi další požadavky na inhibitory AChE patří i přítomnost aminu v molekule, který díky pH prostředí získává kladný náboj, dále by měla molekula obsahovat část schopnou tvořit vodíkové vazby s asparaginovou doménou receptoru a malou skupinu, která se váže k hydrofobní části receptoru [6, 7].

Existují 3 formy inhibice: reverzibilní, ireverzibilní a pseudoreverzibilní (v molekule cholinesterázy dojde ke kompetitivnímu vytěsnění acetylcholinu inhibitorem, který je pak sám odbouráván cholinesterázami [3, 6].

Inhibitory acetylcholinesteráz představují nejednotnou chemickou skupinu. Patří sem:

- skupina akridinových přípravků - inhibice je reverzibilní. Dříve byl používán takrin, ale pro hepatotoxicitu byl stažen. Další jsou klinicky zkoušeny [3];
- skupina piperidinových derivátů - klinicky je používán donepezil (Aricept). Ve stádiu klinického zkoušení je ikopezil[3, 6];
- karbamátové deriváty - široce klinicky užívanou látkou je rivastigmin (Exelon), pseudoreverzibilní inhibitor, částečně inhibuje i butyrylcholinesterázu. Je vysoce specifický vůči monomerní formě acetylcholinesteráz [3, 6];
- alkaloidy - galanthamin (Reminyl) je alkaloid z některých druhů čeledi *Amaryllidaceae*, jako je např. čínská rostlina *Lycoris radiata* Herb. a evropských bylin *Galanthus nivalis* L. a *Narcissus* spp. Provádí reverzibilní inhibici acetylcholinesterázy a allostericky moduluje pre- i postsynaptické receptory. Randomizované klinické

zkoušky ukázaly dobrou toleranci a významné zlepšení poznávacích funkcí. Další perspektivní látkou je alkaloid čínské rostliny *Huperzia serrata* Thunb. (*Huperziaceae*) - huperizin A. Vykazuje vyšší selektivitu pro acetylcholinesterázu než pro butyrylcholinesterázu, podobně jako alkaloid berberin, izolovaný z byliny *Coptis chinensis* Franch. Jedním z alkaloidů, který byl zkoušen pro svou inhibiční aktivitu na cholinesterázy je také fysostigmin, izolovaný ze semen *Physostigma venenosum* Balf. Způsoboval však značné nežádoucí periferní účinky (hypersalivace, nauzea, bradykardie, svalové křeče, poruchy centrálního nervového systému a další), a proto není využíván v klinické praxi. Rutekarpin, alkaloid izolovaný z *Evodia rutecarpa* Benth. vykazuje navíc i inhibiční aktivitu na COX-2 [3, 6, 7];

- terpeny a další sekundární metabolity – etanolové extrakty a silice druhu *Salvia* (*S. officinalis* L., *S. lavandulaefolia* Vahl.) byly zkoušeny na antiacetylcholinesterázovou aktivitu. Tato aktivita byla dokázána již v poměrně nízkých koncentracích. Za tento účinek jsou zodpovědné především cyklické terpeny 1,8-cineol a α -pinen, účinnější je však silice než jednotlivé izolované látky. Farmakologicky aktivní při léčbě mozkových cévních onemocnění či při dysfunkci neuropeptidů, významných u neurodegenerativních chorob, jsou přírodní látky kořene *S. miltiorrhiza* Bung. Inhibiční účinek na AChE je zprostředkován diterpeny. Další byliny, které zlepšují poznávací funkce jsou *Melissa officinalis* L. (silice získané z listu) a *Origanum*

majorana L. (účinnou složkou je triterpenová kyselina ursolová).

Withanolidy, skupina látek se steroidní strukturou, byly nalezeny v některých druzích čeledi Solanaceae, především u byliny *Withania somnifera* L. Nejvýraznější inhibiční účinek mají sitoindosidy a withaferiny. Při léčbě úzkostí a nervových poruch se jako účinná ukázala bylina *Magnolia officinalis* Rehd. et Wils. Účinnými látkami jsou bifenoly honokiol a magnolol, umocňující GABAergní neurotransmisi [7].

- *přímí muskarinová a nikotinová antagonisté* - tato léčebná strategie je fázi klinického zkoušení. Účinek se očekává např. u lobelinu byliny *Lobelia inflata* L. [3, 7];
- *látky ovlivňující acetylcholinergní systém pomocí jiných transmitterových systémů* - jsou hledány látky působící parciálně antagonisticky ke GABA-systému tak, aby byla odstraněn inhibiční účinek na acetylcholinergní systém [3];
- *látky působící proti volným kyslíkovým radikálům nebo tlumící jejich nadměrnou tvorbu* - používají se tzv. scavengery volných radikálů, např. α -tokoferol (vit. E), extractum ginkgo bilobae;
- *nootropní látky* - tyto látky neprokázaly dostatečný účinek u ACH. Řadí sem např. piracetam, pyritinol, nicergolin [3, 6];
- *látky stimulující uvolnění nervových růstových faktorů* - zde se používá především cerebrolysin, výsledky studií však nebyly jednoznačné [6];
- *nekompetitivní inhibitory NMDA receptorů excitačních aminokyselin* - je zatím klinicky užívaná pouze jedna látka – memantin (Exiba). NMDA (N-methyl-D-aspartátové) receptory otvírají iontové kanály pro Ca^{2+} U ACH a dalších poruch CNS

dochází k nadměrnému uvolnění excitačních aminokyselin a nadměrné excitaci NMDA receptorů. Řadou mechanismů dojde k odkrytí genu pro apoptózu a k nadměrnému zániku neuronů [6].

3.1.1.2 Terapie nekognitivních poruch

V léčbě přidružené deprese jsou používána antidepresiva, především druhé, třetí (fluoxetin, citalopram) a čtvrté generace (mirtazapin, venlafaxin).

K ovlivnění úzkosti jsou stále častěji používány benzodiazepinové přípravky (oxazepam, lorazepam).

Při poruchách spánku mají dobrý efekt hypnotika zopiklon a zolpidem [3].

3.1.1.3 Nefarmakologické přístupy v terapii Alzheimerovi demence

K nefarmakologickým přístupům patří především:

- *kognitivní rehabilitace* - jedná se o různé, zpravidla zjednodušené a nesoutěživé slovní hry;
- *reminiscenční terapie* - tato metoda využívá vzpomínek a jejich vybavování prostřednictvím různých podnětů (vyprávění starých příběhů, zpívání, tanec...)
- *adaptace prostředí pro pacienty s demencí* - úprava prostředí, aby bylo pochopitelné, přehledné, předvídatelné;
- *vedení k soběstačnosti*;
- *lifestyle approach* - jedná se o „návod k pacientovi“, o vzájemném sdělení mezi pečujícími, co je schopen učinit sám, v čem potřebuje pomoc [5].

Velmi důležitá součást terapie ACH je práce s pečovateli, rodinnými příslušníky alzheimerovských pacientů. Jsou zřizovány společnosti a instituce poskytující pomoc v terapii a edukaci (u nás Česká Alzheimerovská společnost) [3].

Při výzkumu přírodních látek, zasahujících do metabolismu cholinesteráz, se ukázaly aktivní některé isochinolinové alkaloidy, především z čeledě *Papaveraceae* (berberin, chelerytrin), aktivní jsou však alkaloidy i z jiných rostlin a z těchto důvodů byl zahájen širší screening.

3.3 *Corydalis solida* (L.) SW.

3.3.1 Systematika

Corydalis solida (L.) SW. (Dymnivka plná) patří do čeledi *Fumariaceae* (Zemědýmovité), která je velmi blízce příbuzná makovitým.

Jedná se o velmi variabilní druh, vzhledem i obsahem alkaloidů podobná *Corydalis cava* (L.) Schweigg. et Koerte [8, 9].

Rozšířená téměř po celé Evropě. V České republice se hojně vyskytuje na Moravě [10, 11].

3.3.2 Botanický popis

Vytrvalá, 10 až 20, zřídka až 30 cm vysoká bylina. Podzemní hlíza je velká, plná, v nejdolejší části se svazkem kořínků. Lodyha je přímá, při bázi s bledou až žlutavě hnědou šupinou, v jejímž úžlabí vyrůstá někdy sterilní listnatá větévka. Lodyžní listy jsou 2 (-4), dlouze řapíkaté, modravě zelené, v obrysu trojúhelníkovité, 2x trojčetné, lístky jsou dlanitě 2-3klané až 2-3dílné. Hrozný jsou 7-22květé, přímé; listeny široce klínovité, dlanitě 3-6klané až 3-6dílné. Květy jsou špinavě růžově nachové, řidčeji bledě růžové, vzácně bílé; přední okraj hor. i dol. korunního lístku nazpět ohnutý; ostruha poměrně tlustá, vzhůru směřující, na konci mírně dolů ohnutá. Tobolky jsou v obrysu podlouhle

nebo vejčité kopinaté, 10-25 mm dlouhé. Semena jsou oblá, 2,0-2,5 mm v průměru [9, 10].

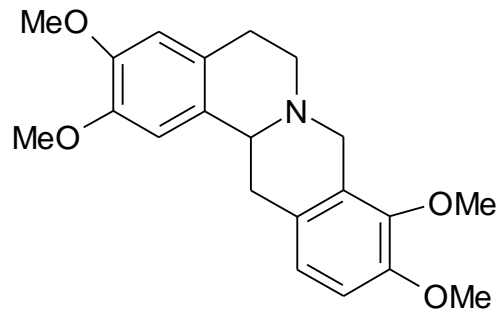
3.3.3 Obsahové látky

Alkaloidy ~ 0,37 % isochinolinových alkaloidů těchto skupin:

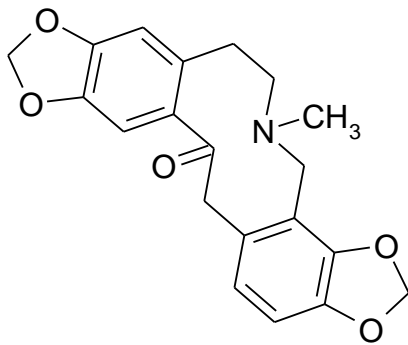
- *protoberberinový typ* - hlavní alkaloid (+)-tetrahydropalmatin, také izolovaný jako racemát; vedle toho, (+)-korydalin, dehydrokorydalin, jatrorrhizin; jako vedlejší alkaloidy (±)-korybulbin, (+)-korypalmin, (-)-isokorypalmin, (-)-skoulerin, (-)-stylopin, korysamin, palmatin, (+)-*N*-methyllaudanidiniumjodid, (-)-*cis-N*-methylkanadin a *cis-N*-methylstylopin; ve stopových množstvích koptisin, kolumbamin a berberin;
- *protopinový typ* - protopin a allokryptopin;
- *aporfinový typ* - stopy bulbokapninu. V odrůdě *Corydalis solida* (L.) SW.

ssp. brachyloba (BOISS.) CULLEN et DAVIS se vyskytují spirobenzylisochinoliny (+)-fumarilin, (+)-parfumin a (±)-sibiricin; mimo to protoberberiny, kulariny, benzofenantridiny, ftalidisochinoliny a protopiny: (-)-kanadin [(–)-tetrahydroberberin], (-)-sinaktin, (-)-korydalin, (+)-skoulerin, berberin, dehydrokorydalin, oxokularin, oxosarkokapnidin, (+)-bikukullin, (+)- α -hydrastin, (+)-bulbokapnin, (+)-isoboldin, norsanguinarin, (±)-chelidimerin, protopin, β -allokryptopin a (-)-norjuziphin [9].

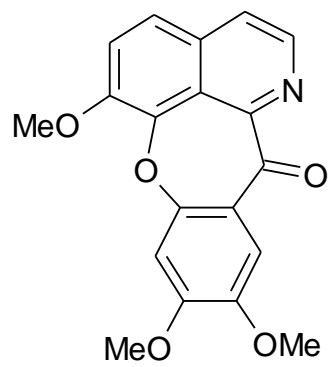
- (+)-Tetrahydropalmatin



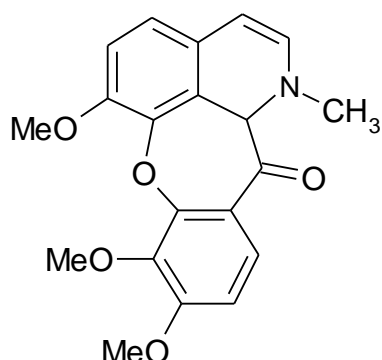
- Protopin



- Oxokularin



- Oxosarkokapnidin



3.3.4 Využití rostliny v praxi

Kdysi se v terapii používala sušená hlíza jako spazmolytikum a anthelmintikum, dnes se nepoužívá již ani v lidovém léčitelství [8].

3.3.5 Farmakologické účinky

- *Cytostatický účinek* - osmnáct izochinolinových alkaloidů zahrnující protoberberiny, benzofenanthridiny a aporfinové alkaloidy izolovaných z rostlin rodu *Corydalis* bylo testováno na zpomalující účinky na virus Epstein – Barrové. V primární screeningové zkoušce ukázaly všechny izochinolinové alkaloidy zpomalující aktivitu na růst viru. Je možné, že v budoucnu budou tyto látky využívány jako protinádorové látky [12];
- *Antiulcerózní aktivita* - alkaloidy, především dehydrokorydalin snižují sekreci H⁺ iontů a pepsinu. Antagonizují histaminem a gastrinem indukovanou žaludeční sekreci. Dále snižují negativní působení léčiv (např. nesteroidních antiflogistik) na žaludek. Antiulcerózní aktivita byla testována na zvířatech a bylo dosaženo velmi dobrých výsledků v léčbě žaludečních i duodenálních vředů [13].

