

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

# DIPLOMOVÁ PRÁCE

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

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

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

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

Hradec Králové, 2014

Lukáš Malý

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

V Hradci Králové

jméno, příjmení

Velice rád bych poděkoval především PharmDr. Jakubu Chlebkovi, Ph.D. za jeho trpělivost, cenné rady a vedení v laboratoři. Dále Prof. RNDr. Lubomíru Opletalovi, CSc. a Ing. Kateřině Macákové, Ph.D. za změření inhibičních aktivit vůči acetyl- a butyrylcholinesterase, Ing. Miroslavu Ločárkovi za změření hmotnostní spektrometrie (GC-MS), Mgr. Zdeňku Novákovi za změření nukleární magnetické rezonance (NMR) a Bc. Martině Hrabínové za změření inhibiční aktivity vůči prolyloligopeptidase.

Tato práce byla zpracována za podpory grantů FRVŠ 664/2011 a FRVŠ 190/2012.

# OBSAH

|   |    |
|---|----|
| SEZNAM ZKRATEK .....  | 7  |
| SEZNAM OBRÁZKŮ .....  | 8  |
| SEZNAM TABULEK .....  | 8  |
| 1 ÚVOD .....  | 9  |
| 2 CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE .....                                  | 10 |
| 3 TEORETICKÁ ČÁST .....                                       | 11 |
| 3.1 Alzheimerova choroba .....                                | 11 |
| 3.1.1 Epidemiologie a klinický obraz .....                    | 11 |
| 3.1.2 Etiopatogeneze .....                                    | 11 |
| 3.1.2.1 $\beta$ -amyloid a vznik plaků .....                  | 12 |
| 3.1.2.2 Neurofibrilární klubka (tangles) .....                | 12 |
| 3.1.2.3 Zánět a oxidativní stres .....                        | 12 |
| 3.1.2.4 Mitochondriální dysfunkce .....                       | 13 |
| 3.1.2.5 Snížený obsah ACh v mozku .....                       | 13 |
| 3.1.2.6 Nedostatek neurotrofních faktorů .....                | 13 |
| 3.1.2.7 Genetika .....  | 14 |
| 3.1.2.8 Nadměrná excitace NMDA receptorů .....                | 14 |
| 3.1.2.9 Prolyloligopeptidasa .....                            | 14 |
| 3.1.3 Diagnostika AD v dnešní době .....                      | 14 |
| 3.1.4 Dnešní léčba AD .....                                   | 15 |
| 3.1.4.1 Inhibitory cholinesteras .....                        | 15 |
| 3.1.4.2 NMDA inhibitory .....                                 | 16 |
| 3.1.4.3 Nootropika .....                                      | 16 |
| 3.1.4.4 Antioxidanty .....                                    | 17 |
| 3.1.4.5 Látky působící na NGF – nervové růstové faktory ..... | 17 |
| 3.1.5 Možné přístupy v budoucí léčbě .....                    | 17 |
| 4 <i>Fumaria officinalis</i> L. ....                          | 19 |
| 4.1 Taxonomické zařazení .....                                | 19 |
| 4.2 Morfologická charakteristika .....                        | 19 |
| 4.3 Naleziště .....   | 19 |
| 4.4 Lidové léčitelství .....                                  | 19 |
| 4.5 Obsahové látky .....                                      | 20 |

|       |   |    |
|-------|---|----|
| 4.5.1 | Extrakty rostlin rodu <i>Fumaria</i> a jejich biologické aktivity ..... | 20 |
| 4.5.2 | Alkaloidy rodu <i>Fumaria</i> a jejich možné biologické aktivity .....  | 20 |
|       | Isochinolinový typ .....  | 22 |
|       | Aporfinový typ.....   | 22 |
|       | Benzofenanthridinový typ .....  | 22 |
|       | Protopinový typ.....  | 23 |
|       | Sekoftalidisochinolinový typ .....                                      | 23 |
|       | Indenobenzazepinový typ.....  | 23 |
|       | Spirobenzylisochinolinový typ .....                                     | 23 |
| 4.5.3 | Fenolické sloučeniny <i>Fumaria officinalis</i> L. ....                 | 23 |
| 5     | EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....  | 25 |
| 5.1   | Materiál a vybavení .....   | 25 |
| 5.1.1 | Rozpouštědla a chemikálie .....   | 25 |
| 5.1.2 | Chemikálie použité při stanovení inhibičních aktivit .....              | 25 |
| 5.1.3 | Chromatografické adsorbenty .....                                       | 26 |
| 5.1.4 | Pomocné látky.....  | 26 |
| 5.1.5 | Přístrojové vybavení.....   | 26 |
| 5.1.6 | Rostlinný a ostatní materiál.....                                       | 26 |
| 5.2   | Obecné postupy práce .....  | 27 |
| 5.2.1 | Příprava a čištění rozpouštědel.....                                    | 27 |
| 5.2.2 | Odpařování extraktů a frakcí .....                                      | 27 |
| 5.2.3 | Sušení a skladování frakcí a izolovaných čistých látek .....            | 27 |
| 5.2.4 | Preparativní TLC .....  | 27 |
| 5.2.5 | Detekce alkaloidů, TLC detekce .....                                    | 27 |
| 5.3   | Strukturní analýza.....   | 27 |
| 5.3.1 | GC-MS analýza .....   | 27 |
| 5.3.2 | NMR analýza .....   | 28 |
| 5.3.3 | Optická otáčivost.....  | 28 |
| 5.3.4 | Teplota tání.....   | 28 |
| 5.4   | Izolace alkaloidů .....   | 29 |
| 5.4.1 | Alkaloidy první zóny (A4/1).....  | 29 |
| 5.4.2 | Alkaloidy druhé zóny (A4/2) .....                                       | 29 |
| 5.4.3 | Alkaloidy třetí zóny (A4/3).....  | 30 |

|       |  |    |
|-------|--|----|
| 5.4.4 | Alkaloidy čtvrté zóny (A4/4) .....   | 30 |
| 5.5   | Stanovení inhibiční aktivity alkaloidů a alkaloidních extraktů vůči erythrocytární AChE a sérové BuChE ..... | 31 |
| 5.5.1 | Podmínky měření .....  | 31 |
| 5.5.2 | Získání AChE a BuChE .....   | 31 |
| 5.5.3 | Stanovení cholinesterasové inhibiční aktivity (hodnoty IC <sub>50</sub> ).....                               | 31 |
| 5.6   | Stanovení inhibiční aktivity alkaloidů a alkaloidních extraktů vůči prolyloligopeptidase .....               | 32 |
| 5.6.1 | Podmínky měření .....  | 32 |
| 5.6.2 | Stanovení inhibiční aktivity .....   | 32 |
| 6     | VÝSLEDKY .....   | 33 |
| 6.1   | Strukturní analýza.....  | 33 |
| 6.1.1 | protopin (LM-1).....   | 33 |
| 6.1.2 | (+)-fumarilin (LM-2) .....   | 35 |
| 6.1.3 | kryptopin (LM-3) .....   | 37 |
| 6.1.4 | (+)-parfumidin (LM-4).....   | 39 |
| 6.1.5 | (-)-fumaricin (LM-5) .....   | 41 |
| 6.2   | Teplota tání izolovaných alkaloidů .....   | 43 |
| 6.3   | Specifická optická otáčivost izolovaných alkaloidů .....   | 43 |
| 6.4   | Inhibiční aktivity izolovaných alkaloidů .....   | 43 |
| 7     | DISKUSE.....   | 44 |
| 8     | LITERATURA.....  | 45 |
| 9     | ABSTRAKT .....   | 48 |
| 10    | ABSTRACT.....  | 49 |

## SEZNAM ZKRATEK

|              |  |
|--------------|--|
| A $\beta$    | $\beta$ -amyloid   |
| ACh          | acetylcholin   |
| AChEi        | inhibitory acetylcholinesterasy  |
| AD           | Alzheimerova choroba   |
| ApoE         | apolipoprotein E   |
| APP          | amyloid prekurzorový protein   |
| BACE1        | $\beta$ -sekretasa   |
| BuChEi       | inhibitory butyrylcholinesterasy   |
| DMSO         | dimethylsulfoxid   |
| EBM          | medicína založená na důkazech (Evidence Based Medicine)                                    |
| GC-MS        | plynová chromatografie-hmotnostní spektrometrie  |
| HBV          | virus hepatitidy B   |
| HEB          | hematoencefalická bariéra  |
| HupA         | huperzin A   |
| MAO-A        | monoaminoxidasa typu A   |
| MMSE         | Mini Mental State Examination  |
| NIST         | Národní institut standardů a technologie (National Institute of Standards and Technology)  |
| NMDA         | <i>N</i> -methyl-D-aspartát  |
| NMR          | nukleární magnetická rezonance   |
| NGF          | nervový růstový faktor   |
| POP          | prolyloligopeptidasa   |
| PS-1         | presenilin 1   |
| rAGEs        | receptory pokročilých glykovaných produktů (receptors for Advanced Glycation End-products) |
| ROS          | kyslíkový radikál (Reactive Oxygen Species)  |
| RNS          | dusíkový radikál (Reactive Nitrogen Species)   |
| TLC          | tenkovrstvá chromatografie (Thin Layer Chromatography)                                     |
| TNF $\alpha$ | tumor nekrotizující faktor $\alpha$  |

## SEZNAM OBRÁZKŮ

|  |    |
|--|----|
| Obrázek 1: <i>Fumaria officinalis</i> L. ....                          | 19 |
| Obrázek 2: Strukturní typy alkaloidů rostlin rodu <i>Fumaria</i> ..... | 21 |
| Obrázek 3: Analytická TLC frakce A4 v porovnání se standardy .....     | 29 |
| Obrázek 4: Kontrolní TLC rozdělené frakce A4 .....                     | 30 |
| Obrázek 5: Ellmanova metoda .....                                      | 31 |
| Obrázek 6: Struktura protopinu (LM-1).....                             | 33 |
| Obrázek 7: Hmotnostní spektrum protopinu .....                         | 33 |
| Obrázek 8: <sup>1</sup> H NMR spektrum protopinu .....                 | 34 |
| Obrázek 9: <sup>13</sup> C NMR spektrum protopinu.....                 | 34 |
| Obrázek 18: Struktura (+)-fumarilinu (LM-2) .....                      | 35 |
| Obrázek 19: Hmotnostní spektrum (+)-fumarilinu.....                    | 35 |
| Obrázek 20: <sup>1</sup> H NMR (+)-fumarilinu .....                    | 36 |
| Obrázek 21: <sup>13</sup> C NMR spektrum (+)-fumarilinu.....           | 36 |
| Obrázek 10: Struktura kryptopinu (LM-3) .....                          | 37 |
| Obrázek 11: Hmotnostní spektrum kryptopinu .....                       | 37 |
| Obrázek 12: <sup>1</sup> H NMR spektrum kryptopinu .....               | 38 |
| Obrázek 13: <sup>13</sup> C NMR spektrum kryptopinu .....              | 38 |
| Obrázek 22: Struktura (+)-parfumidinu (LM-4).....                      | 39 |
| Obrázek 23: Hmotnostní spektrum (+)-parfumidinu .....                  | 39 |
| Obrázek 24: <sup>1</sup> H NMR spektrum (+)-parfumidinu .....          | 40 |
| Obrázek 25: <sup>13</sup> C NMR spektrum (+)-parfumidinu.....          | 40 |
| Obrázek 14: Struktura (–)-fumaricinu (LM-5) .....                      | 41 |
| Obrázek 15: Hmotnostní spektrum (–)-fumaricinu.....                    | 41 |
| Obrázek 16: <sup>1</sup> H NMR spektrum (–)-fumaricinu.....            | 42 |
| Obrázek 17: <sup>13</sup> C NMR spektrum (–)-fumaricinu .....          | 42 |

## SEZNAM TABULEK

|   |    |
|---|----|
| Tabulka 1: Teploty tání izolovaných alkaloidů .....                 | 43 |
| Tabulka 2: Specifická optická otáčivost izolovaných alkaloidů ..... | 43 |
| Tabulka 3: Inhibiční aktivity izolovaných alkaloidů .....           | 43 |



# 1 ÚVOD

Alzheimerova choroba (AD) je chronicky progresivní degenerativní onemocnění centrálního nervového systému způsobující demenci, která se projevuje zapomínáním a ztrátou kognitivních funkcí. Různými mechanismy dochází k úmrtí neuronů a nedostatku acetylcholinu (ACh) v mozku<sup>1</sup>. Dnešní používaná terapie je pouze symptomatická, zmírňující projevy onemocnění. Používají se cholinesterasové inhibitory, které inhibicí enzymů rozkládajících ACh docílí zvýšení jeho hladin, a antagonisté NMDA receptorů<sup>2</sup>.