3.4 *Eschscholzia californica* CHAM.

3.4.1 Systematika

Eschscholzia californica (Sluncovka kalifornská) patří do čeledi *Papaveraceae* (Makovité).

Jedná se o velmi variabilní druh. Dělí se na dvě zeměpisně od sebe oddělené odrůdy *Eschscholzia californica* (GREENE) ssp. *californica*, rozšířená v Oregonu a Kalifornii, a *Eschscholzia californica* GREENE ssp. *mexicana* (GREENE) C. CLARK [Syn.: *E. douglasii* (HOOK. et ARN.) WALP.] s hlavním výskytem v Novém Mexiku, Texasu a severním Mexiku. Známé jsou četné variety: *Eschscholzia californica* CHAM. var. *peninsularis* (GREENE) MUNZ, var. *crocea* (BENTH.) JEPS., var. *maritima* (GREENE) JEPS a var. *dentata*. V Evropě se od 19. století pěstuje jako okrasná rostlina pod názvem *Eschscholzia californica*, druh je zkřížen z různých poddruhů resp. var. druhu *Eschscholzia californica*.

Roste planě v Kalifornii, Mexiku, pěstovaná je ve Francii [9].

3.4.2 Botanický popis

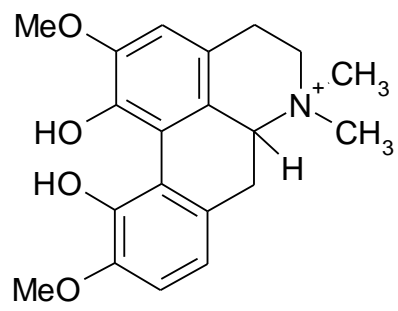
Jednoletá (ssp. *mexicana*) či vytrvalá (ssp. *californica*), 0,2 až 0,8 m vysoká bylina s bezbarvým mlékem. Listy jsou nepatrné, silně zpeřené a do tenkého cípu vybíhající. Lodyha je vzpřímená, dutá. Květy dlouze stopkaté, 2,5 až 3,5 cm v průměru, jednotlivě nasedající na úžlabí listů. Barva květu se mění u divoce rostoucích forem od světle žluté do oranžové, korunní lístky na bázi oranžově červené, v poupatech zkroucené, čtyři uspořádané do kruhu. Blizna je nitkovitá. Četné žluté tyčinky, u ssp. *californica* silně variabilní počet (13 do 47), u ssp. *mexicana* neměnný (20 do 25). Některé květy jsou s 2 čnělkami prodlouženými, delšími než tyčinky. Plodem je tobolka. Je podlouhlá, chlopnovitá, vně s vystouplým žebrováním. Semena jsou malá kulatá,

bez přívěsků. Klíček u ssp. *californica* je s rozdělenými, u ssp. *mexicana* s nerozdělenými dělohami [9, 10].

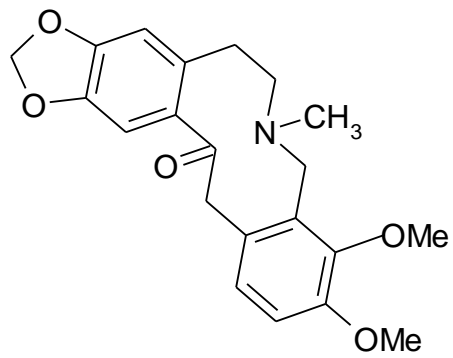
3.4.3 Obsahové látky

Celá rostlina obsahuje alkaloidy. Obsah činí v době květu až 1,1% suché hmotnosti. Kořen obsahuje až 2,7 % alkaloidů, z toho 0,014 % magnoflorin, 0,013 % (-)- α -kanadinmethohydroxid, 0,05 % norargemonin a 0,08 % bisnorargemonin; tento alkaloid je v nadzemní části rostliny nanejvýš ve stopovém množství. Allokryptopin představuje s asi 1,8 % hlavní alkaloid kořene. Semena obsahují protopin, allokryptopin, chelerythrin a další alkaloidy. Šťáva mléčnic obsahuje protopin, benzofenanthridiny chelirubin, dihydrochelirubin, dihydrochelerythrin, sanguinarin, dihydrosanguinarin, norsanguinarin, oxosanguinarin jakož i aporfinový alkaloid magnoflorin. Submerzně kultivované buňky obsahují 10- hydroxysanguinarin, 12- hydroxychelirubin, 10-hydroxychelerythrin a mimo to benzofenanthridin, sanguinarin, chelirubin, makarpin a chelerythrin, 10- hydroxychelerythrin a 12-hydroxychelirubin. Nať obsahuje asi 0,29 až 0,38 % alkaloidů. Z toho představuje kvartérní baze kalifornidin (0,19 až 0,23 %) hlavní alkaloid. Dále 0,14 až 0,15 % terciárních nefenolických bází, z toho 0,02 až 0,03 % allokryptopin, protopin (= makleyin = fumarin = biflorin) a escholzin (= eschschozlin = kalifornin), ten se vyskytuje jen v nadzemní části rostliny. V nepatrném množství je aporfin *N*-methyllaurotetanin (= lauroschozlin), korydin, isokorydin jakož i kvartérní benzofenanthridin sanguinarin (=pseudochelerythrin) a chelerythrin (= toddalin), dále chelirubin, makarpin a chelilutin. Ve velmi nepatrném množství je pavinan karyachin, isonorargemonin, norargemonin a bisnorargemonin a stopově berberin, koptin a korysamin [9].

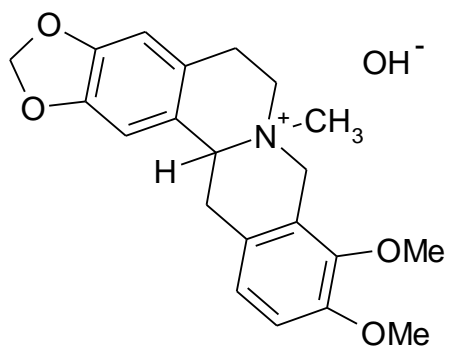
- Magnoflorin



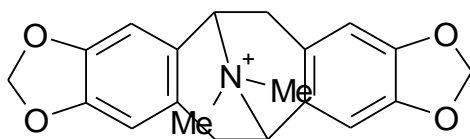
- Allokryptopin



- (-)- α -Kanadinmethoxyhydroxid



- Kalifornidin



3.4.4 Využití rostliny v praxi

Droga je zřídka užívaná. V medicíně se jejích účinků nevyužívá, v lidovém léčitelství je součástí některých léčivých přípravků, v kombinaci s rostlinnými sedativy. Přípravky se používají při poruchách spánku, bolesti, nervozitě, zvýšené dráždivosti, neuropatii, pomočování, nykturii u dětí. Užívá se také u žlučnickových a jaterních onemocnění. V Americe se používá při poruchách spánku u dětí; ve Francii při nervozitě. Účinnost drogy a její příprava v dosud uvedené oblasti použití se zdá kromě léčby bolesti pravděpodobná, není ale podložena dostatečným množstvím klinických studií [9].

U Indiánů Kalifornie je odvar „zlatého máku“ používáný zevně proti vším [9].

V různých barevných variantách jako okrasná zahradní květina. Je příležitostně využíváná jako náhrada za marihuanu [9].

3.4.5 Farmakologické účinky

- *Prodloužení barbiturátového spánku* - tinktura či suchý extrakt z drogy i. p. podané způsobují u myší po aplikaci pentobarbitalu i. p. prodloužení barbiturátového spánku o 81 % [8, 9];
- *sedativní účinek* - suchý extrakt drogy, zhotovený z horkého vodného výtažku působil u myší sedativně. Sedativní ED₅₀ je od 254 mg/kg tělesné hmotnosti i. p. [8, 9];

- *anxiolytický účinek* - stejně připraveným extraktem bylo dosaženo u myši odstranění strachu. Jako referenční látka sloužil klorazepat [8, 9];
- *spazmolytický účinek* - u izolovaného krysího lačnicku zamezila dávka tinktury drogy BaCl₂ indukované kontrakci hladkého svalstva. Rostlina vyvolává slabé stahy dělohy [8, 9].

3.5 *Chelidonium majus* L.

3.5.1 Systematika

Chelidonium majus L. (Vlaštovičník větší) je rostlinný druh z čeledi *Papaveraceae* (Makovité).

Uvnitř druhu se vyskytuje různá morfologická rozmanitost (var. *crenatum*, *fumariifolium*, *maius*, *tenuifolium*).

Vyskytují se také různé karyotypy: 2n = 12, rostliny mnohých stanovišť v Evropě a Asii; 2n = 10 v Japonsku a východní Evropě; 2n = 20 v Japonsku; v Polsku byly vyšlechtěny tetraploidní druhy 2n = 24. Tato odrůda je zde pěstována a označována jako *Chelidonium majus* “Cynober” [9].

Rozšířen po celé Evropě a v mírném až subarktickém pásmu Asie; zavlečen byl do Severní Ameriky [10].

3.5.2 Botanický popis

Vytrvalá bylina, 30 až 50 (100) cm vysoká. Oddenek tlustý, krátký, často větvený až rozeklaný, až houbovitě- vláknité konzistence, červenohnědý, často s kořenovými vlásky, prostoupený mléčnicemi. Lodyha přímá, dutá, rozvětvená, s chlupy a jako celá rostlina prostoupena mléčnicemi s oranžově žlutou šťávou. Listy jsou střídavé, dolní dlouze, horní krátce řapíkaté, stejného tvaru. Listová čepel je jednoduše až přetřhovaně lichožpeřená, na líci sytě, na rubu sivě zelená, tenká. Lístky jsou vejčité, laločnatě vroubkované, terminální lístek je trojlaločný. Květenství je 2-6květý okolík s květy 1-2 cm

v průměru. Kalich je žlutý, korunní lístky 4, obvykle celokrajné. Tyčinky jsou žluté, s kyjovitě ztloustlými nitkami. Semeník je svrchní, ze 2 plodolistů, jednopouzdrý, se 2 nástěnnými semenici. Plodem je až 5 cm dlouhá tobolka, mnohosemenná, otevírající se odspodu 2 chlopněmi. Semena jsou ledvinovitá až vejčitá, 1,2 až 1,7 mm dlouhá, černá. Šíření semen zajišťují mravenci (myrmekochorie). Doba květu je květen až září [9].

3.5.3 Obsahové látky

Prakticky ve všech částech rostliny *Chelidonium majus* jsou obsaženy alkaloidy, ve velké části v mléčnicích.

Alkaloidy lze rozdělit do následujících skupin:

- *Benzofenanthridinový typ* (*α -nafthofenanthridinový- typ*) - alkaloidy jsou charakteristické tetracyklickým systémem. Tato alkaloidní skupina může být dále dělena do 2 chemických podskupin, při čemž první obsahuje terciální N-atom (např. chelidonin) a druhá kvartérní N-atom s 2 centrálními aromatickými kruhy (např. sanguinarin);
- *protoberberinový typ* - je zastoupený tetrahydroprotoberberiny (stylopin) a také protoberberiny (berberin);
- *protopinový typ* - k tomu patří pro Papaveraceae charakteristický protopin;
- *ostatní* - jiné typy alkaloidů než tři výše uvedené typy benzylisochinolinových derivátů se vyskytují jen v nepatrném množství: chinolizidinové alkaloidy (spartein) a aporfinové alkaloidy (magnoflorin).

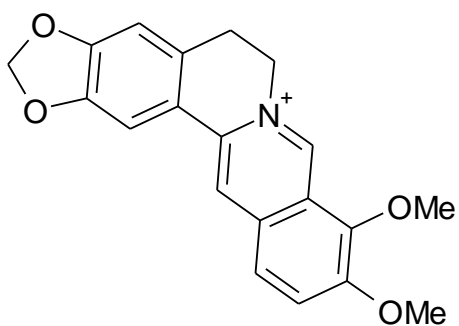
Složení a množství alkaloidů vlašovičnicku může značně variovat v závislosti na úpravě, původu, stáří a vegetačním období rostliny.

V nadzemních částech rostliny je obsah alkaloidů 0,3-1 %. Jde především benzylisochinolinové deriváty benzofenanthridinového,

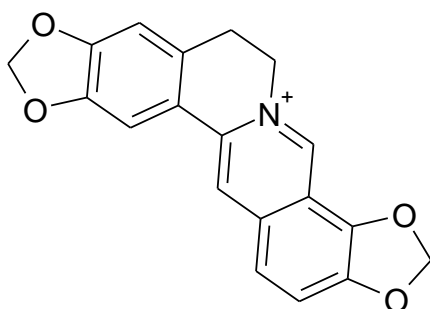
protoberberinového a protopinového typu: chelidonin, sanguinarin, chelerythrin, stylopin, koptisin, berberin a protopin. Další alkaloidy jsou přítomné jen v nepatrných množstvích.

Největší obsah alkaloidů má kořen, často 2-3 %. Hlavní alkaloidy představují chelidonin, chelerythrin, koptisin, sanguinarin a aporfinový alkaloid magnoflorin [9].

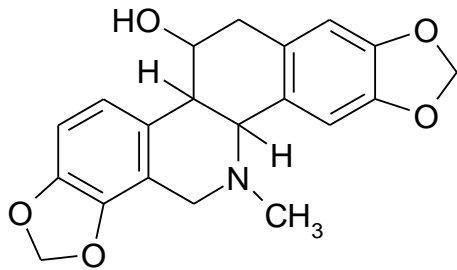
- Berberin



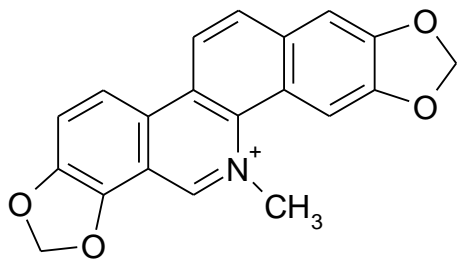
- Koptisin



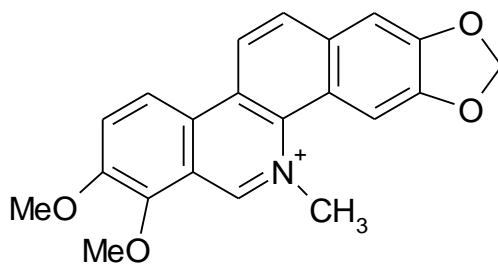
- Chelidonin



- Sanguinarin



- Chelerythrin



Dalšími obsahovými látkami vlašovičníku jsou rostlinné kyseliny. Jsou to především kyselina chelidonová, citronová, jablečná, jantarová, kávová, *p*-kumarová, ferulová, gentisová, *p*-hydroxybenzoové a deriváty kyseliny skořicové.

Přítomny jsou i další nealkaloidní sloučeniny cholin, histamin, metylamin a tyramin [9].

3.5.4 Využití rostliny v praxi

Vlaštovičnick byl znám již v antice a až do dnes je používán jako léčivý přípravek, především k léčbě onemocnění žlučníku a hepatopatií. Ve středověku byla rostlina používána zevně mimo to na kožní choroby jako puchýře, svrab a bradavice, nejvíc ve formě čerstvé šťávy z mléčnic nebo vylisované šťávy z čerstvé rostliny.

V dnešní době jsou drogy *Chelidonii herba* a *Chelidonii radix* používány jako spazmolytikum, cholagogum, antiseptikum, mírné sedativum a analgetikum. V lidovém léčitelství jsou různé preparáty ze sušené natě doporučeny při křečích, zejména žlučových cest a trávicího traktu, u angina pectoris, astmatu a arterioskleróze, dále při hypertonii, onemocnění jater, žlučnickových kamíncích, na cizopasně červy a rakovinu žaludku. V Číně se používá sušená nať jako prostředek proti žaludečním a duodenálním vředům, edémům a hepatitidám.

Uvádí se, že čerstvá rostlina je jedovatá, na kůži a sliznicích vyvolává záněty, otoky až puchýře, vnitřně zvracení, krvavé průjmy a hematurii. Jedovatost je připisována šťávě mléčnic, která během sušení mění své složení a téměř ztrácí toxicitu. Příznaky intoxikace nebyly vždy prokázány při pokusech na zvířatech. V praxi jsou otravy touto rostlinou řídké pro její nepříjemnou chuť a vůni [9].

3.5.5 Farmakologické účinky

K většině dříve prováděných farmakologických průzkumů byly používány výtažky z čerstvých, zřídka ze sušených celých rostlin, extrakty z čerstvých rostlinných částí (čerstvá nať nebo čerstvý kořen) nebo z celé rostliny izolované alkaloidy. Na základě těchto prací má vlaštovičnick dva hlavní účinky, a to ovlivnění srdce a oběhové soustavy a účinek na centrální nervovou soustavu [9].

- *kardiovaskulární účinek* - výtažky z čerstvé natě a z čerstvé celé rostliny stimulující srdeční činnost, zvyšují krevní tlak a rozšiřují věnčité cévy a zužují periferní cévy [9];

- *spazmolytický účinek* - dále je vlaštovičníku připisován spazmolytický účinek na hladké svalstvo žaludku, střevního traktu a žlučových cest, hlavní vliv bude mít především chelidonin [9];
- *cholagogní účinek* - některé klinické zkoušky byly zaměřeny na cholagogní účinek vlaštovičníku. Po podání rostlinného extraktu došlo k zvýšení sekrece žluči a pankreatických šťáv do duodena. Zatím ale není jasné, zda bude tento efekt drogy využíván při onemocnění žlučových cest [9];
- *antimikrobiální účinek* - řada studií prováděných se suchými i tekutými ethanolvými extrakty ukázala slabé antibakteriální (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Shigella sonnei*) a slabé až silné antimykotické (*Candida*, *Trichophyton*, *Microsporum*) působení vlaštovičníku. Inhibiční účinek výtažků se lišil podle doby sběru drogy (nejvyšší antimikrobiální účinek vykazovaly extrakty drog sbíraných v září) [9];
- *cytostatický účinek* - k ověření cytostatického účinku vlaštovičnickových preparátů byly provedeny experimenty na zvířatech s vodnými a alkoholovými výtažky ze sušené natě. Nejvyšší aktivitu a nejnižší toxicitu vykazoval ve vodě rozpustný, čištěný alkoholový extrakt [9].

3.6 *Papaver somniferum* L.

3.6.1 Systematika

Papaver somniferum L. (Mák setý) je rostlinný druh patřící do čeledi *Papaveraceae* (Makovité).

Rod *Papaver* je velmi variabilní, je zastoupen více než 30 druhy. Mezi ně patří i druh *Papaver somniferum* L., který je původem pravděpodobně z Přední Asie nebo ze Středomoří [10].

3.6.2 Botanický popis

Jednoletá bylina, ze všech částí mléčící. Lodyha je 30-180 cm vysoká, přímá, jednoduchá až bohatě větvená, lysá nebo řídce štětinatě chlupatá, modře ojíněná. Listy jsou celistvé, zubaté, dolní jsou podlouhlé v řapík zúžené, horní poloobjímavé. Květy jsou jednotlivé, o průměru až 10 cm, se dvěma prchavými kališními lístky a 4 bílými, světle fialovými nebo růžovými korunními lístky, které mají na bázi tmavě fialovou nebo červenohnědou skvrnu. Plod, tobolka (makovice), je různého tvaru, nejčastěji válcovitý, elipsoidní až téměř kulovitý. Je rozdělena četnými nepravými příhrádkami a vyplněna semeny. Semena jsou 1,0-1,5 mm velká, modrošedá, vzácněji bílá, žlutá, růžová, hnědá až téměř černá. Doba květu je červen až srpen [8, 10].

3.6.3 Obsahové látky

Hlavními obsahovými látkami máku jsou alkaloidy. Jsou získávány často z opia (ze zářezů do nedozrálého pouzdra vytékající a na ploše pouzdra zaschlý obsah mléčnic) nebo z makoviny (nahrubo rozbité makovice a 15 cm horní části stonku) [9].

Celkový obsah alkaloidů závisí na mnoha faktorech (odrůda, stanoviště, počasí, doba sběru), zvyšuje se během růstu až do doby květy, a potom opět klesá. Také se ukázala rozdílná koncentrace alkaloidů během dne s minimem v poledne a maximem v časných ranních hodinách. Zvláště silný pokles obsahu může nastat, když jsou alkaloidy vyplaveny ze zrajících makovic deštěm nebo kroupami [9].

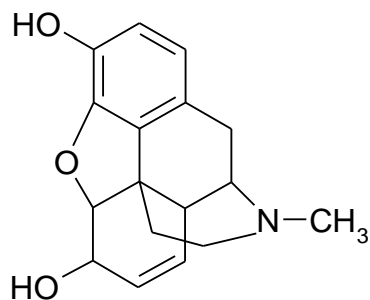
Alkaloidy se nevyskytují volně, ale jsou z největší části vázané na kyselinu mekonovou, kyselinu fumarovou, mléčnou a kyselinu sírovou. Jen asi 20 alkaloidů se vyskytuje přímo, ostatní vznikají oxidací, hydrolýzou nebo racemizací během schnutí latexu (mléčná šťáva vytékající po poranění pletiv, na vzduchu tuhne). Hlavními alkaloidy jsou morfin (10-20 %), kodein (0,2-3,0 %), thebain (0,2-1,0 %), papaverin (0,5-1,3%) a narkotin (2-12 %) [9].

Alkaloidy jsou podle struktury rozděleny do několika skupin:

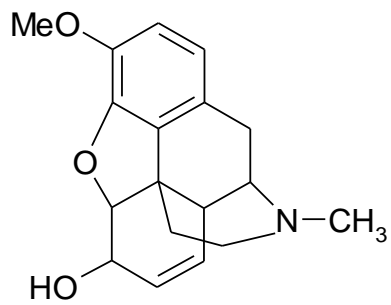
- *Morfinanový typ* - morfin, pseudomorfin, kodein, neopin (β -kodein), 10-hydroxykodein, thebain;
- *benzylisochinolinový typ* - papaverin, papaveraldin (xanthalin), palaudin, laudanin, laudanidin, laudanosin, kodamin;
- *ftalidisochinolinový typ* - noskapin (narkotin), narkotolin, gnoskopin, oxynarkotin, narcein;
- *tetrahydroisochinolinový typ* – hydrokotanin;
- *protopinový typ* - protopin, kryptopin;
- *protoberberinový typ* - (-)-skoulerin, somniferin;
- *aporfinový typ* - korytuberin, magnoflorin, isoboldin, papaverrubin, porfyroxin (papaverrubin D), papaverrubin B, C, E, glaudin;
- *alkaloidy neznámých struktur* - lanthopin, papaveramin.

Mák setý obsahuje i další látky. Jsou to např. rostlinné kyseliny (kyselina jablečná, jantarová, citrónová, octová a kyselina mléčná), tuky, stopy cukru, vosky, pryskyřice, slizové látky, bílkoviny, polypeptidy a aminokyseliny [9].

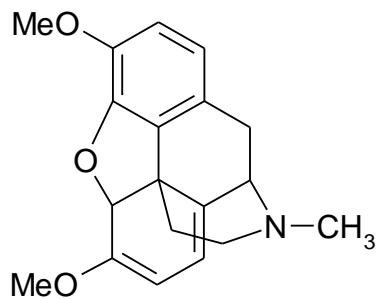
- Morfin



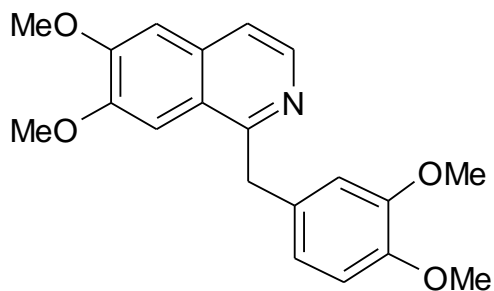
- Kodein



- Thebain



- Papaverin



3.6.4 Využití rostliny v praxi

Rostlina je pěstována k potravinářským účelům (tzv. mák olejný) a k izolaci alkaloidů (tzv. mák opiový). Surové opium se používá k výrobě farmaceutických přípravků, např. opiová tinktura, ta je v medicíně dnes už jen zřídka využívána k léčbě silných bolestí a

k imobilizaci střev při průjmovitých onemocněních. Bohužel je však surovinou pro přípravu heroinu [14].

Bohužel se opium velmi často zneužívá k vyvolávání euforických stavů, ať už kouřením, polykáním nebo intravenózní aplikací. Užívání drog morfinového typu vede velmi snadno ke vzniku závislosti (fyzické i psychické), toleranci, po vysazení se rozvíjí abstinenční syndrom [14].

3.6.5 Farmakologické účinky

- *analgetický účinek* - největší farmakologické využití má morfin pro svůj analgetický účinek, a to při léčbě velmi silných bolestí. Dále snižuje dechovou frekvenci i dechový objem, způsobuje miózu (zúžení zornic), snižuje sekreci žláz [14, 15];
- *antitusický účinek* – v terapeutické praxi se k tlumení suchého dráždivého kašle využívá kodein, který ovlivňuje centrum pro kašel v prodloužené míše [14];
- *spasmolytický účinek* - jako spasmolytikum je používán alkaloid papaverin působící relaxaci hladkého svalstva (uvolňuje křeče svalstva), včetně koronárních a mozkových cév [14].

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Všeobecné postupy

4.1.1 Úprava rostlinného materiálu

Rostlinné části byly sbírány za suchého a slunného počasí, sušeny za pokojové teploty ve stínu (ztráta sušením usušeného materiálu ~ 5-10%). Usušené rostlinné části byly rozdrobněny na mlýnku na velikost 1–3 mm s menším prachovým podílem.

4.1.2 Úprava rozpouštědel destilací

Rozpouštědla využívaná pro přípravu alkaloidních koncentrátů byla před použitím čerstvě destilována. Po odstranění tzv. předku bylo získáno čisté rozpouštědlo, které bylo uchováváno v zásobních lahvích za nepřístupu světla.