Spektrum používaných látek v terapii je velice úzké, proto jsou hledána další potencionální léčiva, i přírodního původu. Jednou z takových látek je huperzin A, alkaloid dlouhodobě používaný tradiční čínskou medicínou. Čím dál více poznatků o patofyziologii AD přináší nové možnosti ovlivnění vzniku a rozvoje onemocnění. Zkoumají se látky ovlivňující aktivitu transmembránových sekretas, zabraňující fosforylaci  $\tau$ -proteinu, inhibující prolyloligopeptidasu a další<sup>3</sup>.

Sumární alkaloidní extrakt *Fumaria officinalis* vykazoval při screeningu *in vitro* zajímavou cholinesterasovou inhibiční aktivitu<sup>4</sup>, která by mohla být potencionálně využita pro terapii AD. Obecně čeleď Fumariaceae obsahuje různé strukturní typy isochinolinových alkaloidů<sup>5</sup> s širokou škálou vykazovaných biologických aktivit. Jde o látky lipofilního charakteru, které i díky tomu mohou pronikat hematoencefalickou bariérou (HEB) a terapeuticky ovlivňovat aktivitu enzymatických systémů v mozku, např. inhibovat cholinesterasy.

## 2 CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE

Diplomová práce navazuje na předešlé práce<sup>6,7</sup> a pokračuje ve zkoumání biologických aktivit alkaloidů izolovaných z *Fumaria officinalis* L. Její cíle jsou:

- izolace jednotlivých alkaloidů ze zadané frakce sumárního diethyletherového alkaloidního extraktu *Fumaria officinalis* L.<sup>6,7</sup>,
- identifikace struktury (pomocí GC-MS a NMR) izolovaných alkaloidů a stanovení jejich fyzikálně-chemických vlastností (optická otáčivost, teplota tání),
- stanovení biologické aktivity čistých izolovaných alkaloidů (inhibice acetyl- a butyrylcholinesterasy, inhibice prolyloligopeptidasy).

## 3 TEORETICKÁ ČÁST

### 3.1 Alzheimerova choroba

Alzheimerova choroba (AD) je jedna z nejčastějších forem demence. Demence je syndrom vzniklý nezvratným onemocněním mozku, při kterém dochází k poruše kognitivních funkcí – krátkodobé i dlouhodobé paměti, učení, abstraktního a samostatného myšlení, orientace v prostoru a čase, schopnosti řeči. Podle etiologie lze demence rozdělit do tří skupin: 60 % atroficko-degenerativní, způsobené onemocněním přímo mozkové tkáně (Alzheimerova demence, demence s Lewyho tělísky), 20 % ischemicko-vaskulární, spojené s onemocněním kardiovaskulárního systému, a 10 % sekundární demence, vzniklé různými typy příčin (infekční demence, metabolické demence při poruchách jater). Zbytek případů představují smíšené formy demence. Člověk trpící demencí se postupem času stává nesamostatný a čím dál víc odkázaný na pomoc blízkých, pro které je tato činnost mnohdy velice náročná<sup>1</sup>.

#### 3.1.1 Epidemiologie a klinický obraz

Do 45 let věku je toto onemocnění vzácné, mezi šedesátiletými se vyskytuje u 5%, každých následujících 5 let se počet postižených zdvojnásobuje<sup>8</sup>. Tento jev souvisí především s prodloužením délky života, ovšem neznamená, že se AD projeví u každého, kdo žije dostatečně dlouho. Průměrně trvá onemocnění 9 let a končí smrtí. AD můžeme rozdělit na tři stadia: mírné, střední a těžké<sup>1</sup>.

V brzkých fázích AD mohou být pozorovány změny v chování a pokles jazykových funkcí. Porucha kognitivních funkcí se objevuje postupně, nemocný je může maskovat. Postižený má porušenou orientaci v prostoru a ztrácí se v jemu známých místech (domov). Ztráta krátkodobé paměti nakonec přejde ve ztrátu dlouhodobé vzdálené paměti. V pokročilých stádiích postižený nepoznává své blízké, objevuje se podezíravost, sobeckost, egocentrismus a hladiny ostražitosti jsou těžce narušeny. Mezi další znaky patří snížená plynulost řeči, vynechávání slov a porušení mluvy neposkládáním slov do věty ve správném pořadí. V konečném stadiu dochází k poruše motorických funkcí a pacient může upadnout do vegetativního stavu, nastává smrt<sup>1,9</sup>.

#### 3.1.2 Etiopatogeneze

AD je pomalu vyvíjející se neurodegenerativní choroba s progresivní ztrátou paměti a kognitivních funkcí. Tyto funkční změny se primárně objevují z nedostatku cholinergní transmise v neokortexu (kůra mozková). Postiženými částmi jsou kůra mozková, hipokampus,

amygdala, asociativní části frontálního, temporálního, parietálního laloku a podkorová jádra projikující do těchto částí mozku. Mozek pacienta s AD charakteristicky obsahuje dva zřetelné typy nerozpustných materiálů, které jsou známkami mozkových poškození spojených s onemocněním – extracelulární plaky A $\beta$  a intracelulární neurofibrilární klubka hyperfosforylovaného  $\tau$ -proteinu. Zatím není známo, jestli jsou příčinou nebo důsledkem onemocnění<sup>9</sup>. K dalším patologickým změnám patří ztráta neuronů způsobená různými příčinami a v pokročilých stádiích nemoci i změny v ostatních neurotransmiterových systémech<sup>1</sup>.

### **3.1.2.1 $\beta$ -amyloid a vznik plaků**

$\beta$ -amyloid (A $\beta$ ) vzniká z transmembránového amyloid prekurzorového proteinu (APP). Fyziologická funkce APP není zatím úplně jasná, předpokládá se, že jeho nadměrná exprese má pozitivní vliv na růst nervových buněk. APP je v neuronech produkován ve velkých množstvích a rychle metabolizován různými cestami. Na povrchu buňky je APP štěpen  $\alpha$ -sekretasou a následně  $\gamma$ -sekretasou, což nevede k tvorbě A $\beta$ . Tuto degradaci označujeme za neamyloidní cestu. Další cestou je štěpení v endosomálním kompartmentu  $\beta$ -sekretasou (BACE1) a  $\gamma$ -sekretasou, které vyúsťuje v produkci A $\beta$  proteinu o 38-43 aminokyselinách, tzv. amyloidní cesta.  $\gamma$ -sekretasa je multiproteinový komplex skládající se z presenilinu 1 nebo presenilinu 2 a dalších tří transmembránových proteinů. Zatím je nejasné, kdy dochází ke štěpení amyloidní či neamyloidní cestou<sup>10</sup>. Extracelulární ukládání oligomerů A $\beta$  je základní patologickou změnou. Tato depozita A $\beta$  tvoří shluky, kolem kterých probíhají další změny a vznikají tzv. senilní, Alzheimerovské plaky<sup>1</sup>. Hlavní alloformy A $\beta$  nalézané v placích jsou A $\beta$ -42 (počet aminokyselin) a A $\beta$ -40, přičemž prvně zmiňovaný je pro neurony toxičtější, je ho o 10 % více a rychleji se formuje. Možnost ovlivnění hladiny extracelulárního A $\beta$  by mohla být v použití proteas neprylisinu a insulin degradujícího enzymu<sup>10</sup>.

### **3.1.2.2 Neurofibrilární klubka (tangles)**

Nejzávažnější intracelulární změnou je degradace neuronálního  $\tau$ -proteinu, který je důležitý v udržování sítě cytoskeletu neuronu a pro funkci axonálního transportu<sup>11</sup>. Mikrotubuly  $\tau$ -proteinu jsou patologicky hyperfosforylovány, zkracují se a dochází k tvorbě nerozpustných neuronálních klubek (tangles) a ztrátě jejich funkce<sup>1</sup>.

### **3.1.2.3 Zánět a oxidativní stres**

Výše zmíněné základní procesy spolu s oxidativním stresem spouští další procesy vyúsťující ve vznik sterilního zánětu. Mikroglie a astrocyty v okolí neuronu se transformují na makrofágy,

uvolňují se prozánětlivé cytokiny, interleukin 1, interleukin 6, TNF $\alpha$ , aktivuje se cyklooxygenasa a dochází k syntéze prostaglandinu<sup>12</sup>. Adheze mikroglíí a monocytů na A $\beta$  plaky je zprostředkována scavenger („zhášečímí“) receptory typu A a kromě produkce prozánětlivých TNF $\alpha$  zvyšuje množství volných kyslíkatých i dusíkatých radikálů (ROS, RNS).<sup>13</sup> Dochází k nadměrné peroxidaci lipidů membrány neuronů a k inaktivaci enzymů, nastává apoptosa neuronů<sup>1</sup>. K zánětu, oxidativnímu stresu a neuronální dysfunkci vede i vazba A $\beta$  na receptory produktů pokročilé glykace (receptors for Advanced Glycation End-products). AGEs je skupinou různorodých látek a jejich produkce je zvýšena například důsledkem hyperglykémie při diabetu. Neurofibrilární klubka i extracelulární A $\beta$  plaky jsou pro takovou glykaci substráty<sup>3</sup>.

#### **3.1.2.4 Mitochondriální dysfunkce**

Při mitochondriálním buněčném dýchání vzniká fyziologicky ROS a RNS. Při zvýšeném oxidačním stresu nejsou vlastní antioxidační mechanismy dostačující a dochází k poškození mitochondriální DNA a poruše mitochondriální funkce. V blízkosti mitochondrií se nachází endoplazmatické retikulum, vzniká zde amyloidní cestou A $\beta$  a spolupráce těchto organel je negativně ovlivněna<sup>3</sup>.

#### **3.1.2.5 Snížený obsah ACh v mozku**

Cholinergní systém je nejvíce postižený. Dochází k porušení syntézy ACh, k jeho uvolňování i ke zpětnému vychytávání cholinu. Nacházíme nedostatek cholinacetyltransferasy, enzymu syntetizujícího ACh z cholinu a acetylkoenzymu A v neuronu. ACh je v synaptické štěrbině rozkládán acetylcholinesterasou na cholin a acetát, jejíž množství je při AD sníženo až o 90 %<sup>14</sup>. V lidském mozku jsou dva typy acetylcholinesterasy, převažující tetramer G4 a minoritní monomer G1, butyrylcholinesterasa je ve stopovém množství. V mozku postiženém AD vzniká větší množství molekul BuChE v oblastech A $\beta$  plaků a stoupá podíl monomeru G1 AChE, proto se hledají nové látky s duálním působením na oba tyto enzymy<sup>2</sup>.

#### **3.1.2.6 Nedostatek neurotrofních faktorů**

Neurotrofní faktory (NTFs) jsou malou skupinou aktivních proteinů, kam patří mimo jiné i neurotrofní růstový faktor (NGF). Mají na starost udržení funkce a přežití nervových populací. Kontrolují růst axonů, buněčnou stavbu a mají klíčovou roli v tvorbě paměti. Při poškození neuronu napomáhají jeho regeneraci. NGF je jeden z nejdůležitějších NFTs. Během jeho nedostatku je snížen počet cholinergních neuronů, je snížena tvorba cholinacetyltransferasy, což vyúsťuje ve snížení cholinergní transmise<sup>3</sup>.

### **3.1.2.7 Genetika**

AD predispoziční mutace jsou nejspíše zakódovány na chromozomech 1, 14, 19 a 21. Mutace chromozomu 1 a 14 ovlivňuje tvorbu presenilinu 1 a 2, které jsou potřebné pro správné štěpení APP  $\gamma$ -sekretasou<sup>15</sup>. Chromozom 19 je spojen se zvýšenou tvorbou apolipoproteinu E4 a mutace chromozomu 21 způsobuje zvýšenou produkci beta-APP<sup>1</sup>. Existuje 32 APP, 179 presenilin 1 a 14 presenilin 2 genových mutací, které vyúsťují v brzkou autosomálně dominantní AD. Pozdě nastupující sporadická AD má také základ v genetické predispozici. Až polovina rizika je vázána na alelu genu pro apolipoprotein E (ApoE), který je tvořen ve třech variantách – ApoE2, ApoE3, ApoE4. Právě ApoE4 je spojován se zvýšenými A $\beta$  depozity<sup>10</sup>.

### **3.1.2.8 Nadměrná excitace NMDA receptorů**

Zvýšeně uvolňované excitační aminokyseliny glutamát a aspartát se vážou především na NMDA receptory, které jsou spojeny s iontovými kanály. Dochází k nadměrné aktivaci a vstupu vápenatých iontů do neuronů, produkci ROS, aktivaci některých enzymů, poškození vnitřního prostředí neuronů a následně k apoptose neuronů<sup>1,16</sup>.

### **3.1.2.9 Prolyloligopeptidasa**

Prolyloligopeptidasa (POP) je cytosolický peptid, který je zapojen do metabolismu malých peptidů obsahujících na C-konci prolin. Jde například o vazopresin, substanci P nebo thyrotropin uvolňující hormon, které jsou zapojeny i do procesu učení a paměti. Zvýšená degradace těchto peptidů může urychlit proces stárnutí buněk, a tak být zapojena v neurodegenerativních onemocněních spojených se stářím jako je AD nebo Parkinsonova nemoc<sup>17</sup>.