4.1.3 Perkolace

Rozdrobněný rostlinný materiál byl provlhčen stejným objemovým množstvím 96% ethanolu jako je navážka drogy v gramech, v uzavřené nádobě byl ponechán 2 hodiny. Poté byl vsypán do perkolátoru, ve kterém byl 96% ethanol do výšky asi 10 cm. Navlhčená droga byla do rozpouštědla vsypávána a slabě utlačována, současně byl přidáván 96% ethanol, až byla droga všechna vsypána. Potom byl překryt kotoučkem filtračního papíru a vatou, zalit rozpouštědlem, perkolátor byl zakryt, aby se rozpouštědlo neodpařovalo a byl ponechán se 24 hodin stát. Poté bylo perkolováno rychlostí 1/50 objemu naplněné části perkolátoru 96% ethanolem, až byl jímán sedminásobek hmotnosti drogy v mililitrech. Poté bylo ukončeno nalévání čistého rozpouštědla na sloupec a perkolátor byl vypuštěn.

4.1.4 Odpařování

Ethanolový perkolát byl zahuštěn na vakuové odparce za sníženého tlaku a teplotě do 40°C. Chloroformové výtřepky byly odpařovány stejným způsobem. V případě etheru bylo použito oddestilování na vodní lázni bez sníženého tlaku.

4.1.5 Tenkovrstvá chromatografie (TLC)

Tenkovrstvá chromatografie byla prováděna na komerčně vyráběných deskách (Silikagel 60 F254) v systému nasycených komor. Sycení komor probíhalo po nalití a mírném protřepání mobilní fáze minimalně 60 min. Látky byly nanášeny na chromatogram ve formě čárek podle zvoleného objemu (délka cca 1 cm) pomocí kalibrovaných kapilár Qualicolor. Po vyvinutí byl chromatogram vyjmut z komory a vysušen nejprve teplým vzduchem, potom studeným vzduchem. Poté byla provedena detekce, v první fázi pod UV lampou a v další fázi postříkem detekčním činidlem.

4.2 Potřeby

4.2.1 Rozpouštědla

Cyklohexan č.

Diethylether ČSL 4

Ethanol 96%, denaturovaný methanolem, č.

Chloroform č.

Methanol č.

Toluen č.

Voda

4.2.2 Chemikálie

Acetylcholinesterasa z elektrického úhoře (electric eel)

Amoniak 25% p.a.

Argon

Diethylamin č.

Dusičnan bismutitý p.a.

Fast blue B č.

Hovězí sérový albumin

Hydroxid sodný č.

Chlorid rtuťnatý č.

Jodid draselný č.

Kyselina chlorovodíková konc. 36% č.

Kyselina sírová konc. 96-98% č.

Kyselina vinná č.

1-Naftylacetát č.

Síran sodný bezvodý č.

TRIS

Uhličitan sodný bezvodý č.

Standardy: fysostigmin (Sigma), galanthamin (Sigma)

4.2.3 Detekční činidla

D1: Dragendorffovo činidlo modifikované podle Muniera

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

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

Zásobní roztok: byl připraven smísením roztoků A a B v poměru 1:1; může být uložen několik měsíců v chladničce.

Činidlo pro analýzu: bylo připraveno tak, že se k roztoku 5 g kyseliny vinné rozpuštěné v 50 ml vody přidalo 5 ml zásobního roztoku [16].

D2: Mayerovo činidlo

1,35 g chloridu rtuťnatého a 5 g jodidu draselného bylo rozpuštěno ve vodě a bylo jí doplněno do 100 ml [17].

D3: UV $\lambda = 254$ nm

Detekce chromatogramu pod UV lampou při vlnové délce 254 nm.

4.2.4 Vyvíjecí soustavy

S1: Toluén+chloroform+ethanol+diethylamin 70+20+10+3

S2: Chloroform+methanol+voda 65+35+5

4.2.5 Chromatografické adsorbenty

Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck)

4.3 Příprava sekvenčních extraktů

4.3.1 Materiál

Rostlinný materiál	Původ materiálu
Chelidonium majus L., nať (Ch-M/H)	Megafyt, sběr v Chorvatsku, Jugodrvu AD, 06/2004
Chelidonium majus L., kořen (Ch-M/R)	Megafyt, sběr v Chorvatsku, Jugodrvu AD, 08/2004
Eschscholzia californica CHAM., nať (E-C)	pěstovaná rostlina ze semen komerčně dostupných (Semptra), Markvartice u Sobotky, sběr 06-08/2005
Corydalis solida (L.) SW, nať (C-S)	sběr 25.4.2006, stráž na Kopci sv. Jana, Hr. Králové, plný květ
Papaver somniferum L., makovina (P-S)	Ing. Krásný, Dobruška, 09/2005

Tab. 1: *Název a původ rostlinného materiálu*

4.3.2 Extrakce drogy a zpracování extraktu

- *Příprava primárního extraktu* – Nejdříve byla provedena perkolace rostlinného materiálu (viz. 4.1.3 Perkolace). Poté bylo provedeno zahuštění na vakuové odparce za případného přidávání vody (20 ml). K odparku bylo následně přidáno 50 ml 1,5% kyseliny sírové a důkladně protřepáno. Bylo změřeno pH tohoto roztoku, muselo se pohybovat mezi pH 1-2. Roztok byl zfiltrován přes viskózní filtr, zbytek v baňce byl důkladně promyt s 20-25 ml 1% kyseliny sírové a filtrát byl doplněn vodou na 100 ml.

0,25 ml tohoto roztoku bylo v malé zkumavce upraveno na pH 2-3 (5% amoniakem nebo 1% uhličitanem sodným) a bylo přikápnuto několik kapek Mayerova činidla. Měl by vzniknout intenzivní žlutý zákal až sraženina signalizující přítomnost alkaloidů. Pokud sraženina nevznikla, pak droga alkaloidy neobsahovala a extrakt se dále nezpracovával.

- *Příprava výtřepku L* - 100 ml primárního kyselého extraktu bylo vytřepáno 4x25 ml éteru. Éterové vrstvy byly spojeny a vytřepány 2x5 ml chladné vody, vrstva byla ostře oddělena a éter byl oddestilován do zbytku několika mililitrů.

0,25 ml čistící vody bylo v malé zkumavce upraveno na pH 2-3 (7% kyselinou chlorovodíkovou) a bylo přikápnuto několik kapek Mayerova činidla. Pokud nevznikla sraženina nebo výraznější zákal, voda byla vylita, pokud vznikla, byla přidána vytřepávací voda k původnímu extraktu.

- *Příprava výtřepku A* – předčištěný kyselý roztok z předchozího vytřepání byl zalkalizován v třepačce 10% roztokem uhličitanu sodného na pH cca 8, zpravidla se vyloučí sraženina alkaloidů. Suspenze byla vytřepána 4x25 ml éteru, éterové vrstvy byly spojeny a odpařeny na několikamililitrový koncentrát. Koncentrát byl vytřepán 3x2,5 ml 1% kyseliny sírové, která rozpustí alkaloidy do formy solí. 7,5 ml tohoto kyselého roztoku bylo zalkalizováno

10% roztokem uhličitanu sodného a suspenze byla znovu vytřepána 3x2,5 ml éteru. Tím byla směs alkaloidů výrazně přečištěna.

- *Příprava výtřepku A1* - uhličitanový roztok po vytřepání éterem byl vytřepán 4x25 ml chloroformu. Vrstvy byly spojeny, oddestilovány na množství několika mililitrů a vytřepány 3x2,5 ml 1% kyseliny sírové, která rozpustí alkaloidy do formy solí. 7,5 ml tohoto kyselého roztoku bylo zalkalizováno 10% roztokem uhličitanu sodného a suspenze byla znovu vytřepána 3x2,5 ml chloroformu. Tím došlo k přečištění alkaloidů.
- *Příprava výtřepku B* - bazický roztok z předchozího vytřepání byl zalkalizován 50% roztokem hydroxidu sodného po kapkách na pH 12-12,5 a tento roztok byl vytřepán 4x25 ml éteru. Éterové vrstvy byly spojeny a vytřepány 2x5 ml chladné vody, vodová vrstva byla vylita, éterový roztok vysušen 3-5 g bezvodého síranu sodného.

0,5 ml alkalického roztoku bylo okyseleno několika kapkami 7% kyseliny chlorovodíkové a bylo přikápnuto několik kapek Mayerova činidla. Pokud vznikla sraženina nebo výraznější zákal, zpracovával se extrakt dále, pokud nikoliv, další postup se už neprováděl.

- *Příprava výtřepku J* - bazický louhový roztok z předchozího vytřepání byl zneutralizován 17% kys. chlorovodíkovou na pH 3-3,5, přidal se roztok 3 g jodidu draselného ve 3 ml vody a po 3 hodinách stání byl vytřepán 4x25 ml chloroformu. Chloroformové fáze byly vysušeny bezvodým síranem sodným.
- *Příprava výtřepku E* - kyselý roztok z předchozího vytřepání byl odebrán do zkumavky v malém množství, okyselen 2M kyselinou chlorovodíkovou a bylo přikápnuto Mayerovo činidlo. Pokud vznikl zákal, pak byl celý roztok zalkalizován 25% amoniakem na pH cca 10 a vytřepán se 4x25 ml chloroformu. Chloroformové fáze byly vysušeny bezvodým síranem sodným.

Závěrečná úprava výtřepků před provedením TLC testů – zahuštěné odparky jednotlivých výtřepků byly kvantitativně převedeny do injekčních ampulek, do kterých byla zavedena Pasteurova pipeta a na mírně teplé vodní lázni bylo odpařeno rozpouštědlo. Ampulky byly sušeny ve vakuovém exsikátoru cca 12 hodin nad suchým silikagelem. Po usušení byly ampulky zváženy, naplněny argonem, zataveny a do doby zpracování uchovávány ve tmě při 4°C.

Označení materiálu	Hmotnost drogy [g]	Výtřepek											
		L		A		A1		B		J		E	
		[g]	[%]	[g]	[%]	[g]	[%]	[g]	[%]	[g]	[%]	[g]	[%]
Ch-M/H	100	0,1514	0,1514	0,0859	0,0859	0,0262	0,0262	0,0461	0,0461	0,0364	0,0364	-	-
Ch-M/R	28	0,1066	0,3807	0,0500	0,1786	0,0057	0,0204	0,0179	0,0639	-	-	-	-
E-C	100	0,2079	0,2079	0,1591	0,1591	0,4447	0,4447	0,0120	0,0120	0,7861	0,7861	0,0792	0,0792
C-S	30	0,1514	0,5047	0,0859	0,2863	0,0262	0,0873	0,0461	0,1537	0,0364	0,1213	-	-
P-S	100	0,0391	0,0391	0,0027	0,0027	-	-	0,0029	0,0029	-	-	-	-

Tab. 2: Hmotnost a procentuální zastoupení jednotlivých výtřepků drog

4.3.3 Bioautografická metoda

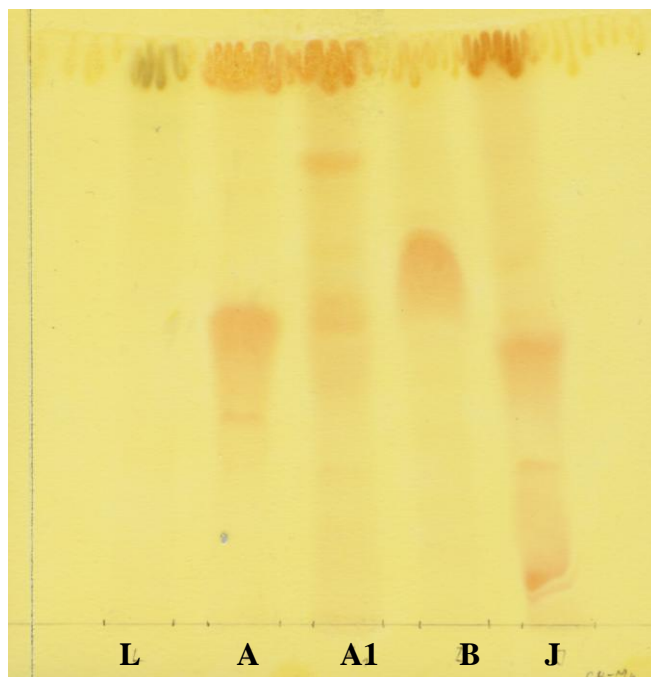
Z jednotlivých výtřepků bylo odebráno 5 mg vzorku a rozpuštěno v 0,25 ml chloroformu a přidáno 0,25 ml ethanolu (u extraktů *Papaver somniferum* nebylo bohužel dostatečné množství vzorků, byla proto úměrně provedena korekce množství rozpouštědel). Standardy byly rozpuštěny v ethanolu, galanthamin na koncentraci 1 mg/10 ml a fysostigmin na koncentraci 0,1 mg/10 ml. AChE z elektrického úhoře byla rozpuštěna v 150 ml 0,005M pufru TRIS – kyselina chlorovodíková o pH 7,8. K tomuto roztoku byl přidán hovězí krevní albumin (150 mg) za účelem stabilizace enzymu během biologické zkoušky [18].