## **3.1.3 Diagnostika AD v dnešní době**

Příznaky demencí si nesmíme plést s normálním stárnutím, proto je včasná diagnóza velice důležitá pro následující léčbu. Provádí se mnoho vyšetření, některá jsou velmi běžná a jednoduchá, takže je může provádět i praktický lékař, některá specializovaná. Specifické postavení má neuropsychologická diagnóza, kdy se nejvíce používá Mini Mental State Examination, test obsahující 30 jednoduchých úkolů k odlišení středně těžké demence od normální populace (např. orientace v prostoru a čase, odečítání, mluvení). Bohužel selhává v diagnostice časných stadií demence a mírné kognitivní poruchy<sup>18</sup>.

V poslední době se stále více uplatňuje likvorologická diagnostika A $\beta$ , celkového  $\tau$ -proteinu a fosforylovaného  $\tau$ -proteinu. Pro AD je typický pokles A $\beta$ -42 a zvýšení celkového i fosforylovaného  $\tau$ -proteinu v mozkomíšním moku už v raném období nemoci. Ještě vyšší

rozlišovací potenciál má poměr koncentrací A $\beta$ -42 vůči A $\beta$ -40. Dále se využívá MRI volumetrie ke sledování progresu AD, kdy se objem určitých oblastí mozku znatelně zmenšuje u postižených AD než u zdravých lidí. Nespecifickou zobrazovací metodou je využití pozitronové emisní tomografie a sledování snížení prokrvení postižených laloků<sup>19</sup>.

### **3.1.4 Dnešní léčba AD**

Dnešní léčba nám nedovoluje zvrátit průběh AD, jedná se o léčbu symptomatickou. Jde nám především o zlepšení kognitivních funkcí pacienta, udržení jejich dosavadního stavu nebo zpomalení zhoršování těchto funkcí. Přitom platí, že čím dříve se s léčbou začne, tím je úspěšnější<sup>20</sup>. Léky můžeme rozdělit do dvou hlavních skupin – zlepšující kognitivní funkce a ovlivňující nekognitivní funkce. Léky první skupiny jsou především kognitiva, látky zlepšující centrální acetylcholinergní transmisí, a ostatní látky, ovlivňující jiné neuromediátorové systémy, mozkový metabolismus (nootropika), antioxidanty a další. V dnešní době se z kognitiv nejvíce používají inhibitory cholinesteras, ostatní látky mají spíše malý význam (prekurzory syntézy ACh, látky zlepšující tvorbu a uvolnění ACh – deanol, citikolin<sup>21</sup>), klinicky se zkouší (inhibitory zpětného vychytávání ACh) nebo se hledají noví zástupci (agonisté nikotinových a muskarinových ACh receptorů). Léky ovlivňující nekognitivní funkce jsou hlavně antidepressiva, anxiolytika, neuroleptika, hypnotika, tedy látky ovlivňující behaviorální a symptomatické příznaky demence – chování, emoce, spánek<sup>2</sup>.

#### **3.1.4.1 Inhibitory cholinesteras**

V dnešní době je schválena léčba AD čtyřmi strukturně různými látkami: takrinem, donepezilem, rivastigminem a galanthaminem. Všichni tito zástupci prochází HEB do mozku, inhibují enzymy odbourávající ACh na rozkladné produkty a tím zvyšují počet molekul ACh využitelných k transmisí. U pacientů s lehkým a středním stádiem AD zlepšují kognitivní funkce, bohužel neoddlužují postup onemocnění. Zmíněné látky jsou podobně efektivní, takrin se však v dnešní klinické praxi pro svou hepatotoxicitu a další nežádoucí účinky přestal používat<sup>9</sup>. Dávkování inhibitorů cholinesteras se titruje – dle tolerance NÚ se postupně zvyšuje dávka.

**Donepezil** je piperidinový derivát s nejvyšší specifickou reverzibilní (metabolisuje se v játrech) inhibicí AChE bez podstatného ovlivnění BuChE, užívá se až 10 mg 1x denně<sup>2</sup>.

**Rivastigmin** inhibuje pseudoreverzibilně (odbouráván samotnými cholinesterasami) AChE i BuChE selektivně v kortexu a hipokampu, dávkovací schéma začíná 1,5 mg 2x denně a při dobré snášenlivosti končí podáváním 2x denně až 6 mg<sup>2</sup>.

**Galanthamin** je fenanthrenový terciární alkaloid izolovaný z *Galanthus nivalis* L. (Amaryllidaceae), dnes získáván i synteticky. Reverzibilně kompetitivně inhibuje AChE a navíc allostericky moduluje nikotinové acetylcholinergní pre- i postsynaptické receptory, užívá se až 2x denně 12 mg<sup>2</sup>. Při tomto dávkování dosahují pacienti zlepšení kognitivních funkcí oproti placebo už za 3 až 6 měsíců. Galanthamin též zlepšuje aktivity všedního života a chování. V dlouhodobých studiích (12 měsíců) dosahuje zpomalení progresu AD u mírného až středního stupně onemocnění<sup>22</sup>.

Mezi nejčastější NÚ těchto látek patří nechutenství, dyspepsie, průjemy, zpomalení srdeční frekvence, neklid v nohou, křeče, zvracení<sup>2</sup>.

Spektrum používaných inhibitorů cholinesteras je vcelku malé, proto se hledají další látky s podobnou aktivitou. Jednou z nich je **huperzin A** (HupA), lykopodiový alkaloid izolovaný z čínské plavuně *Huperzia serrata* Thunb. ex Murray, dlouhodobě používané tradiční čínskou medicínou. V porovnání s výše zmíněnými látkami, má lepší prostupnost přes HEB, vyšší orální biodostupnost a delší AChEi účinek<sup>23</sup>. Kromě reverzibilní specifické inhibice AChE modifikuje HupA zpracovávání APP, ovlivňuje A $\beta$  neurotoxicitu, redukuje oxidativní stres, působí na NGF a inhibuje NMDA receptory<sup>24,25</sup>. HupA je velmi slibnou látkou s ukončenou 2. fází klinického hodnocení a dobrými výsledky na zlepšení kognitivních funkcí a aktivity všedního života, avšak k určení bezpečnosti dlouhodobého užívání jsou nutné další větší randomizované studie<sup>26</sup>. Hledání dalších inhibitorů přineslo hupriny, selektivnější deriváty HupA s takrinem. U huprinu X byla naměřena dokonce 40x vyšší afinita k AChE než u donepezilu<sup>27</sup>. Huprin Y byl kromě své AChEi aktivity zkoumán pro svůj neuroprotektivní efekt a modulaci NMDA receptorů<sup>28</sup>. Huprin Y a huprin Z vykazovaly stimulační efekt na M<sub>1</sub> muskarinové receptory<sup>29</sup>.

#### **3.1.4.2 NMDA inhibitory**

Nekompetitivním antagonistou NMDA receptorů používaným v léčbě AD je schválen pouze memantin, používaný u středních a těžkých stadií v dávce až 10 mg 2x denně. Klinické studie ukázaly pozitivní efekt nejen na kognitivní funkce, ale i na aktivity všedního života, chování a psychiku nemocného<sup>2</sup>. U pacientů v kombinaci s donepezilem dosahuje skvělých výsledků oproti placebo na kognitivní funkce, aktivity všedního života, chování a tolerance<sup>30</sup>.

#### **3.1.4.3 Nootropika**

Tato skupina strukturně nesourodých látek ovlivňuje pozitivně mozkový metabolismus, ovšem klinické studie jejich efekt na zlepšení kognitivních funkcí jednoznačně nepotvrzují a jejich použití v léčbě AD není podle EBM. Piracetam zlepšuje oxidativní metabolismus neuronů



a plasticitu erytrocytů, v praxi bývá poddávkován. Pyritinol kromě vychytávání volných kyslíkových radikálů a pozitivního vlivu na oxidativní metabolismus neuronů vykazuje ještě slabý protizánětlivý účinek. Bývá rovněž poddávkován. Nicergolin je derivátem námelových alkaloidů a podílí se na zlepšení prokrvení mozku i zlepšení metabolismu neuronů<sup>2</sup>. Zajímavou látkou této skupiny je extrakt z *Ginkgo biloba* (EGb 761), u kterého se popisuje několik mechanismů účinku – zvýšení tolerance k hypoxii, zlepšená reologie krve, inhibice faktoru aktivujícího krevní destičky, neuroprotektivita, vychytávání volných radikálů – a ve srovnání s donepezilem dosahuje podobných zlepšení kognitivních funkcí u pacientů s lehkou až střední AD<sup>31</sup>.

#### **3.1.4.4 Antioxidanty**

Antioxidanty jsou látky vychytávající volné radikály nebo snižující jejich tvorbu. Antioxidační aktivitu vykazuje  $\alpha$ -tokoferol v dávce 2000 UI/den<sup>2</sup>, jiná studie doporučuje k prevenci AD příjem vitamínu E v dávce 15 mg/den v rámci jídla<sup>32</sup>. I další látky mají prokázaný antioxidační účinek, jejich klinická hodnocení však neprokázala významný terapeutický účinek<sup>2</sup>.

#### **3.1.4.5 Látky působící na NGF – nervové růstové faktory**

Jednou z takových látek je cerebrolysin, směs aminokyselin a krátkých peptidů, zlepšující kognici u pacientů s mírnou až střední AD<sup>33</sup>, který u myši zvyšoval počet těchto růstových faktorů. Klinické studie na lidech bohužel jednoznačné výsledky nepřinášejí<sup>2</sup>.

#### **3.1.5 Možné přístupy v budoucí léčbě**

Nové směry v léčbě zahrnují ovlivňování objevovaných patofyziologických procesů vzniku AD. Jde o sloučeniny ovlivňující sekretasy, především pozitivní regulace  $\alpha$ -sekretasy a látky snižující aktivitu  $\beta$ -sekretasy (z přírodních látek například katechiny nebo některé protoberberinové alkaloidy) a  $\gamma$ -sekretasy (pěticyklické triterpeny, kurkumin jako inhibitor exprese PS-1), což by mohlo snížit produkci A $\beta$ . Dále jsou zkoumány malé přírodní molekuly vázající A $\beta$  monomery a zabraňující vzniku cytotoxických oligomerů (inhibitory agregace), byla pozorována inhibice formace A $\beta$  kurkuminem a inhibice A $\beta$  oligomerizace vodným extraktem z česneku. Z česneku (*Allium sativum* L.) získaný S-allyl cystein vykazoval antiglykační aktivitu, stejně tak ethanolický extrakt z *Melissa officinalis* L. Inhibice GSK-3 $\beta$  proteinkinasy by mohla vést ke snížení hyperfosforylace  $\tau$ -proteinu. Léčba zvýšením produkce NFG je dalším potencionálním směrem, který se zkoumá. Probíhají studie s rekombinantním lidským NGF. Z přírodních látek byl u likviritinu zjištěn potenciační účinek na NGF<sup>3</sup>. Brzké chronické podávání protizánětlivých látek může oddálit ukládání A $\beta$ <sup>34</sup>. Imunizace A $\beta$ -42 u mladých myši zabránila formování plaků

a u starších pacientů s projevy AD redukovala progresi AD<sup>35</sup>. Bohužel se v klinickém testování u části imunizovaných pacientů do půl roku objevila subakutní mozková encefalitida, do nalezení bezpečnější imunoterapie byla tato ukončena<sup>36</sup>.

## 4 *Fumaria officinalis* L.

### 4.1 Taxonomické zařazení<sup>37</sup>

|           |  |
|-----------|--|
| Oddělení: | Magnoliophyta – krytosemenné                     |
| Třída:    | Magnoliopsida – dvouděložné                      |
| Podtřída: | Ranunculidae                                     |
| Řád:      | Papaverales                                      |
| Čeleď:    | Fumariaceae DC.                                  |
| Rod:      | <i>Fumaria</i> L.                                |
| Druh:     | <i>Fumaria officinalis</i> L. – zemědým lékařský |



Obrázek 1: *Fumaria officinalis* L.<sup>38</sup>

### 4.2 Morfologická charakteristika

Zemědým je jednoletá, až půl metru vysoká bylina s bohatě rozvětvenou, dutou, přímou lodyhou. Její listy jsou řapíkaté s dvakrát zpeřenou čepelí, řapíkatými, dlanitě členěnými až zpeřenými lístky. Květy má obojaké, souměrné, uspořádané do hroznu na konci lodyhy<sup>38</sup>. Kalich je složen ze dvou vejčitě kopinatých lístků, koruna je ze čtyř protáhlých plátků, které jsou růžově zbarveny s koncovou tmavě fialovou skvrnou. Květ má šest tyčinek srostlých po třech<sup>39</sup>, svrchní semeník zraje v kulovitou, na vrcholu vmáčklou nažku<sup>38</sup>.