Na start TLC chromatogramu byly nanášeny roztoky výtřepků o objemu 5 µl (E - C, Ch - M/R, C - S) či 10 µl (P - S, Ch - M/H) ve formě

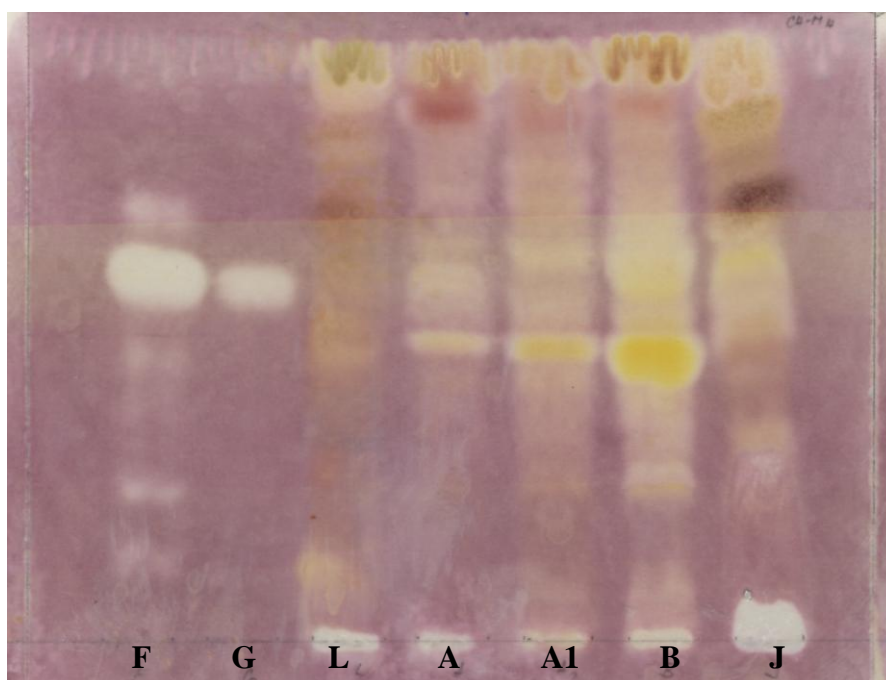
čárek. Pro porovnání byly nanесeny i roztoky standardů, o objemu 10 μ l. Chromatogramy byly vyvíjeny v soustavě S2. Po vyvinutí byly osušeny nejdříve teplým, poté studeným vzduchem. Následně se provedl nástřik AChE, chromatogramy se mírně vysušily a inkubovaly se v komoře prostoupené vodními parami při 37°C po dobu 20 min. Po uběhnutí doby inkubace se chromatogramy postříkly detekčním činidlem, vzniklým smísením roztoku 1-naftylacetátu (koncentrace 250 mg/100 ml ethanolu) a roztoku Fast Blue B (koncentrace 400 mg/160 ml vody) v poměru 1:4 [18].

5. VÝSLEDKY

5.1 *Chelidonium majus* L., nat' (Ch-M/H)



Obr.1: Ch-M/H, S2, D1

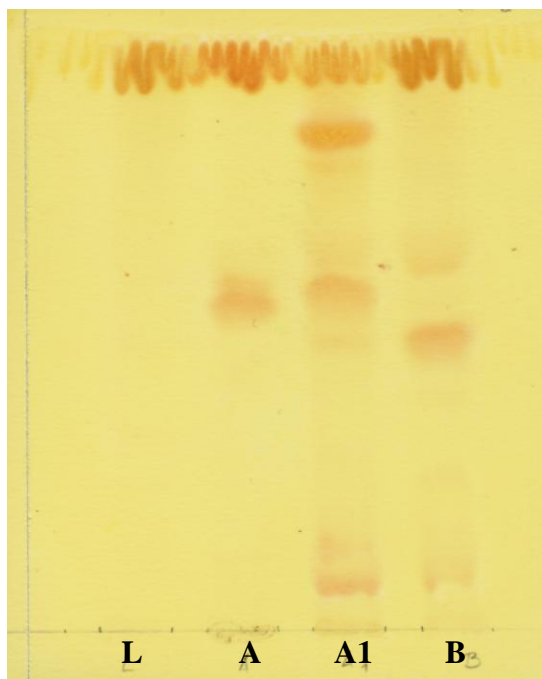


Obr.2: Ch-M/H, S2, Acetylcholinesterasa

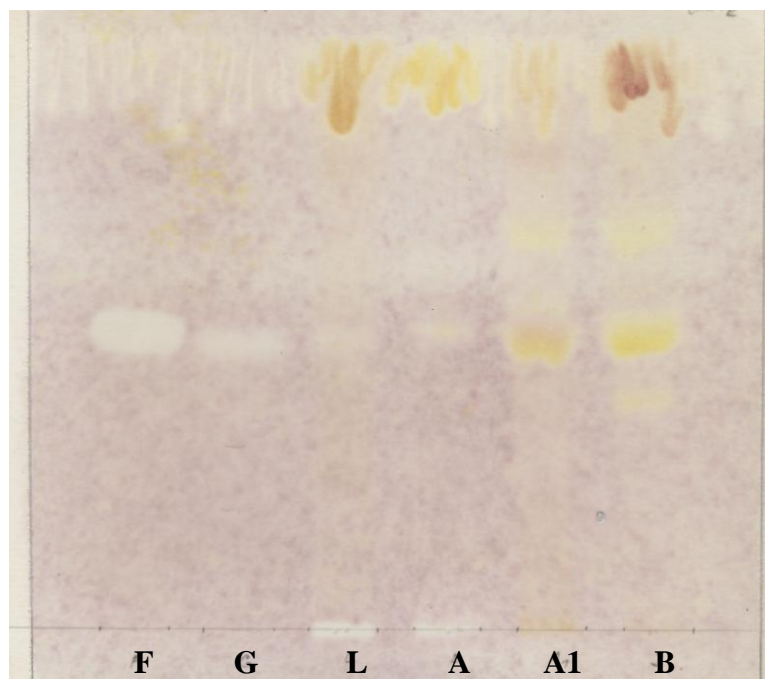


Obr. 3: Ch-M/H, S1, D1

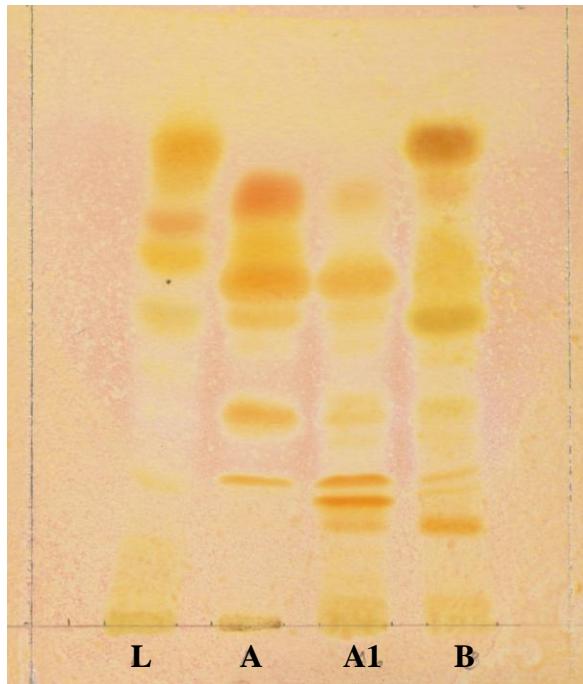
5.2 *Chelidonium majus* L., kořen (Ch-M/R)



Obr. 4: Ch-M/R, S2, D1

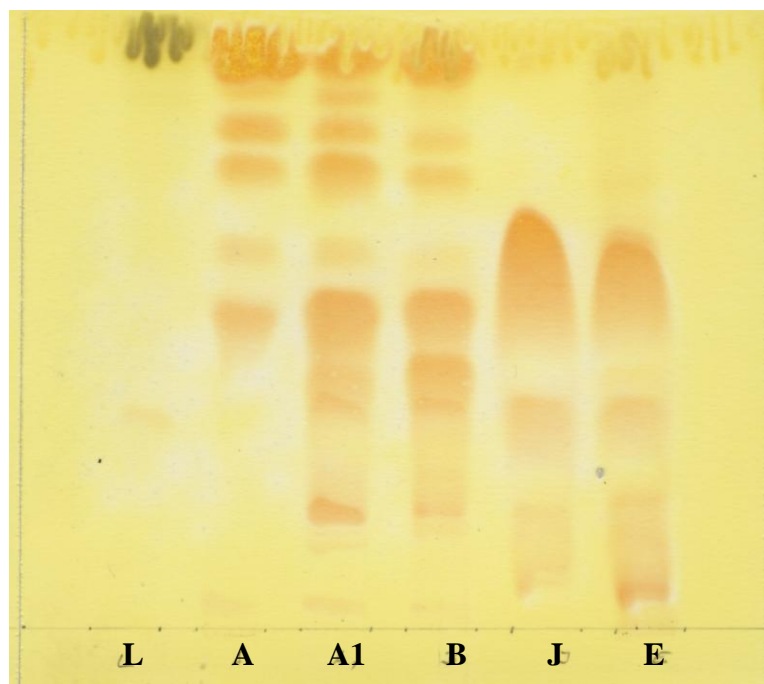


Obr. 5: Ch-M/R, S2, Acetylcholinesteras

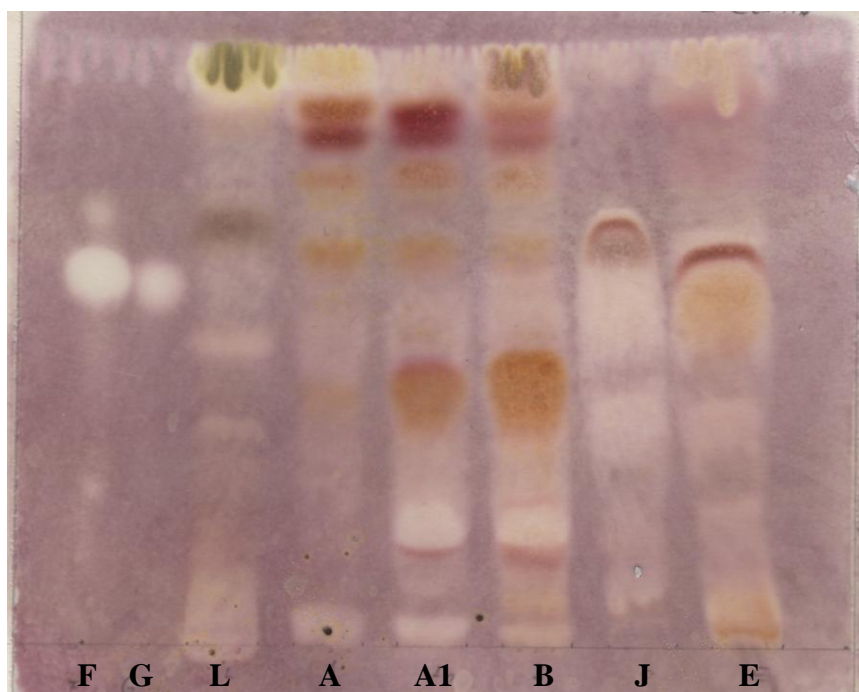


Obr. 6: Ch-M/R, S1, D1

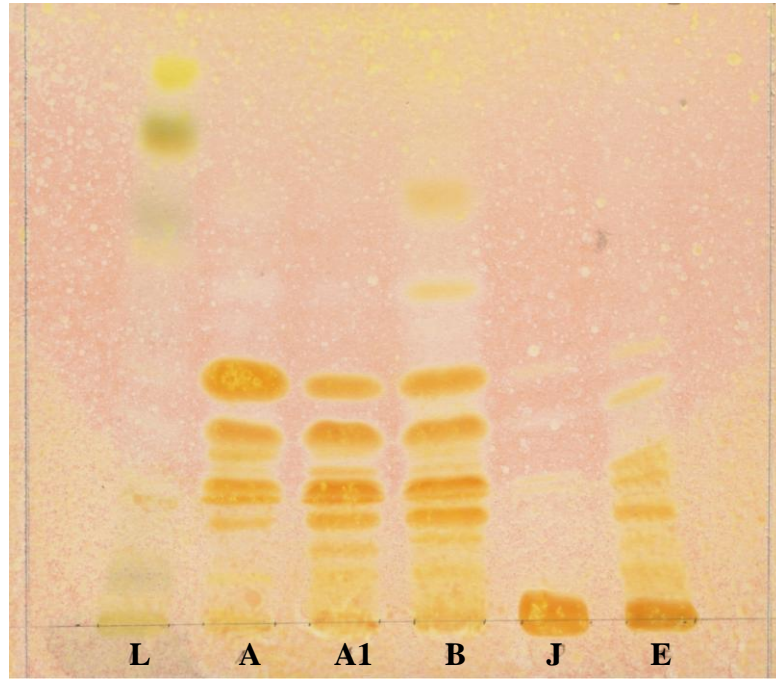
5.3 *Eschscholzia californica* CHAM., nat' (E-C)