### 4.3 Naleziště

Roste téměř v celé Evropě, kromě nejvzdálenějšího severu, zřídka na Kavkazu, v západní Asii i severní Africe<sup>38</sup>. U nás je zemědým lékařský hojně rozšířeným plevelem, nalezneme ho všude – na polích, rumišťích, v zahradách i parcích. Ve větším množství vytváří šedozelené lodyhy a listy dojem dýmu vystupujícího ze země, odtud název zemědým<sup>39</sup>.

### 4.4 Lidové léčitelství

Lékopisnou drogou je sušená kvetoucí nať bez plodů, sbíraná v květnu až červenci. Sbírají se i ostatní druhy zemědýmů rostoucí na našem území (*F. rostellata*, *F. densiflora*, *F. schleicheri*, *F. vaiillantii*, *F. capreolata*), jsou ovšem vzácné<sup>40</sup> a vzhledově velice podobné<sup>38</sup>. Čerstvá nať má odporný až omamný zápach. Chuť je slaná, nahořklá a ostrá. Sušením natě odporný zápach mizí<sup>39</sup>. Suší se přirozeným teplem nebo v sušárnách do 50°C v tenkých vrstvách nebo zavěšená. Sesýchavý poměr je 7-8:1. Alkaloidy v droze obsažené ovlivňují hladké svalstvo, působí cholagogně (žlučopudně), mírně diuretický (močopudně), slabě laxativně (projímavě) – droga „krev čistící“. Pro tyto účinky se používá nálev nebo lihový extrakt<sup>38</sup>. Při onemocnění kůže,

hemeroidech nebo pro svůj diaforetický (potopudný) účinek se užívá ve formě koncentrovanějších koupelí<sup>41</sup>.

#### **4.5 Obsahové látky**

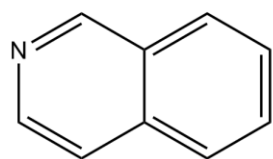
Rostliny rodu *Fumaria* L. (popsáno přes 50 druhů) obsahují především alkaloidy. Mezi další obsahové látky patří fenolické sloučeniny, třísloviny, slizy, minerální látky a hořčiny<sup>5,38</sup>.

##### **4.5.1 Extrakty rostlin rodu *Fumaria* a jejich biologické aktivity**

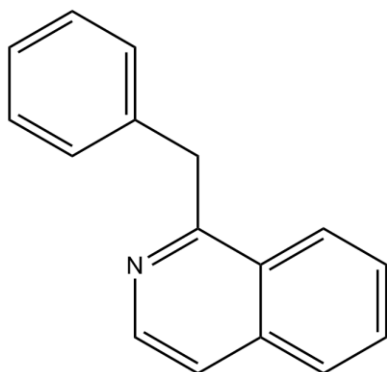
Směs látek získaných z hexanového (nejúčinnější), chloroformového a vodného extraktu *F. parviflora* vykazovala při perorálním podání antipyretický účinek<sup>42</sup>. Ethanolický extrakt *F. parviflora* vykazoval kromě antipyretického účinku i kardioinhibiční, antiarytmický, hypotenzní<sup>43</sup> a u ovcí vykazoval anthelmintický<sup>44</sup> účinek. Antiarytmická aktivita byla popsána i u alkaloidového extraktu *F. officinalis*<sup>45</sup>. Ethanolický extrakt *F. officinalis* vykazoval i velmi slibnou antioxidační aktivitu<sup>46</sup>. Alkaloidní extrakty alžírských druhů *F. capreolata* a *F. bastardii* vykazovaly antioxidační aktivitu<sup>47</sup>. Byla zkoumána i cytotoxicita a hepatoprotektivita extraktů z *F. officinalis* a *F. densiflora* oproti samotnému protopinu<sup>5</sup>, ovšem bez významných výsledků. Jiná studie potvrdila hepatoprotektivitu vodnoethanolického extraktu *F. parviflora* u krysích samců<sup>48,49</sup>. 50% ethanolický extrakt z *F. indica* vykazoval na zvířecích modelech protizánětlivou aktivitu<sup>50,51</sup>, 80% vodnoethanolický extrakt ze stejné rostliny byl zkoumán pro svou cholinomimetickou (laxativní úč.) a spasmolytickou (při kolikovitých bolestech) aktivitu<sup>52</sup>.

##### **4.5.2 Alkaloidy rodu *Fumaria* a jejich možné biologické aktivity**

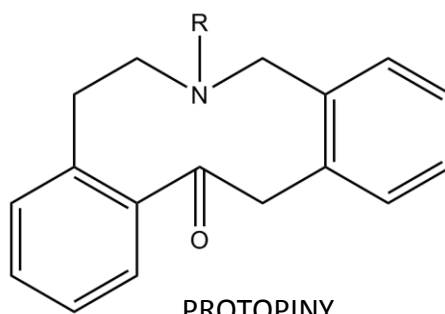
Alkaloidy nalezené v rodu *Fumaria* jsou isochinolinové, různých strukturních typů<sup>53</sup>. *Fumaria officinalis* L. obsahuje alkaloidy isochinolinové, aporfinové, protoberberinové, benzofenanthridinové, protopinové, sekoftalidisochinolinové, indenobenzazepinové, spirobenzylisochinolinové. V dalších druzích rostlin rodu *Fumaria* byly izolovány ještě typy benzylisochinolinové, ftalidisochinolinové, promorfinanové a rhoeadinové (Obrázek 2: Strukturní typy alkaloidů rostlin rodu *Fumaria*)<sup>5</sup>. Obsažené alkaloidy mají široké spektrum aktivit, např. berberin, protoberberinový alkaloid, vykazuje mimo jiné antifungální<sup>54</sup> a AChEi<sup>55</sup> účinky. 40 dalších isochinolinových alkaloidů z tureckých rostlin rodu *Fumaria* a *Corydalis* bylo oproti standardům sledováno pro svou antimikrobiální, antifungální a antivirovou aktivitu<sup>56</sup>. V jiné studii bylo 18 isochinolinových alkaloidů zkoušeno pro svou potencionální *in vitro* HBV antivirovou aktivitu<sup>57</sup>.



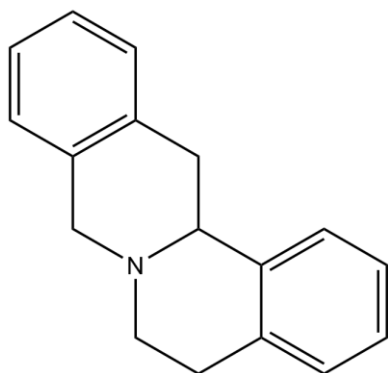
ISOCHINOLINY



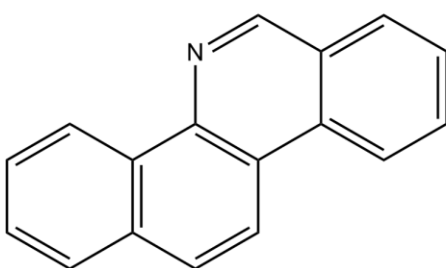
BENZYLISOCHINOLINY



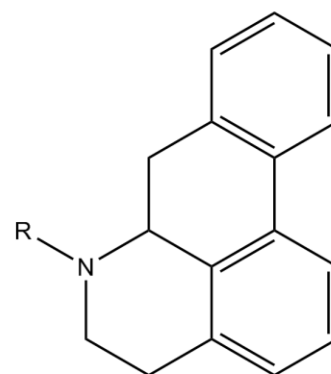
PROTOPINY



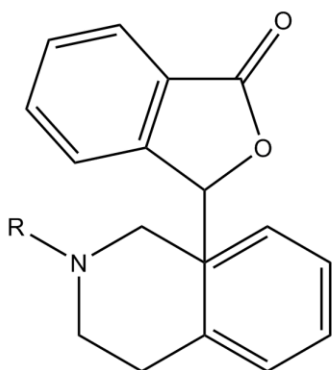
PROTOBERBERINY



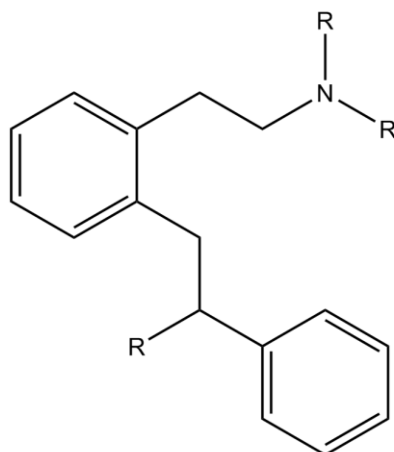
BENZOFENANTHRIDINY



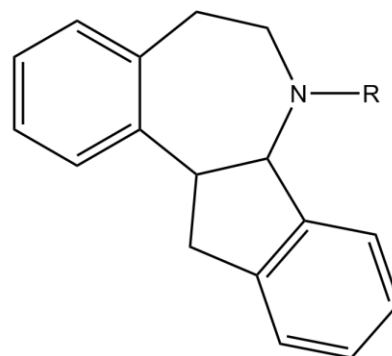
APORFINY



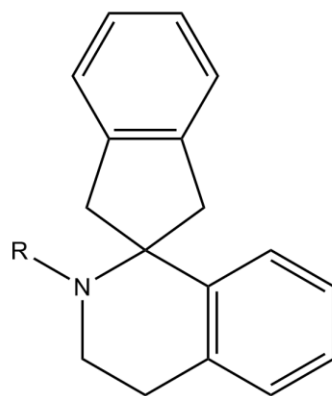
FTALIDISOCHINOLINY



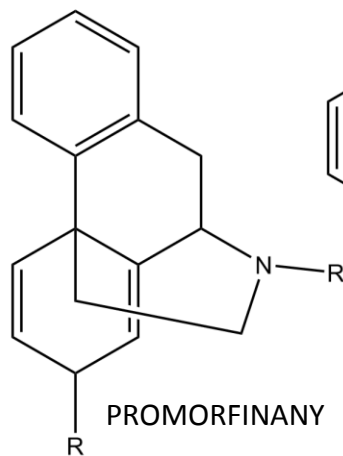
SEKOPTALIDISOCHINOLINY



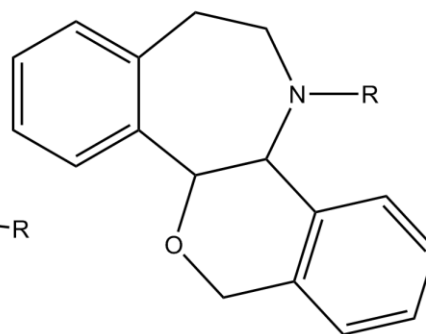
INDENOBENZAZEPINY



SPIROBENZYLISOCHINOLINY



PROMORFINANY



RHOEDINY

Obrázek 2: Strukturní typy alkaloidů rostlin rodu *Fumaria*<sup>5</sup>

Literatura<sup>5,58</sup> uvádí tyto alkaloidy izolované z *F. officinalis* a jejich aktivity:

### **Isochinolinový typ**

Základní isochinolinový typ alkaloidů je v rostlinách zastoupen v malé míře<sup>59</sup>. Izolován byl korydaldin s pozorovanou antimikrobiální aktivitou<sup>56</sup>.

### **Aporfinový typ**

Z této skupiny alkaloidů byl izolován (+)-bulbokapnin s AChE i BuChE inhibiční aktivitou<sup>60</sup> a (+)-korytuberin<sup>61</sup> s pozorovanou lipooxygenázovou inhibiční aktivitou<sup>62</sup>.

### **Protoberberinový typ**

V rámci skupiny protoberberinových alkaloidů byla zjištěna přítomnost (–)-cheilanthifolinu vykazujícího antimalarickou aktivitu<sup>63</sup>, (–)-kanadinu se zajímavou antioxidační aktivitou a nízkou cytotoxicitou, což by bylo výhodné pro jeho použití jako antioxidantu<sup>64</sup>, koptisinu vykazujícího silnou antifungální aktivitu proti *C. albicans*<sup>65</sup>, potencionální reverzibilní inhibici MAO-A v myším mozku<sup>66</sup>, vyšší antioxidační aktivitu než používaný trolox (analog vitamínu E)<sup>67</sup>, gastroprotektivní a antiulcerózní aktivita<sup>68</sup>. Další izolovaný alkaloid (+)-korydalin vykazuje kromě AChE<sup>60</sup> a anthelmintické<sup>69</sup> aktivity i *in vitro* inhibici CYP2C19 a CYP2C9<sup>70</sup> a gastroprotektivní a antiulcerózní aktivitu<sup>68</sup>. Aktivita *N*-methylsinaktinu se v literatuře nevyskytuje, (–)-skulerin *in vitro* vychytává volné radikály<sup>71</sup>, (±)-skulerin vykazuje antimalarickou aktivitu<sup>63</sup>, (–)-sinaktin byl měřen pro svou antibakteriální aktivitu<sup>566</sup>, dále byl izolován (±)-sinaktin, (–)-stylopin vykazující anthelmintickou aktivitu<sup>699</sup> a (±)-stylopin s protizánětlivou aktivitou<sup>72</sup> a *N*-methylstylopin<sup>611</sup>. Izolovaný tetrahydrokoptisin vykazoval akutní a chronickou protizánětlivou aktivitu<sup>73</sup> a gastroprotektivní účinek<sup>74</sup>.

### **Benzofenanthridinový typ**

Benzofenanthridinové alkaloidy vznikají z tetrahydroberberinů otevřením a recyklizací kruhu po jeho rotaci. V rostlinách se nacházejí jako kvartérní soli nebo redukované baze a nejvíce jsou obsaženy v rodech *Chelidonium* a *Sanguinaria* (Papaveraceae)<sup>75</sup>. Z *F. officinalis* byl izolován korydamin vykazující gastroprotektivní a antiulcerózní aktivitu<sup>68</sup> a sangvinarin vykazující inhibiční MAO aktivitu (menší než iproniazid)<sup>76</sup>, anthelmintickou aktivitu<sup>77</sup>, *in vitro* cytotoxickou aktivitu proti leukemickým lidským buňkám řady HL-60<sup>78</sup>. Působí proti zubnímu plaku<sup>79,80</sup>.

### **Protopinový typ**

Byly izolovány alkaloidy kryptopin vykazující anthelmintickou<sup>77</sup> aktivitu a protopin s hepatoprotektivními<sup>81</sup>, anthelmintickými<sup>69</sup>, antimalarickými<sup>63</sup>, antiagregačními<sup>82</sup> účinky a AChE inhibiční aktivitou<sup>55</sup>.

### **Sekoftalidisochinolinový typ**

Izolovány byly alkaloidy adlumicein, adlumidicein<sup>61</sup>, *N*-methylhydrastein, *N*-methylhydrastin, *N*-methyloxohydrastein, literatura neuvádí biologické aktivity.

### **Indenobenzazepinový typ**

Zatím bez publikovaných biologických aktivit byly izolovány bulgaramin, fumaritridin, fumaritrin, fumarofin.

### **Spirobenzylisochinolinový typ**

Spirobenzylisochinoliny patří k nejpočetnější skupině alkaloidů řádu Fumariaceae, v rostlině se syntetizují z protoberberinových prekurzorů<sup>59</sup>. Z *F. officinalis* byly izolovány (+)-dihydrofumarilin, (–)-fumaricin, fumarilicin, (+)-fumarilin, (–)-fumaritin, fumaritin *N*-oxid, (+)-fumarofycin vykazující antioxidační a antilipoperoxičáční<sup>83</sup> aktivitu, (–)-*O*-methylfumarofycin, (+)-parfumidin a (+)-parfumin<sup>61</sup>.

Jako alkaloidy s neznámou strukturou byly izolovány fumaroficinalin, fumarolin, fumarilicin a fumaritrilin<sup>58</sup>.

Některé druhy rodu *Fumaria* byly screeningově podrobeny stanovení AChE a BuChE inhibiční aktivity s dobrými výsledky<sup>84</sup>. Stanovení inhibičních aktivit jednotlivých alkaloidů izolovaných z *F. officinalis* je předmětem zkoumání na Katedře farmaceutické botaniky a ekologie Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy.

#### **4.5.3 Fenolické sloučeniny *Fumaria officinalis* L.**

Druhou významnou skupinu obsažených látek tvoří fenolické sloučeniny. Izolovány byly flavonoidy (myricetin, kempferol, kvercetin, rutin, hyperosid, apigenin<sup>46</sup>, isokvercetin, kamferol-arabinosid, kvercetin-3,7-glukosid, kvercetin-3-arabinosyl-glukosid, rutin<sup>5</sup>) a organické karboxykyseliny ((–)-feruloyl-D-jablečná, fumarová, (–)-kaffeoyl-D-jablečná, kávová, (–)-*p*-kumaroyl-D-jablečná, chlorogenová<sup>5</sup>, ferulová, 3-hydroxybenzoová, protokatechová<sup>85</sup>, *p*-kumarová, sinapová<sup>46</sup>). Studie uvádějí především jejich antioxidační aktivitu, použitelnou např. při konzervaci<sup>46</sup>. Deriváty kyseliny kávové, ferulové a *p*-kumarové vykazovaly cholagogní účinek<sup>86</sup>. Mezi další účinky kys. kávové byla zjištěna inhibice spasmolytické aktivity<sup>87</sup>, inhibice xantinoxidasy<sup>88</sup> a HIV-1 integrasy<sup>89</sup>. Kys. kávová společně s kys. chlorogenovou inhibují

peroxidaci mastných kyselin LDL lipoproteinů<sup>90,91</sup>, aktivují některé jaterní enzymy<sup>92</sup> a mají určité hepatoprotektivní účinky<sup>93</sup>. Kys. kávová podávaná profylakticky potlačuje mutagenitu aflatoxinu B1 a *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidinu, zatímco kys. chlorogenová potlačuje pouze mutagenitu aflatoxinu B1<sup>94</sup>. Kys. chlorogenová pozitivně ovlivňuje vstřebávání železa z GIT<sup>95,96</sup> a indukuje cytotoxicitu v linii lidských buněk orálního nádoru<sup>97</sup>. Estery kys. fumarové se už přes půl století používají k léčbě lupénky<sup>98,99</sup>, nově byla kys. fumarová jako nosič schválena k léčbě roztroušené sklerózy<sup>100,101</sup>.



## 5 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 5.1 Materiál a vybavení

#### 5.1.1 Rozpouštědla a chemikálie

- chloroform p. a. ( $\text{CHCl}_3$ ) (Penta a.s.),
- ethanol 95%, denaturovaný methanolem, p. a. (EtOH) (Penta a.s.),
- toluen p. a. (to) (Penta a.s.),
- diethylamin p. a. ( $\text{Et}_2\text{NH}$ ) (LachNer),
- cyklohexan p. a. (cHx) (Penta a.s.),
- lékařský benzín lékopisné kvality ČL 2009 (LB) (Penta a.s.),
- hexan p. a. (Hx) (Penta a.s.),
- destilovaná voda ( $\text{H}_2\text{O}$ ),
- dusičnan bismutitý zásaditý p. a. (Dr. Kulich Pharma, s.r.o.),
- kyselina vinná p. a. (Dr. Kulich Pharma, s.r.o.),
- jodid draselný p. a. (Dr. Kulich Pharma, s.r.o.),
- Dragendorffovo činidlo – skládá se z roztoků **A** a **B** v poměru 1:1,

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

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

#### 5.1.2 Chemikálie použité při stanovení inhibičních aktivit

- 10mM acetylthiocholin jodid (Sigma-Aldrich),
- 10mM butyrylthiocholin jodid (Sigma-Aldrich),
- 5mM fosfátový pufr, pH 7,4 (složení: dihydrát dihydrogenfosforečnanu sodného (Lachema), dodekahydrát hydrogenfosforečnanu disodného (Lachema)),
- 5mM 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina  $\geq 98\%$  (Sigma-Aldrich),
- huperzin A (TAZHONGHUI – Tai'an zhonghui Plant Biochemical Co., Ltd., China),
- galanthamin hydrobromid (Changsha Organic Haerb Inc., China),
- dimethylsulfoxid p. a. (DMSO) (Sigma-Aldrich),
- 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 (Sigma-Aldrich),
- 1,4-dioxan (Lachema).

#### 5.1.3 Chromatografické adsorbenty

- komerční Kieselgel SiO<sub>2</sub> GF254 (firma Merck), velikost 20 × 20 cm, hliníková deska s vrstvou silikagelu pro TLC s hloubkou vrstvy 0,2 mm,
- oxid hlinitý (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) deaktivovaný 6% H<sub>2</sub>O, stupeň deaktivace Brockmann III (firma ACROSS), velikost zrn 40-200 μm.

#### 5.1.4 Pomocné látky

- křemelina Celite C 535 John's Manville (firma Sigma-Aldrich).

#### 5.1.5 Přístrojové vybavení

- plynový chromatograf s hmotnostním detektorem Agilent Technologies 7890 A GC 5975 inert MSD (Agilent Technologies Santa Clara, California, USA),
- NMR Varian Iniova 500 (Varian, USA),
- vakuová odparka Büchi Rotavapor R-114 (Büchi, Flawil, Switzerland),
- Polarimetr ADP 220 BS (Bellingham + Stanley Ltd., Kent, UK),
- Büchi Melting Point B-540 (Büchi, Flawil, Switzerland),
- Reader Synergy™ HT Multi-Detection Microplate Reader (BioTek, USA),
- ELISA reader EL800 (Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA),
- mikrotitrační destičky, 96 jamek,
- centrifuga Boeco U-32R, rotor Hettich 1611,
- centrifuga Avanti J-301, rotor JA-30.50.

#### 5.1.6 Rostlinný a ostatní materiál

Sušenou nať rostliny *Fumaria officinalis* L. (Fumariaceae) dodala firma Megafyt s.r.o. z Vraného nad Vltavou. Verifikaci provedl prof. RNDr. Lubomír Opletal, CSc. Dokladové vzorky jsou uloženy v herbáři Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové.

Ke stanovení cholinesterasových inhibičních aktivit byla použita AChE z lidských erytrocytárních pouzder a BuChE z lidské plazmy. Krev daroval PharmDr. Jakub Chlebek, Ph.D.

## **5.2 Obecné postupy práce**

### **5.2.1 Příprava a čištění rozpouštědel**

Před použitím byla všechna rozpouštědla přečištěna destilací a uchována chráněna před světlem v hnědých skleněných stojátkách.

### **5.2.2 Odpařování extraktů a frakcí**

Jednotlivé frakce získané při sloupcové nebo preparativní chromatografii byly odpařeny na vodní lázni ve vakuové odparce při 40 °C.

### **5.2.3 Sušení a skladování frakcí a izolovaných čistých látek**

Získané odpařené frakce a čisté látky byly sušeny v exsikátoru minimálně 24 hodin a následně umístěny v chladničce při 2-8 °C.

### **5.2.4 Preparativní TLC**

Skleněné desky o velikosti 15 × 15 cm se zbavily mastnoty a nečistot a nalila se na ně vodná suspenze silikagelu. Desky se nechaly min. 24 hodin volně vyschnout před použitím.

### **5.2.5 Detekce alkaloidů, TLC detekce**

Přítomnost alkaloidů se zjišťuje v oblasti UV světla při vlnové délce 254 a 366 nm. Následuje postřik Dragendorffovým činidlem, které slouží k detekci alkaloidů a látek, které ve své molekule obsahují dusík (především terciární a sekundární aminy). Přítomné alkaloidy se zbarví žlutě, červeně, oranžově či hnědě.

## **5.3 Strukturní analýza**

### **5.3.1 GC-MS analýza**

Hmotnostní spektra byla měřena na plynovém chromatografu s hmotnostním detektorem Agilent Technologies 7890 A GC 5975 inert MSD pracujícím v režimu EI při 70 eV. Separace byla provedena na koloně DP-5 MS (30 m × 0,25 mm × 0,25 μm, výrobce Agilent Technologies Santa CLARA, California, USA). Program byl nastaven v teplotním gradientu od 100 °C rychlostí 15 °C/min do teploty 180 °C, která byla udržována 1 min. Dále teplota stoupala rychlostí 5 °C/min do teploty 300 °C, která byla udržována po 40 min. Teplota injektoru byla 280 °C, teplota detektoru 200 °C, rychlost průtoku nosného plynu (helium) byla nastavena na rychlost 0,8 ml/min. Detekční rozmezí bylo m/z 35-600. 1 μl alkaloidního roztoku (1 mg/ml) byl nastříknut ve „split mode“ při poměru 1:10. Identifikace alkaloidů probíhala porovnáním získaných spekter se spektry v knihovně NIST, v literatuře a se spektry referenčních látek dříve izolovaných na Katedře farmaceutické botaniky a ekologie (KFBE).

### **5.3.2 NMR analýza**

NMR spektra byla měřena na přístroji Varian Iniova 500 s pracovní frekvencí pro  $^1\text{H}$  499,9 MHz a pro  $^{13}\text{C}$  125,7 MHz. Pro měření  $^1\text{H}$  spektra byla použita inverzní 5 mm ID PFG sonda při standardních pulzních frekvencích. Pro měření  $^{13}\text{C}$  spektra byla použita 5 mm SW širokopásmá sonda. Měření bylo prováděno při 25 °C v deuteriochloroformu. Hodnoty  $^1\text{H}$  spekter jsou vztaženy k inertnímu standardu hexamethyldisilanu (0,04 ppm) a hodnoty  $^{13}\text{C}$  spekter jsou vztaženy k signálu rozpouštědla (76,99 ppm).

### **5.3.3 Optická otáčivost**

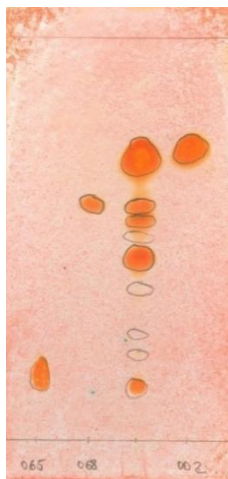
Optická otáčivost byla měřena v polarimetru ADP 220 BS při 25 °C v prostředí chloroformu.