Obr. 7: E-C, S2, D1

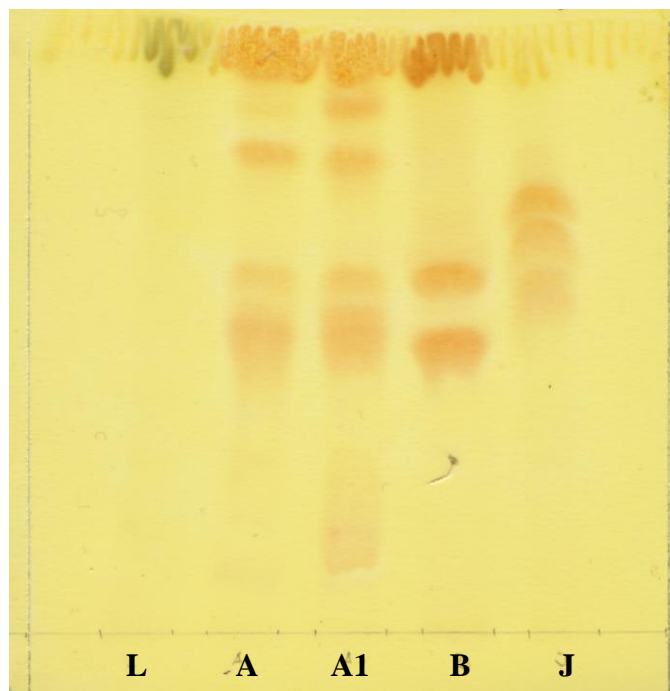


Obr. 8: E-C, S2, Acetylcholinesteras

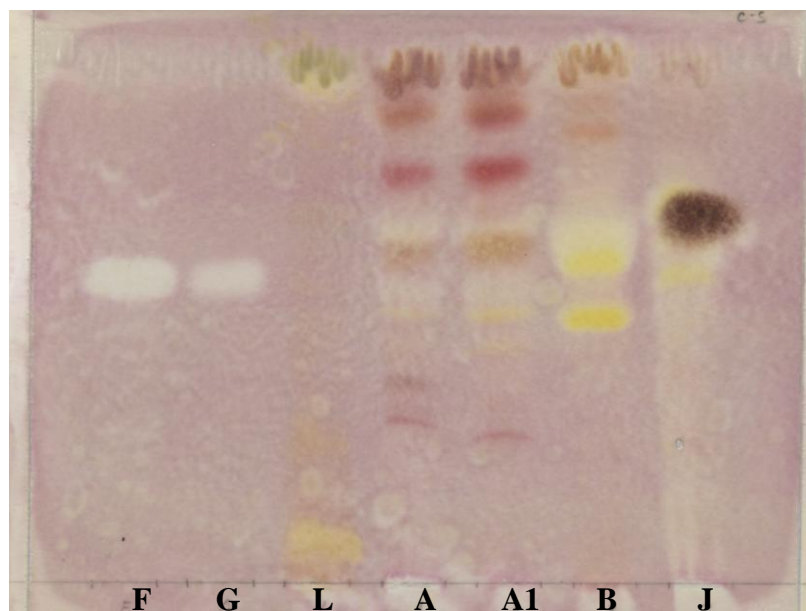


Obr. 9: E-C, S1, D1

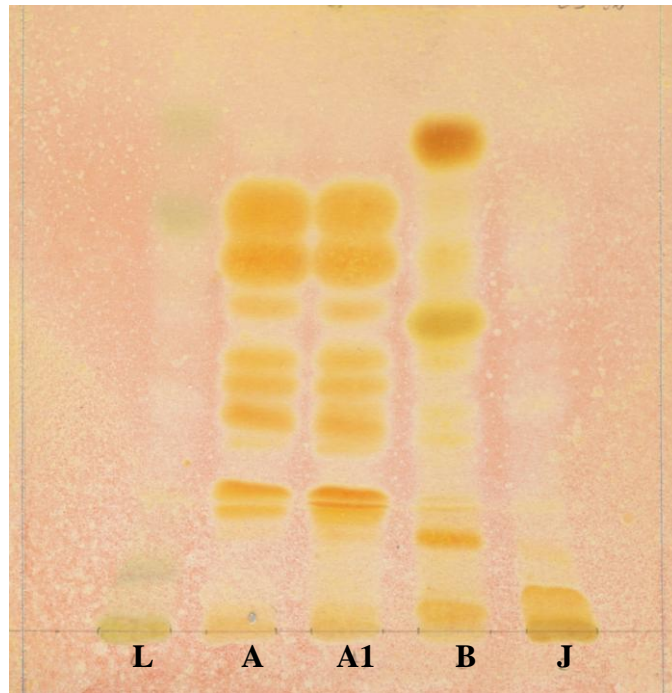
5.4 *Corydalis solida* (L.) SW., nat' (C-S)



Obr. 10: C-S, S2, D1

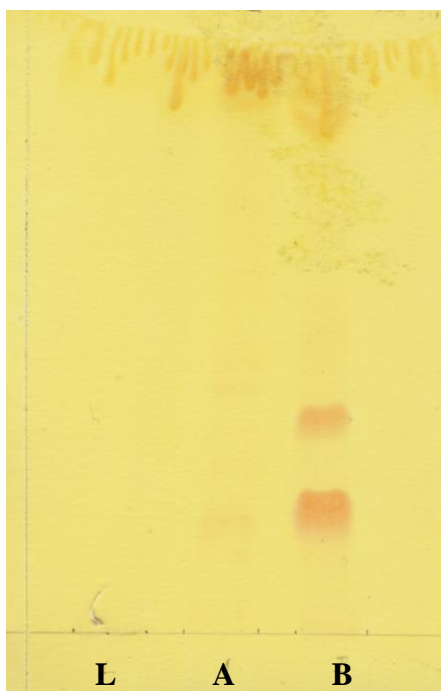


Obr. 11: C-S, S2, Acetylcholinesteras

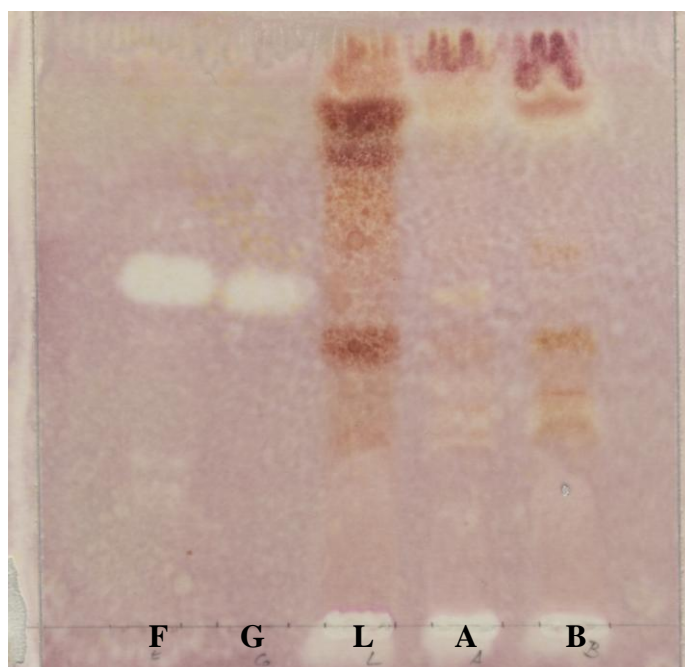


Obr. 12: C-S, S1, D1

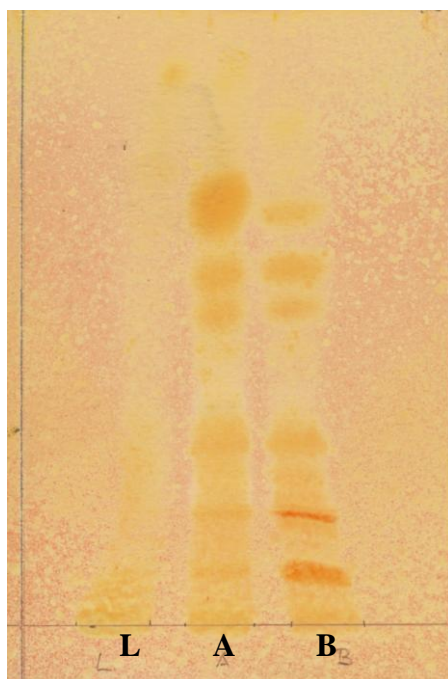
5.5 *Papaver somniferum* L., makovina (P-S)



Obr. 13: P-S, S2, D1

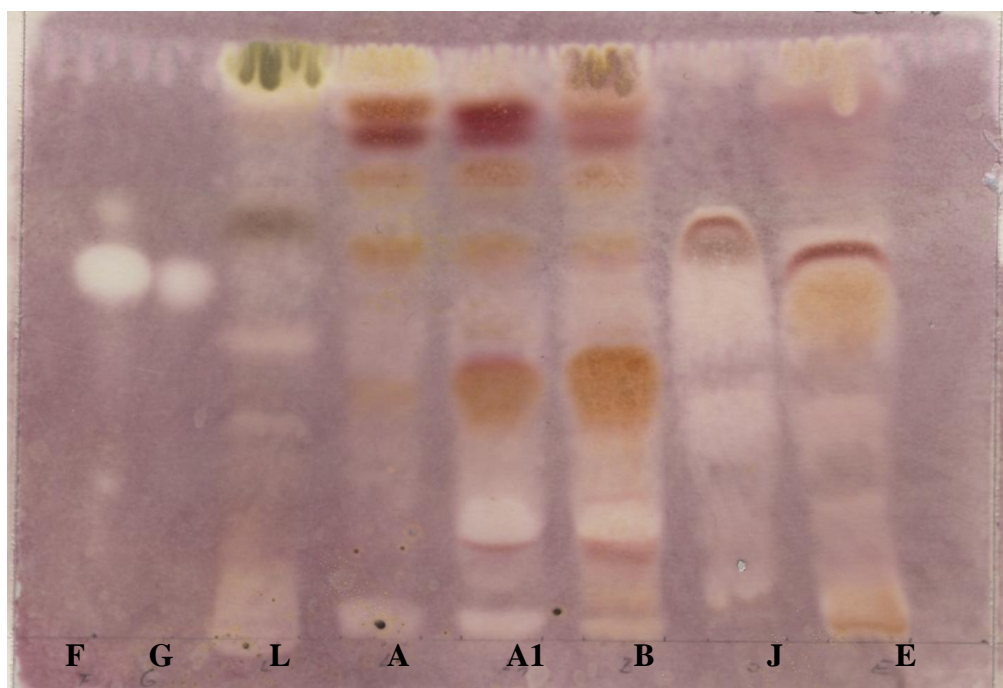


Obr. 14: P-S, S2, Acetylcholinesteras

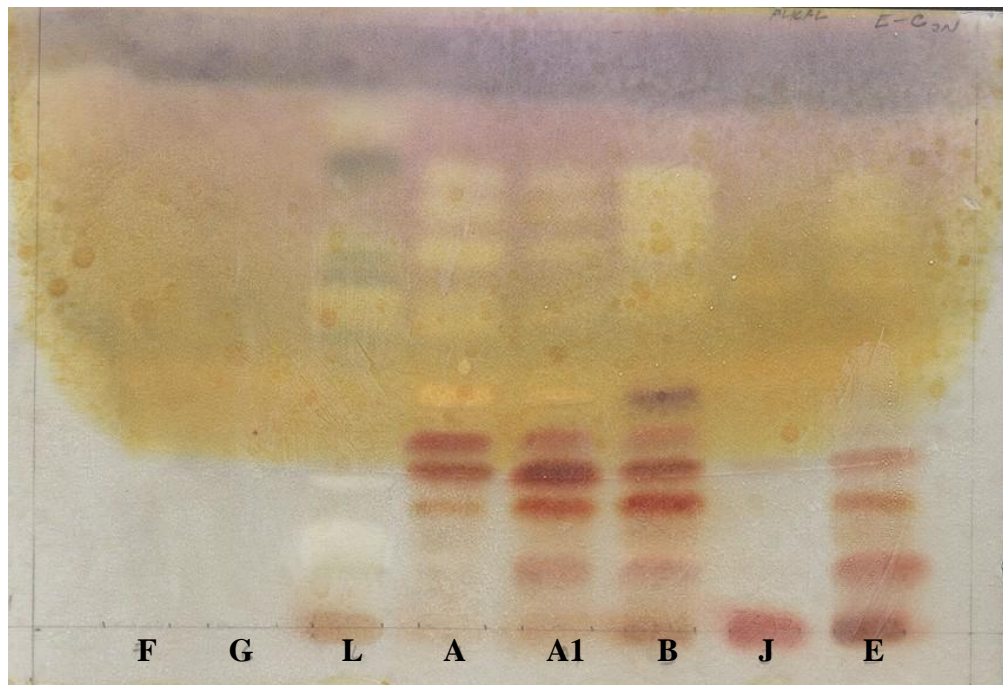


Obr. 15: P-S, S1, D1

5.6 Srovnání bioautografické metody v neutrální (S2) a bazické (S1) vyvíjecí soustavě



Obr. 16: E-C, S2, Acetylcholinesterasa



Obr. 17: E-C, S1, Acetylcholinesteras

5.7 Přehled počtu inhibitorů AChE v jednotlivých výtřepcích

Označení materiálu	Počet bílých skvrn na výtřepk					
	L	A	A1	B	J	E
Ch-M/H	1	2	2	2	1	-
Ch-M/R	2	3	1	1	-	-
E-C	0	1	2	1	2	1
C-S	0	1	1	2	1	-
P-S	1	1	-	1	-	-

Tab. 3: Počet pozitivních inhibičních reakcí na AChE v jednotlivých výtřepcích

6. DISKUSE

Studium látek (potenciálních léčiv), které jsou schopné prakticky (terapeuticky) ovlivnit průběh Alzheimerovy choroby (na různých úrovních patofyziologie tohoto procesu) je velmi živé. Jsou hledána nejen zcela nová syntetická léčiva, ale také látky přírodního typu. Tato snaha je zcela pochopitelná, protože prakticky existuje jen velmi málo reálných léčiv (ať už používaných, nebo potenciálních): donepezil, rivastigmin, galanthamin, huperzin A (takrin je v současnosti látkou už prakticky neuvažovanou).