### **5.3.4 Teplota tání**

Teplota tání byla měřena v bodotávku Büchi Melting Point B-540 s rychlostí výhřevnosti 15 °C/min do 10 °C před předpokládanou teplotou tání dané látky a pak s postupným stoupáním 0,5 °C/min do maximální teploty, která byla o 10 °C vyšší než předpokládaná teplota tání dané látky.

## 5.4 Izolace alkaloidů

Jednotlivé alkaloidy byly separovány z frakce A4, která vznikla spojením frakcí č. 77-87. Tyto frakce byly získány sloupcovou chromatografií sumárního diethyletherového alkaloidního extraktu za použití lékařského benzínu, chloroformu a ethanolu jako mobilní fáze<sup>6,7</sup>. Frakce A4 vážila 9,6 g a pomocí TLC a následné detekce byla zjištěna přítomnost 5 alkaloidů.



Obrázek 3: Analytická TLC frakce A4 v porovnání se standardy

V porovnání s látkami dříve izolovanými na KFBE byla zjištěna pravděpodobná přítomnost protopinu, (-)-fumaricinu a (+)-fumarilinu.

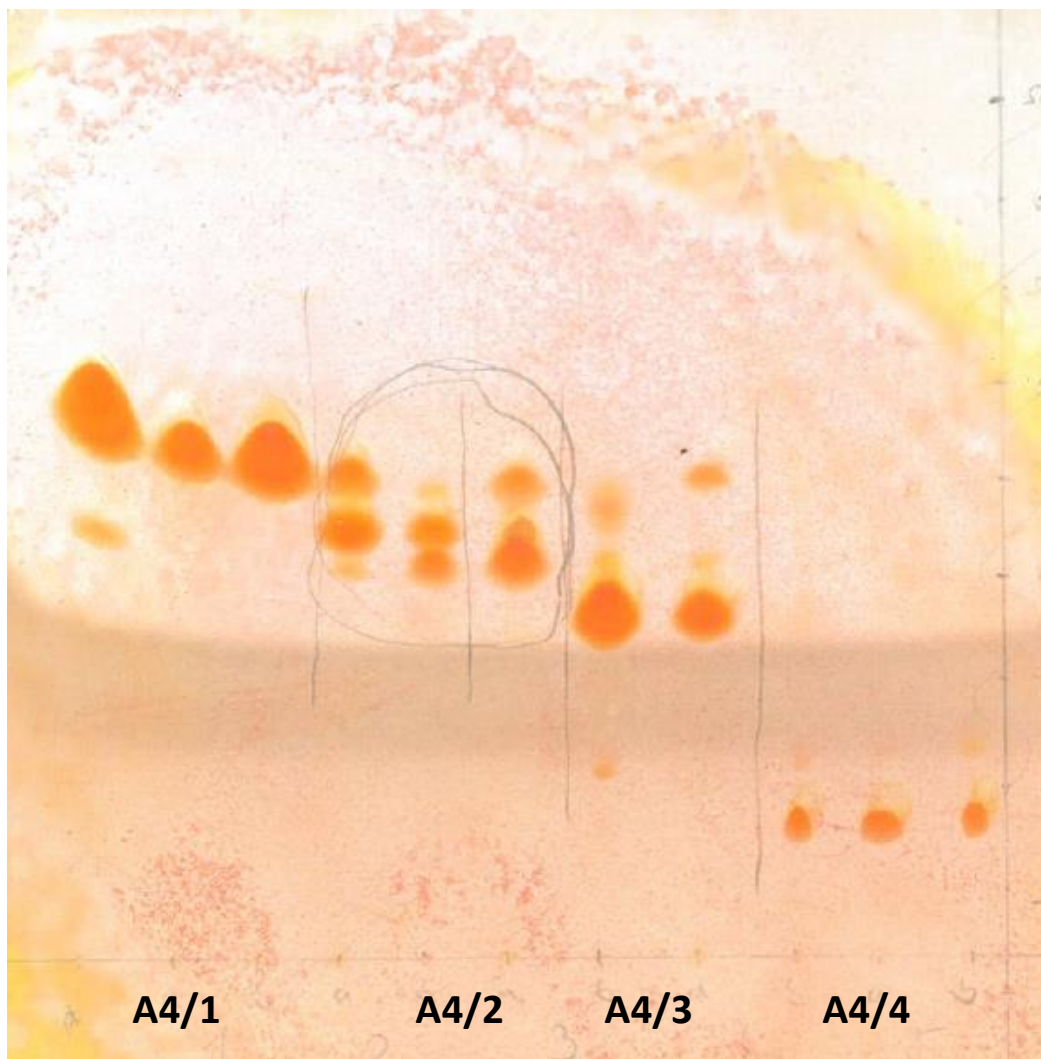
Celá frakce byla rozpuštěna v chloroformu a podrobena opakované krystalizace ze směsi  $\text{CHCl}_3$  + EtOH. Díky většinovému zastoupení bylo získáno 5,7 g čistých krystalů látky LM-1. Zbývající část frakce byla rozdělena za pomoci 90 preparativních litých TLC desek ( $\text{SiO}_2$  GF254, 15 × 15 cm, dráha 13 cm, počet vyvíjení 4×) na 4 zóny v mobilní fázi  $\text{CH}_x + \text{to} + \text{Et}_2\text{NH}$  (65:30:5).

### 5.4.1 Alkaloidy první zóny (A4/1)

Tato frakce vážící 1,7 g po porovnání se standardem obsahovala převážně protopin (LM-1) a nebyla dále zpracovávána.

### 5.4.2 Alkaloidy druhé zóny (A4/2)

425 mg frakce bylo dále preparativně rozděleno pomocí 28 TLC desek ( $\text{SiO}_2$  GF254, 20 × 10 cm, dráha 8,5 cm, počet vyvíjení 3×) na 3 podfrakce za použití mobilní fáze  $\text{CH}_x + \text{to} + \text{Et}_2\text{NH}$  (8:1:1). První část s nejvyšším retenčním faktorem ( $R_f$  0,65) nebyla dále zpracovávána, obsahovala protopin. Z druhé části ( $R_f$  0,5) bylo izolováno 71 mg látky LM-2, výtěžnost 16,7%. Krystalizací třetí části z  $\text{CHCl}_3$  + EtOH bylo získáno 62,5 mg látky LM-3, výtěžnost 14,7%.



Obrázek 4: Kontrolní TLC rozdělené frakce A4

#### 5.4.3 Alkaloidy třetí zóny (A4/3)

Ze třetí zóny bylo krystalizací získáno 670 mg látky LM-1 a zbytek (340 mg) byl nanesen na 10 preparativních TLC desek ( $\text{SiO}_2$  GF254,  $15 \times 15$  cm, dráha 12 cm, počet vyvíjení  $2 \times$ ) a vyvíjen v mobilní fázi  $\text{CH}_x + \text{to} + \text{Et}_2\text{NH}$  (45:50:5). Bylo dosaženo oddělení znečištění a část s alkaloidem (183 mg) byla vyškrábnuta, eluována a krystalizována ze směsi  $\text{CHCl}_3 + \text{EtOH} + \text{LB}$ . Získáno bylo 76,5 mg bílých krystalů čisté látky LM-4, výtěžnost 41,8%.

#### 5.4.4 Alkaloidy čtvrté zóny (A4/4)

Vyškrábáním zóny, elucí alkaloidů z adsorbentu směsí a krystalizací z  $\text{CHCl}_3 + \text{EtOH}$  bylo získáno 61,5 mg látky LM-5. Z původní váhy frakce 311 mg byla výtěžnost necelých 20%.

## 5.5 Stanovení inhibiční aktivity alkaloidů a alkaloidních extraktů vůči erythrocytární AChE a sérové BuChE

### 5.5.1 Podmínky měření

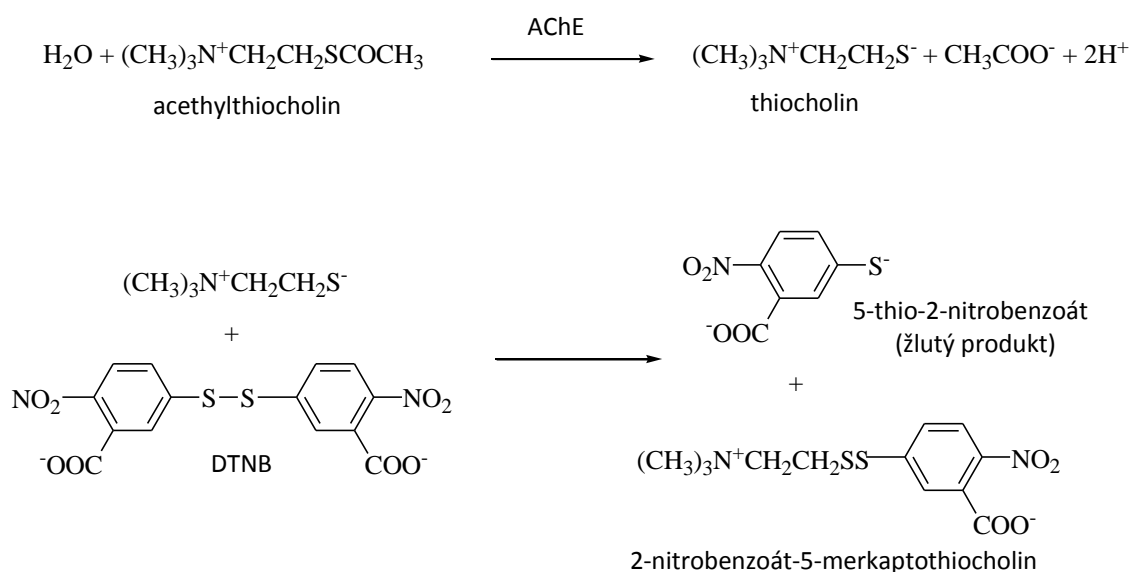
Měření bylo prováděno za podmínek podobných těm, které jsou v těle člověka, tedy při teplotě 37 °C a v prostředí fosfátového pufru pH 7,4. Spektrofotometrem se měřilo při vlnové délce 436 nm v mikrotitračních destičkách.

### 5.5.2 Získání AChE a BuChE

Na 10 ml čerstvě odebrané krve bylo přidáno 1 ml citrátu sodného. Plazma, ve které se vyskytuje BuChE, byla odstředěna za použití centrifugy při rychlosti 4000 otáček/min. Erythrocyty byly přemístěny do 50 ml zkumavek a 3× promyty 5mM fosfátovým pufrem o pH 7,4 s 15mM chloridem sodným při 12000 ot./min. Promyté erythrocyty byly opět smíchány s 5mM fosfátovým pufrem na dobu 10 minut, aby došlo k jejich rozkladu. Rozložené erythrocyty byly 10 minut centrifugovány při rychlosti 20000 ot./min a nakonec 3 × promyta fosfátovým pufrem, tím byla získána erythrocytární AChE.

### 5.5.3 Stanovení cholinesterasové inhibiční aktivity (hodnoty IC<sub>50</sub>)

Ke stanovení inhibiční aktivity cholinesteras byla použita modifikovaná Ellmanova spektrofotometrická metoda. Jako substráty jsou použity estery thiocholinu, které jsou štěpeny na cholin a příslušnou kyselinu. Thiocholin se váže svou –SH skupinou na 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoovou kyselinu (DTNB) za vzniku žlutého zbarvení<sup>102</sup>.



Obrázek 5: Ellmanova metoda<sup>102</sup>

Měřilo se při vlnové délce 436 nm a sledoval se nárůst absorbance vznikajícího žlutého produktu během 1 minuty. Inhibiční aktivita (hodnoty  $IC_{50}$ ) byla vypočítána z naměřených hodnot nelineární regrese v programu GraphPad Prism (verze 5.02 pro Windows, GraphPad Software, San Diego, California, USA). Výsledky byly porovnány se známými hodnotami používaných inhibitorů cholinesteras galanthaminem, huperzinem A a fysostigminem.

## **5.6 Stanovení inhibiční aktivity alkaloidů a alkaloidních extraktů vůči prolyloligopeptidase**

### **5.6.1 Podmínky měření**

Měření bylo prováděno za podmínek podobných těm, které jsou v těle člověka, tedy při teplotě 37 °C a v prostředí fosfátového pufru o pH 7,4. Spektrofotometrem se měřilo při vlnové délce 405 nm v mikrotitračních destičkách.

### **5.6.2 Stanovení inhibiční aktivity**

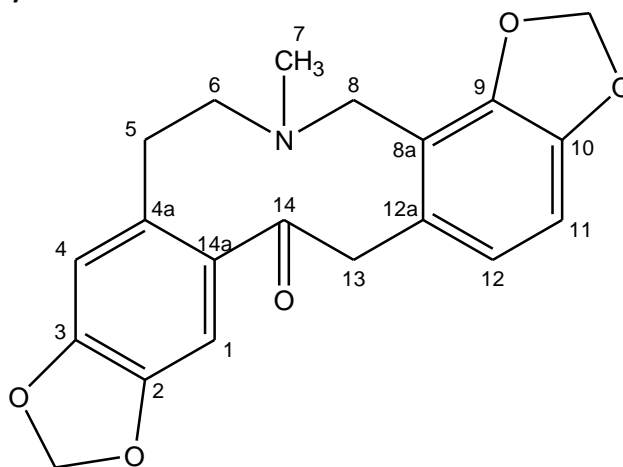
POP byla rozpuštěna v 0,01 M fosfátovém pufru (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl), její specifická aktivita byla 0,2 U/ml. Základní roztoky testovaných látek byly připraveny rozpuštěním v 10 mM dimethylsulfoxidu, které se dále ředily podle potřeby. Kontrolní roztoky byly připraveny ředěním DMSO. Z-Gly-Pro-*p*-nitroanilid, POP substrát, byl rozpuštěn v 40% 10 mM 1,4-dioxanu. Pro každé měření byly roztoky 5 min inkubovány při teplotě 37 °C, poté byl přidán substrát a dále inkubováno 30 min. Vznikající žlutohnědý *p*-nitroanilin byl spektrofotometricky měřen. Inhibiční aktivita (hodnoty  $IC_{50}$ ) byla vypočítána z naměřených hodnot v programech Microsoft Excel a GraphPad Prism<sup>103</sup>. Výsledky byly porovnány se známými hodnotami používaných inhibitorů POP syntetickým Z-Pro-prolinalem a přírodním bajkalinem.



## 6 VÝSLEDKY

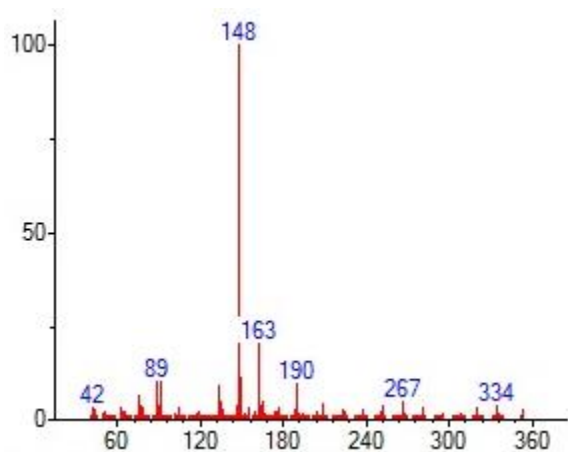
### 6.1 Strukturní analýza

#### 6.1.1 protopin (LM-1)



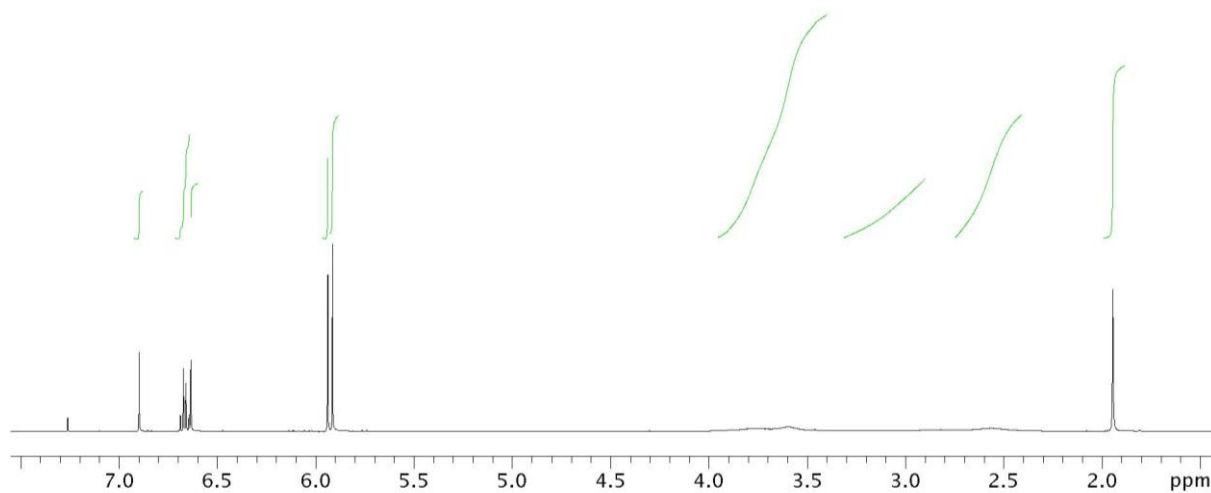
Obrázek 6: Struktura protopinu (LM-1)

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



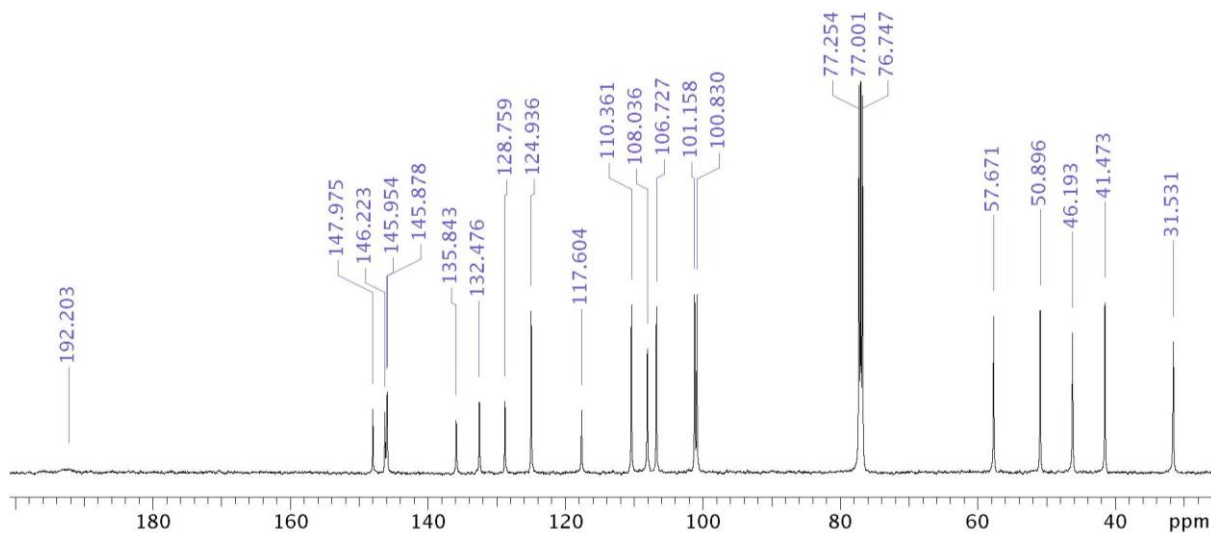
Obrázek 7: Hmostnostní spektrum protopinu

**<sup>1</sup>H NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 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<sub>3</sub>).



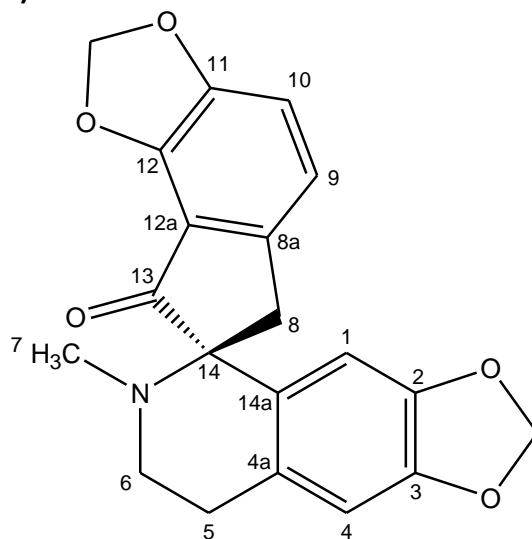
Obrázek 8: <sup>1</sup>H NMR spektrum protopinu

**<sup>13</sup>C NMR** (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 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<sub>3</sub>), 31.5 (C5).



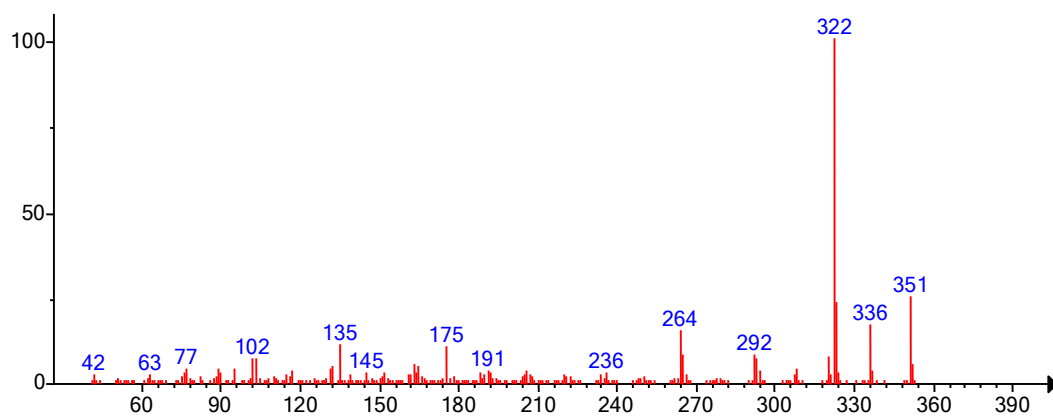
Obrázek 9: <sup>13</sup>C NMR spektrum protopinu

### 6.1.2 (+)-fumarilin (LM-2)



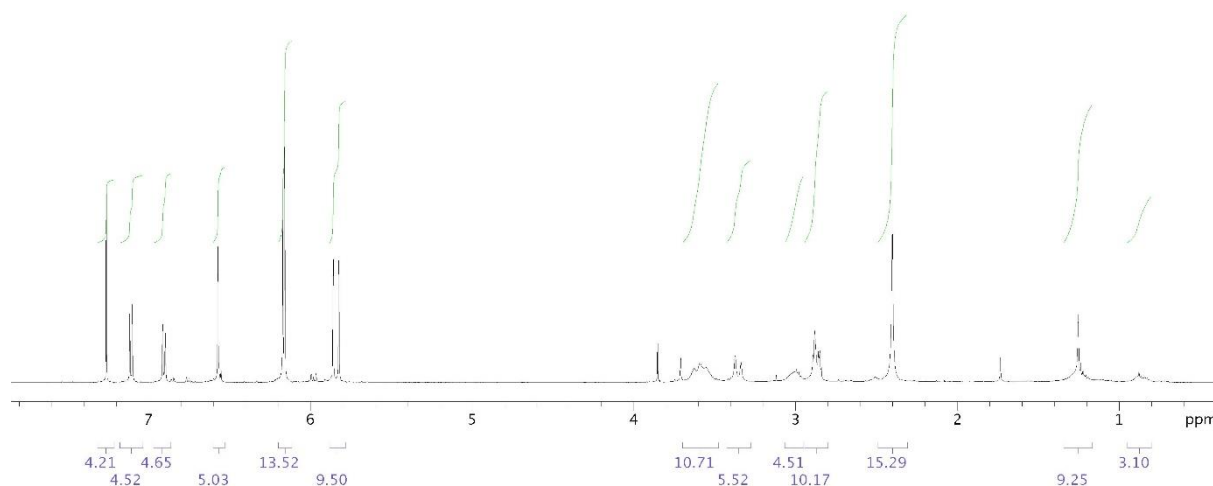
Obrázek 10: Struktura (+)-fumarilinu (LM-2)

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



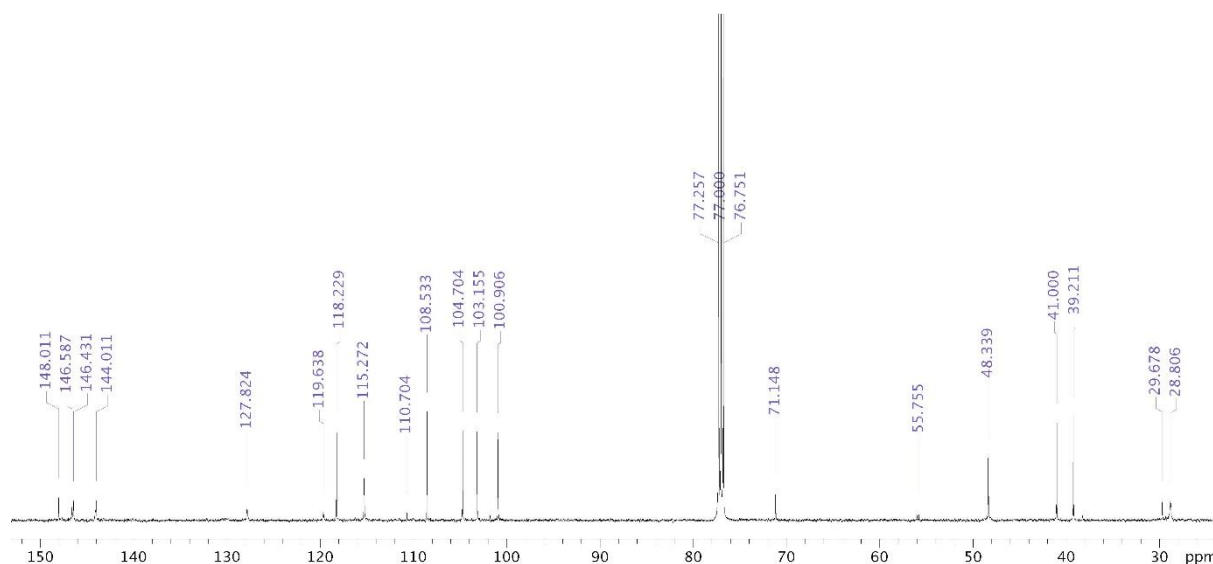
Obrázek 11: Hmotnostní spektrum (+)-fumarilinu

**$^1\text{H}$  NMR** (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  7.22 (1H, d,  $J=8.0$  Hz, H10), 7.00 (1H, d,  $J=8.0$  Hz, H9), 6.62 (1H, s, H4), 6.17 (2H, s, 11,12- $\text{OCH}_2\text{O}$ -), 6.09 (1H, s, H1), 5.84 (2H, dd,  $J=6.5, 1.0$  Hz, 2,3- $\text{OCH}_2\text{O}$ -), 3.63 (1H, d,  $J=18.5$  Hz, H8), 3.54-3.47 (1H, m, H6), 3.29 (1H, d,  $J=18.5$  Hz, H8), 2.98-2.94 (1H, m, H6), 2.94-2.90 (2H, m, H5), 2.39 (3H, s, N -  $\text{CH}_3$ ).