Z hlediska přírodních látek je k dispozici relativně široká skupina sloučenin, které v testech *in vitro* vykazují inhibici AChE, jak bylo uvedeno v mé teoretické části. Pokud bychom však uvažovali o jejich praktickém využití, převážná většina z nich bude nepoužitelná (nízká biologická dostupnost, nebo nutná vysoká dávka, po které se objeví ovlivnění jiných metabolických systémů a tím nezanedbatelné vedlejší účinky, současně velká finanční náročnost při jejich získávání z přírodního materiálu atd.). Je nápadné, že nemalá část spektra potenciálních léčiv je představována terciárními alkaloidy. Z toho lze do jisté míry usuzovat, že alkaloidy, které jsou obecně látkami farmakologicky aktivními, budou projevovat svůj účinek i v této oblasti.

Tato práce je zahájením širšího fytochemického screeningu zahájeného na katedře farmaceutické botaniky a ekologie, jehož cílem je sledování různých alkaloidů rostlin na aktivitu (inhibici) AChE za pomoci jednoduchého testu využívajícího tenkovrstvou chromatografii. Takový postup je ideální: snažila jsem se, aby umožnil relativně rychle a z malého množství rostlinného materiálu určit alkaloidní frakci, která je v tomto směru aktivní. Sledování alkaloidů bylo vybráno ze dvou důvodů. Je známo, že někteří zástupci z čeledí Papaveraceae a Fumariaceae obsahují alkaloidy, které jsou aktivní z hlediska inhibice AChE (a proto jsem také tuto studii začínala s některými taxony z těchto čeledí). Alkaloidy (alespoň sekundární a terciární) jsou látkami, které je možné z celého komplexu primárních a sekundárních metabolitů

relativně dobře vyčistit na rozdíl např. od terpenů, fenolových glykosidů a dalších, převážně neutrálních látek.

Při řešení otázky, jaký postup použít pro frakcionaci těchto bazických látek jsem měla dvě možnosti:

1. připravit z malého množství rostlinné drogy (1-3 g) sumární extrakt, ten nanést na TLC, za použití vhodné soustavy extrakt rozdělít na deskách silikagelu a provést barevnou reakci,
2. připravit extrakt z většího množství drogy (50-200 g suchého materiálu) - nejlépe perkolát (perkolace je prakticky z technologického hlediska vůči metabolitům nejšetnější) - extrakt zahustit, převést do vodného prostředí a sekvenčně (při různém pH) vytřepat; v jednotlivých výtřepcích jsou alkaloidy různého charakteru.

Pro tuto studii jsem zvolila druhý postup: má jistou nevýhodu v nutnosti zpracovat větší množství drogy, jednotlivé alkaloidní směsi lze však převáděním z bazí na soli (pH ~9 a pH ~2) velmi úspěšně čistit, odstranit tak látky nealkaloidní, které by mohly dávat případné falešné reakce na inhibici AChE. Tento náročnější postup jsem zvolila také proto, že jedním z cílů mé diplomové práce bylo navrhnout postup izolace účinných alkaloidů, což by při volbě předcházející metody nebylo možné.

Pro separaci alkaloidní směsi jsem zvolila rámcový postup, který použila skupina prof. B. Slavíka (Masarykova univerzita Brno) při systematickém studiu isochinolinových alkaloidů rostlin z čeledí Papaveraceae a Fumariaceae a který používala od začátku 60. let minulého století v rozsáhlé řadě studií publikovaných v časopise Collection of the Czechoslovak Chemical Communications. Postup, který se mi zdál optimální pro dělení alkaloidní směsi zahrnuje následující kroky:

- a) přípravu extraktu vhodnou extrakční metodou za použití nízkomolekulárního alkoholu (zvolila jsem ethanol),

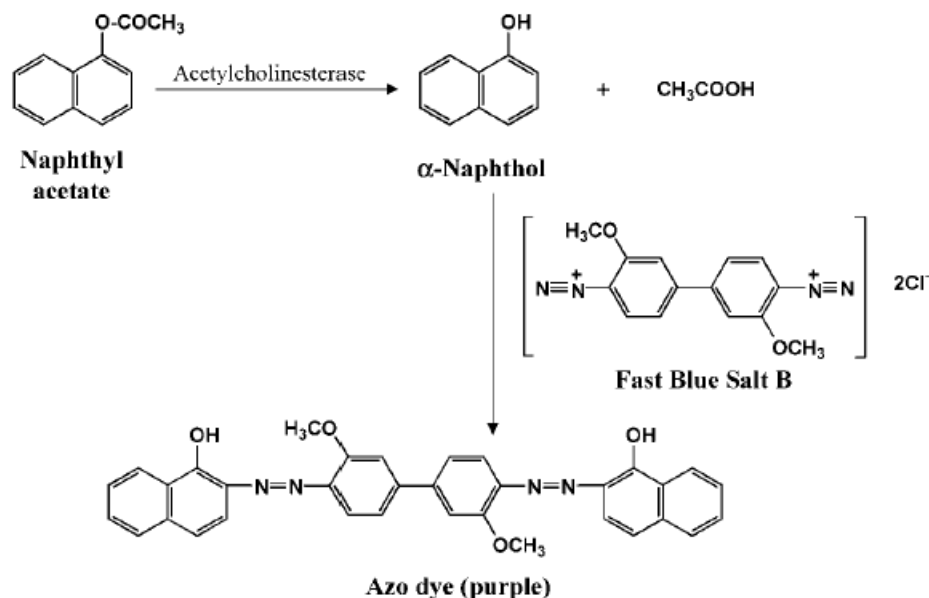
- b) zahuštění extraktu, rozpuštění (dispergování) odparku v 1% kyselině sírové a vodě (pH ~2), filtrace přes křemelinu,
- c) vytřepání kyselého roztoku diethyletérem (L), který extrahuje velmi málo bazické alkaloidy a různé zbylé znečištěniny; při tomto postupu se může stát, že do diethyletheru přejdou i alkaloidy, které jsou bazičtější, a proto je nutné organickou fází znova vytřepat 1% kyselinou sírovou, zjistit srážecí reakcí (Mayerovým činidlem), zda tento vodný kyselý roztok obsahuje alkaloidy. Pokud je obsahuje, přidává se tato vodná fáze zpět k původnímu vodnému extraktu,
- d) po předchozím přečištění diethyléterem se vodný extrakt zalkalizuje 10% roztokem uhličitanu sodného na pH ~9, vyloučí se terciární alkaloidní baze, které se vytřepou do diethyléteru (A); tento odparek obsahuje alkaloidy schopné tvořit jak nerozpustné pseudokyanidy, tak alkaloidy, které tyto pseudo-soli netvoří (v této první fázi screeningu jsem dělení na obě skupiny nepoužívala),
- e) uhličitanový roztok se vytřepe chloroformem (A1); tento extrakt obsahuje středně bazické alkaloidy rozpustné v chloroformu,
- f) vodný extrakt se opatrně zalkalizuje 50% roztokem hydroxidu sodného a vytřepe několikrát diethyletherem (B); takto lze do organického rozpouštědla získat alkaloidy velmi bazické (např. berberin, koptisin),
- g) zbylý vodný extrakt (je-li srážecí s Mayerovým činidlem pozitivní) se okyslí 17% kyselinou chlorovodíkovou na pH ~3, přidá se nasycený roztok jodidu draselného (celková koncentrace v extraktu 2-4 %) a po 1 hodině se vytřepe chloroformem (J), ve kterém jsou tyto „kyselé“ kvarterní jodidy rozpustné,
- h) pokud vodný extrakt obsahuje dále alkaloidy, pak se zalkalizuje 25% amoniakem na pH ~9-10 a vytřepe se buď chloroformem (E) (pokud se vrstvy špatně dělí, pak se použije

směs chloroform-ethanol 95% 9:1). Po tomto postupu je primární extrakt zpravidla dokonale zbaven alkaloidů, a není potřeba používat další (v tomto případě reineckátovou srážecí) metodu.

Jednotlivé typy výtřepků je možné dále velmi účinně čistit převáděním z formy baze do formy soli podle příslušného pH (případně s přídavkem jodidu draselného), čímž se poměrně dokonale odstraní nežádoucí znečištěniny, které by ztěžovaly separační proces na TLC.

Při výběru metody pro TLC screening vlivu alkaloidů na AChE jsem uvažovala o jedné ze dvou metod:

- a) modifikované Ellmanově metodě [19], která sleduje dva typy extraktů: ethyl-acetátový (TLC soustava toluen-ethyl-acetát-methanol 30:8:1) a vodný (soustava ethyl-acetát-methanol-voda 100:13,5:10); desky jsou po vysušení postříkány roztokem acetylthiocholinjodidu a 5,5'-dithiobis[2-nitrobenzoové kyseliny] a po vysušení se postříká roztokem AChE z elektrického úhoře (TRIS, pH 8, inkubace 3-5 min. 37 °C). Vznikají bílé skvrny na žlutém podkladě, nebo
- b) bioautografické metodě [18], využívající také vzniku azobarviva: TLC desky se po nanesení všech výtřepků vyvinou v soustavě chloroform-methanol-voda 65:35:5 (nebo jiné vhodné soustavě), postříkají roztokem AChE, inkubují ve vlhkém prostředí (pH ~8, TRIS pufr, 37 °C, 20 min) a postříkají směsí roztoků 1-naftyl-acetátu a Fast Blue B Salt; po 2-5 min. dochází k barevnému zviditelnění: na světle fialové (fialovém) podkladu zůstávají bílé skvrny označující aktivní látky. Mechanismus reakce je následující:



Obr. 18: Reakce AChE s 1-naftylacetátem a podstata tvorby fialového azobarviva u TLC bioautografické metody

Pro tuto práci jsem vybrala metodu b), protože s ní byla na pracovišti určitá zkušenost a také proto, že průběh reakce byl výraznější než u metody předešlé. Je však nutno říci, že tato metoda je na provedení citlivá: použitá AChE musí mít aktivitu min. 3 U/ml, inkubace musí probíhat v prostředí vodních par v rozmezí teplot 35-37 °C a 1-naftyl-acetát, použitý pro přípravu činidla musí být uchováván při -22 °C, jinak je vybarvení chromatografické desky málo zřetelné.

Pro vlastní screening byla provedena nanáška 5 μ l nebo 10 μ l zásobního roztoku extraktů (10 mg/1 ml zásobního roztoku) a 10 μ l roztoků standardů (fysostigmin, galanthamin; 0,1 mg/1 ml zásobního roztoku; R_f hodnoty obou standardních alkaloidů jsou bohužel v použité soustavě prakticky stejné); tyto objemy, které se ukázaly jako optimální, byly zjištěny v předpokusech. Standardy alkaloidů byly nanášeny z důvodu porovnání relativní intenzity skvrn. Desky pro inkubaci AChE byly vyvíjeny v neutrální soustavě (S2). Zároveň byla na jiných deskách provedena detekce Dragendorffovým čindilem (D1), aby bylo možné provést porovnání.

Chelidonium majus – nat’: téměř u všechny typů výtřepků je jasná pozitivní reakce na startu (obrázek č. 2): takto mohou reagovat kvartérní alkaloidní baze. Není však pravděpodobné, že by se kvartérní baze vyskytovaly ve výtřepcích A a B. Ve výtřepcích (L, A, A1, B, J) je patrná pozitivní reakce – více bělavých skvrn, což odpovídá údajům z literatury, které hovoří o alkaloidních látkách ovlivňujících AChE. Za inhibiční aktivitu na AChE jsou dle literatury zodpovědny především benzofenanthridinové (chelidonin, sanguinarin) a protoberberinové (berberin) alkaloidy [18, 20, 21, 22]. O jaké alkaloidy by se mohlo jednat, však není možné ani obrysově určit: vlašovičník obsahuje až 33 alkaloidů, jejich spektrum je v rostlinách z různých geografických podmínek rozličné (v závislosti na ploidii) a já jsem při svém hodnocení neměla k dispozici jednotlivé látky jako standardy. Jsem však přesvědčena, že i kdybych tyto standardní látky měla, těžko by bylo možné jednoznačně tvrdit, že se jedná o určitý alkaloid, protože sumární výtřepky byly ještě do určité míry znečištěny a mohlo by dojít k posunu R_f hodnot standardních látek.

Chelidonium majus - kořen: v tomto případě jsou patrné prakticky jen 2 látky ovlivňující AChE ($R_f \sim 0,5-0,7$). Je zvláštní, že reakce nebyla příliš průkazná (obr. 5): literatura uvádí [9], že převaha alkaloidů je právě v kořenech (a dokládá to také obrázek č. 6), reakce s AChE však nebyla příliš přesvědčivá, jsem však přesvědčena, že je to v tomto případě vlivem experimentálních podmínek a této rostlinné části by měla být věnována určitě další pozornost.

Eschscholtzia californica – nat’: obsahuje v různých typech výtřepků prakticky stejné alkaloidy (obr. 9) (ale možná, že se to jenom na TLC tak jeví). Nejmarkantnější je reakce u výtřepků (A a B). Literatura bohužel neuvádí, že by obsažené alkaloidy vykazovaly inhibiční aktivitu na AChE.

***Corydalis solid* – nat'**: je na alkaloidy bohatá (obr. 12), vyskytuje se u ní však stejný problém jako v předešlém případě (výskyt zdánlivě stejných látek v různých typech výtřepků), který si dosud nedovedu vysvětlit. Z hlediska vlivu na AChE je poměrně neaktivní, jistou aktivitu vykazují látky ve výtřepcích (A, A1, B, J)(obr. 11). Při studiu literatury vyšlo najevo, že protopinové a protoberberinové alkaloidy obsažené v nati tohoto druhu (především berberin, protopin) jsou velmi silnými inhibitory AChE [23, 24].

***Papaver somniferum* – makovina**: ačkoliv tato odpadová surovina z pěstování olejného máku alkaloidy obsahovala (sumární obsah alkaloidů, resp. hmotnost nečištěného alkaloidního komplexu terciárních bazí však byl nízký, ~0,3 %), jejich aktivita na AChE byla zanedbatelná (obr. 14) (s výjimkou pozitivní reakce na startu u jednotlivých nanášek). Ani v literatuře neexistuje údaj, že by tyto alkaloidy nějakým způsobem AChE a BuChE ovlivňovaly.

Provedla jsem také pilotní porovnání dvou soustav pro TLC: neutrální a bazické. Neutrální soustava nemusí v případě alkaloidů (a často to tak bývá) alkaloidní směs dobře dělit. Vhodnější bývají u méně polárních mobilních fází přísady bazických látek, které sníží disociaci a alkaloidy se pohybují jako baze. Na příkladu výtřepků z nati *Eschscholtzia californica* jsem zjistila, že bazická soustava skutečně lépe (dokonaleji) směs dělí a zároveň je možné po dobrém odvětrání vrstvy použít reakci s AChE, aniž by došlo k její inaktivaci (tento enzym je citlivý na pH, velmi dobře funguje v oblasti pH 7,8-8,1) alkalickým diethylaminem, používaným do soustavy, ačkoliv byla tato alkalizační přísada i po 10min. odvětrávání v proudu studeného vzduchu ještě z vrstvy slabě cítit. Rozdělená alkaloidní směs reagovala v podstatně širším měřítku než při použití neutrální soustavy.

Výsledky své diplomové práce bych shrnula takto:

- 1) bioautografická metoda využívající na TLC barevné reakce s 1-naftylaminem a Fast Blue B Salt je vhodná a dobře použitelná,

- 2) pro bližší studium se jako vhodné ukazují taxony *Chelidonium majus* (nať, kořen) a *Eschscholtzia californica* (nať) a to výtřepky A a B (možná i L, který ve vyšším obsahu resp. nanášce poskytne reprezentativnější výsledek),
- 3) použít vždy soustavu jak neutrální, tak bazickou (které budou vybrány z předběžného studia chromatografického chování extraktů),
- 4) na základě velmi dobře vypracované TLC se pokusit o denzitometrickou kvantifikaci jednotlivých skvrn,
- 5) pro další studium tohoto typu nemá smyslu sledovat aktivitu výtřepků s obsahem kvarterních jodidů: tyto látky nepřecházejí přes hematoencefalickou bariéru a jejich účinek je v živém biologickém systému prakticky nulový.

7. SOUHRN

V rámci diplomové práce byl proveden screening látek alkaloidní povahy z některých zástupců čeledí Papaveraceae a Fumariaceae na inhbiči acetylcholinesterázy (AChE). Byla vypracována metoda získání optimálních extraktů (alkaloidních koncentrátů určitého typu) z morfologických částí rostlin *Chelidonium majus* L. (nať, kořen), *Eschscholtzia californica* CHAM. (nať), *Corydalis solida* (L.) Sw. (nať) a *Papaver somniferum* L. (makovina).

Po přípravě primárního extraktu, jeho okyselení a předčištění byly připraveny po alkalizaci (Na_2CO_3 , NaOH) výtřepky diethyletherem (L, pH ~2; A, pH ~9; B, pH ~12) a chloroformem (jodidy kvarterních bazí (J, pH ~3; E, pH ~9). Jednotlivé typy výtřepků byly sledovány pomocí TLC v neutrální a bazické soustavě na silikagelu na obsah alkaloidů (Dragendorffovo činidlo). Výtřepky s obsahem alkaloidů byly dále podrobeny zjištění inhibiční aktivity na AChE pomocí autobiografické metody spolu se standardy (fysostigmin, galanthamin) s použitím TLC (silikagel, neutrální vyvíjecí soustava). AChE pocházela z elektrického úhoře (electric eel), pro barevnou reakci byl zvolen 1-naftylacetát a Fast Blue B Salt; výsledkem pozitivní reakce byly bílé zóny na fialovém pozadí.

Ve všech sledovaných vzorcích rostlinného materiálu byla prokázána přítomnost inhibitorů AChE, kteří vykazovaly různý stupeň aktivity. Pro další studium (izolaci účinných látek) však mají význam pouze taxony *Chelidonium majus* L. (nať, kořen) a *Eschscholtzia californica* CHAM.

8. SUMMARY

Nováková, J.: Biological activity of plant metabolites VII. Influence of alkaloids from several taxons of plants on acetylcholinesterase. Diploma thesis. Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, 2007. p. 78.

Within the frame of diploma thesis the screening of alkaloids from some taxons of Papaveraceae and Fumariaceae families for the inhibition of acetylcholinesterase (AChE) was performed. The method was elaborated for obtaining optimum extracts (alkaloid concentrates explicit type) from morphological parts of following plants: *Chelidonium majus* L. (herb, roots), *Eschscholtzia californica* Cham. (herb, whole plants resp.), *Corydalis solida* (L.) Sw. (herb) and *Papaver somniferum* L. (poppyhead).

After preparation of basic extract, and after its acidification and purification water extracts were prepared after pH adjustment (Na_2CO_3 , NaOH) by extraction with diethylether (L, pH ~2; A, pH ~9; B, pH ~12) and chloroform (iodides of quarternary bases (J, pH ~3; E, pH ~9). Individual extracts were analysed by the using of TLC in neutral and basic system on silica gel on content of alkaloids (Dragendorff reagent, Munier modification). Extracts with alkaloid content were further tested for inhibitory activity on AChE by the means of autobiographical method together with standards (physostigmine, galanthamin) using TLC (silica gel, neutral developing system). AChE originated from electric eel, for coloured response were used 1-naphthyl-acetate and Fast Blue B Salt; as the results of positive response were white zones on violet background.

In all monitored plant material samples was proven presence of inhibitors AChE, that exhibited different activity level. However, only taxons *Chelidonium majus* L. (herb, roots) and *Eschscholtzia californica* Cham.(whole plant) are prospective for further study (isolation of active alkaloids).

Keywords: plants, alkaloids, acetylcholinesterase inhibition, TLC, bioautographic method, *Chelidonium majus* L., *Eschscholtzia californica* Cham., *Corydalis solida* (L.) Sw., *Papaver somniferum* L.

9. LITERATURA

- [1] Svaz pacientů České republiky. *Homocystein: je společným klíčem k civilizačním chorobám?* 1.1.2005, [cit. 2006-13-11]. <<http://www.pacienti.cz/clanek.php?id=37>>
- [2] PYDYCHOVÁ, E.: *Alzheimerova nemoc*. Solutio. 2002/2003, [cit. 2007-12-12]. <<http://www.medon-solutio.cz/main.php?>>
- [3] JIRÁK, R. – KOUKOLÍK, F.: *Demence: neurobiologie, klinický obraz, terapie*. 1. vyd. Praha: Galén, 2004. s. 335.
- [4] JOKEŠOVÁ, J.: *Alzheimerova nemoc*. Pharma news. Praha: Skip Servis, **2005**. Vychází jednou za dva měsíce.
- [5] HOLMEROVÁ, I. – JANEČKOVÁ, H. – VAŇKOVÁ, H. – VELETA, P.: Nefarmakologické přístupy v terapii Alzheimerovy demence a praktické aspekty péče o postižené. *Psychiatrie pro praxi*, **2005**, s. 180-182.
- [6] JIRÁK, J.: Současné trendy v biologické terapii Alzheimerovy choroby. *Psychiatrie pro praxi*, **2006**, s. 8-11.
- [7] HOUGHTON, P.J. - HOWES M.-J.: Natural Products and Derivatives Affecting Neurotransmission Relevant to Alzheimer's and Parkinson's Disease. *Neurosignals*, **2005**, s. 6-22.
- [8] BALOUN, J. – JAHODÁŘ, L. – LEIFERTOVÁ, I.: *Rostliny způsobující otravy a alergie*. 1. vyd. Praha: Avicenum, 1989. s. 276.
- [9] BLASCHEK, W. - EBEL, S. - HACKENTHAL, E. - HOLTZGRABE, U. - KELLNER, K. - REICHLING, J. - SCHNETZ, V. et al.: *Hager ROM 2006: Hager's Handbuch der Drogen und Arzneistoffe*. Springer & Info II Uni. Wurzburg, Wurzburg 2006.
- [10] HEJNÝ, S. – SLAVÍK, B.: *Květena České republiky* 1. 2. vyd. Praha: Academia, 1997. s. 557.
- [11] KUBÁT, K.: *Klíč ke květeně České republiky*. 1. vyd. Praha: Academia, 2002. s. 927.
- [12] ITO, Ch. – ITOGAWA, M. – TOKUDA, H.: Chemopreventive activity of isoquinoline alkaloids from *Corydalis* plants. *Planta Medica*, 2001, s. 473-475.

- [13] SOJI, Y. – KADOKAWA, T. – MASUDA, Y.: Influence of Corydalis alkaloid upon the gastric ulcer in experimental animals. *Nippon Yakurigaku Zasshi*, 1969, s. 196-209.
- [14] KRMENČÍK, P.: *Biotox.CZ*. c2007, [cit. 2007-01-02]. <<http://www.biotox.cz/drogy/>>
- [15] HORST, A.: *Jedovaté rostliny. Jedovatí živočichové*. 1. vyd. Praha: Knižní klub, 2004. s. 160.
- [16] STAHL, E.: *Thin – Layer Chromatography. A Laboratory Handbook*. 2nd edition. Springer-Verlag. New York, 1969. s. 873.
- [17] *Československý lékopis*. Vyd. 4. Svazek I. Praha: Avicenum, 1987. s. 361.
- [18] MARSTON, A. - KISSLING, J. - HOSTETTMANN, K.: A Rapid TLC Bioautographic Method for the Detection of Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase Inhibitors in Plants. *Phytochem. Anal.*, **2002**, č. 13, s. 51-54.
- [19] SALAH. S. M. – JÄGER. A. K.: Screening of traditionally used Lebanese herbs for neurological activities. *J. Ethnopharmacol.* **2005**, s. 145-149.
- [20] KYUNG-MI, CH. – ICK-DONG, K.: 8-hydroxydihydrochelerytrine and 8-hydroxydihydrosanguinarine with a potent acetylcholinesterase inhibitory activity from *Chelidonium majus* L. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. **2005**, s. 2317-2320.
- [21] KUZNETSOVA, L. P. – SOCHILINA, E. E. – FADDEJEVA, M. D. – YOGODINA, O. V.: Influence of some isoquinoline alkaloids on enzymatic activities of acetylcholinesterase and monoamine oxidase. *Ukrains'kii Zhurnal*. **2005**, s. 147-153.
- [22] KUZNETSOVA, L. P. - NIKOL'SKAYA, E. B. - SOCHILINA, E. E. – FADDEJEVA, M. D.: Inhibition of enzymatic hydrolysis of acetylthiocholine with acetylcholinesterase by principal alkaloids isolated from *Chelidonium majus* and *Macleaya* and by derivative drugs. *Tsitologiya*. **2001**, s. 1046-1050.

- [23] ANDERSEN, A. – GAUGUIN, B. – GUDIENSEN, L. – JÄGER, A.: Screening of plants used in Danish folk medicine to treat memory dysfunction for acetylcholinesterase inhibitory activity. *Journal of ethnopharmacology*. 2006, s. 418-22.
- [24] ORHAN, I. – SENER, B. – CHOUDHARY, M. I. – KHALID, A.: Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory activity of some Turkish medicinal plants. *Journal of ethnopharmacology*. **2004**, s. 57-60.

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité literární prameny.

V Hradci Králové, dne 5.5.2007