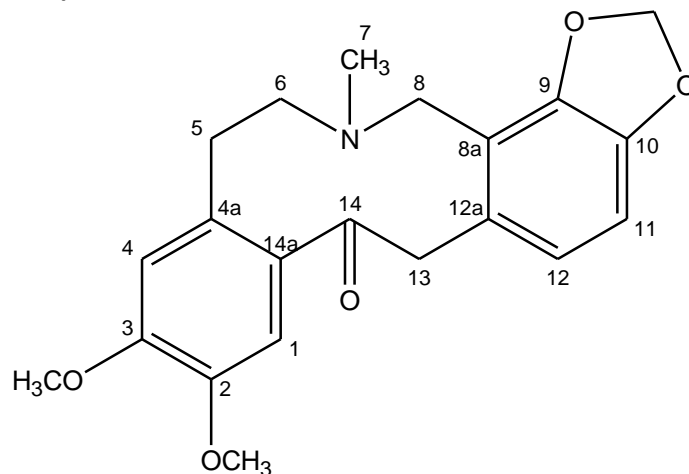
Obrázek 12:  $^1\text{H}$  NMR (+)-fumarilinu

**$^{13}\text{C}$  NMR**: (125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  204.9 (C13), 149.8 (C11), 148.5 (C3), 148.2 (C2), 145.9 (C12), 145.1 (C8a), 131.0 (C14a), 128.5 (C4a), 120.4 (C12a), 119.7 (C9), 116.9 (C10), 109.4 (C4), 105.3 (C1), 104.9 (11,12- $\text{OCH}_2\text{O}$ -), 102.5 (2,3- $\text{OCH}_2\text{O}$ -), 72.8 (C14), 49.4 (C6), 40.9 (C8), 39.3 (N -  $\text{CH}_3$ ), 29.1 (C5).



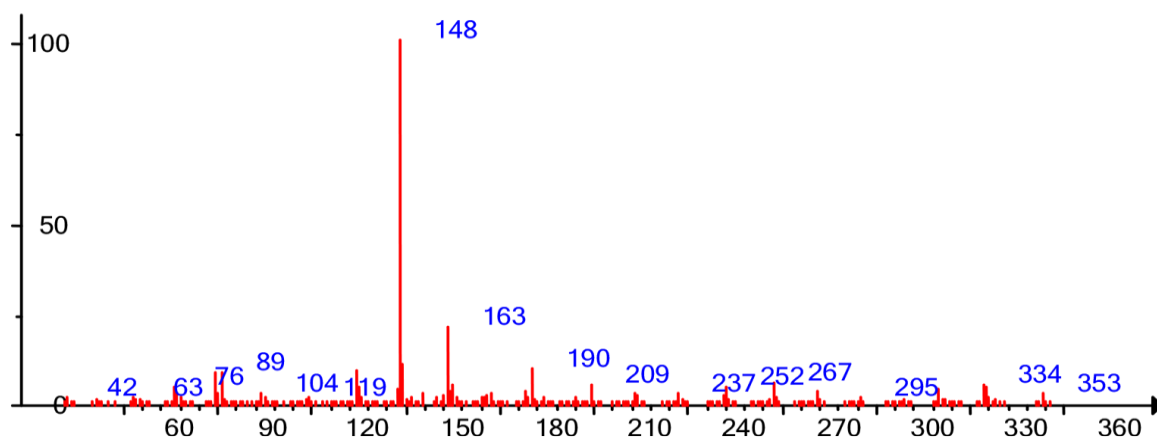
Obrázek 13:  $^{13}\text{C}$  NMR spektrum (+)-fumarilinu

### 6.1.3 kryptopin (LM-3)



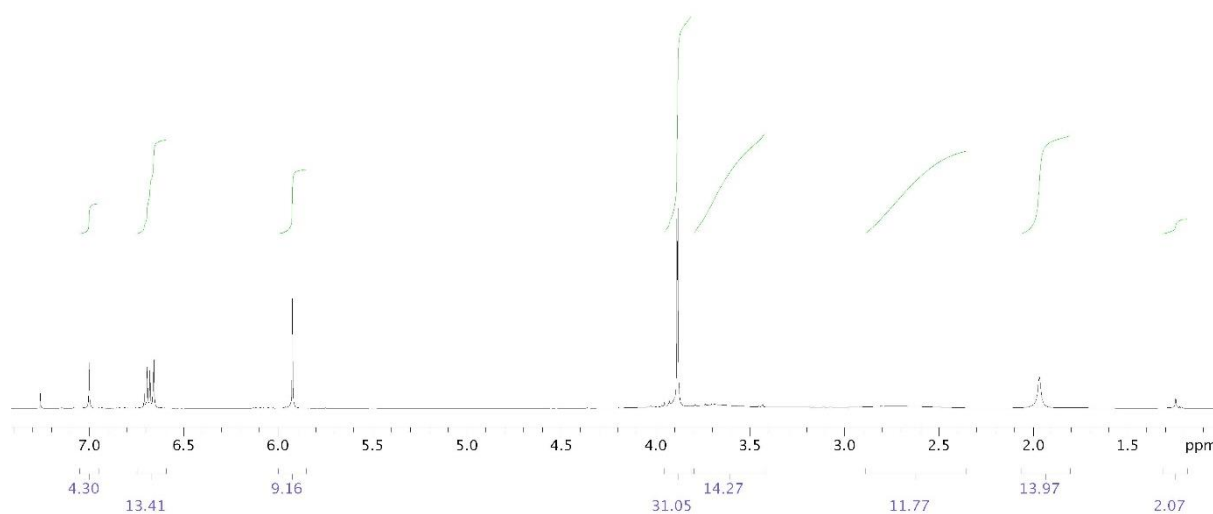
Obrázek 14: Struktura kryptopinu (LM-3)

**EI-MS** (m/z): 369(2), 267(3), 190(6), 179(21), 148(100), 135(2).



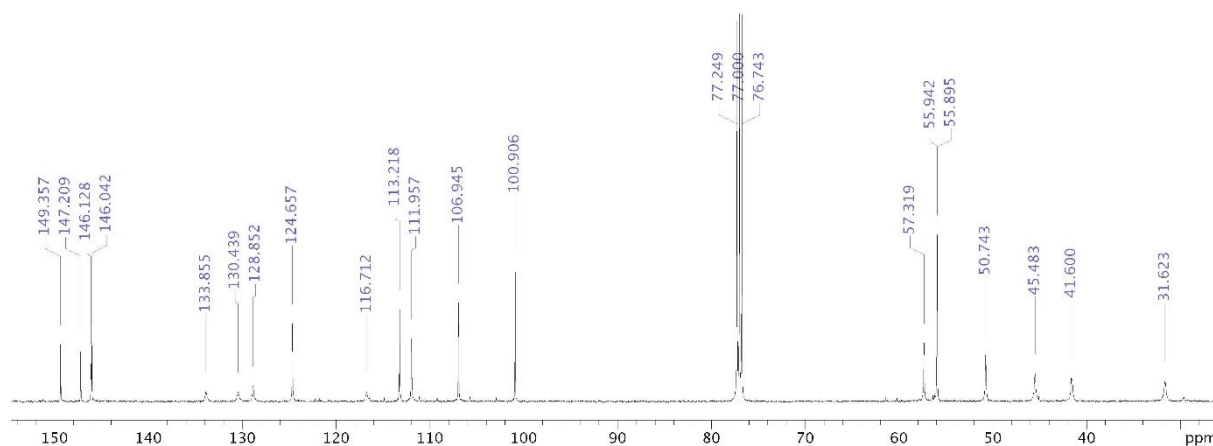
Obrázek 15: Hmotnostní spektrum kryptopinu

**$^1\text{H}$  NMR** (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 7.00 (1H, s, H1), 6.70 (1H, d,  $J = 8.0$  Hz, H11), 6.67 (1H, d,  $J = 8.0$  Hz, H12), 6.66 (1H, s, H4), 5.92 (2H, s,  $\text{OCH}_2\text{O}$ ), 3.89 (3H, s,  $\text{OCH}_3$ ), 3.88 (3H, s,  $\text{OCH}_3$ ), 3.81-3.47 (4H, m, H13, H8), 2.95-2.80 (2H, m, H5), 2.80-2.65 (2H, m, H6), 1.97 (3H, s, N -  $\text{CH}_3$ ).



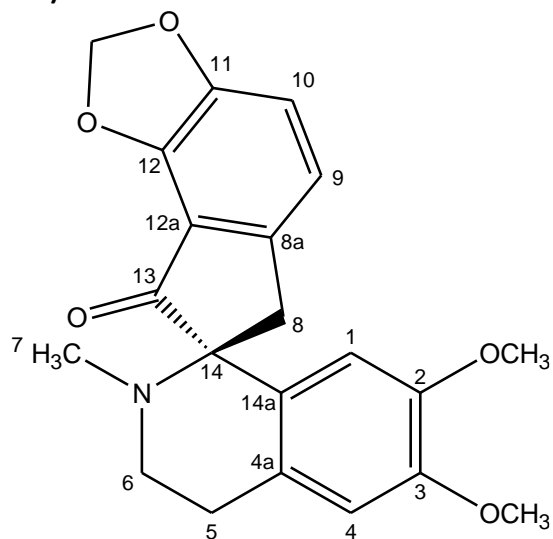
Obrázek 16:  $^1\text{H}$  NMR spektrum kryptopinu

**$^{13}\text{C}$  NMR** (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 194.0 (C14), 149.4 (C3), 147.2 (C2), 146.1 (C9), 146.0 (C10), 135.9 (C14a), 130.4 (C4a), 128.9 (C12a), 124.7 (C12), 116.7 (C8a), 113.2 (C4), 112.0 (C1), 106.9 (C11), 100.9 ( $\text{OCH}_2\text{O}$ ), 57.3 (C6), 55.9 ( $\text{OCH}_3$ ), 55.9 ( $\text{OCH}_3$ ), 50.7 (C8), 45.5 (C13), 41.6 (N -  $\text{CH}_3$ ), 31.6 (C5).



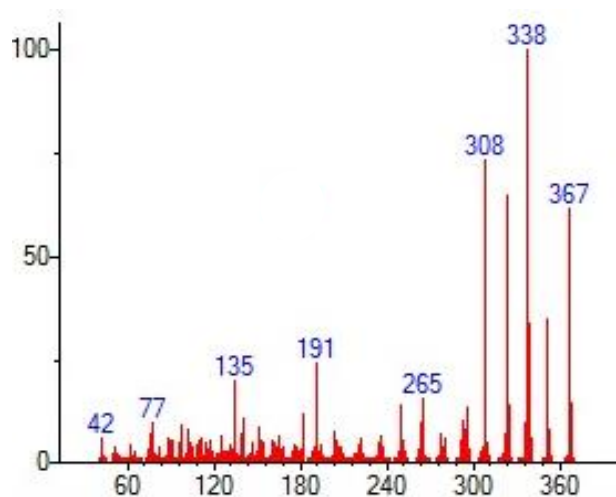
Obrázek 17:  $^{13}\text{C}$  NMR spektrum kryptopinu

#### 6.1.4 (+)-parfumidin (LM-4)



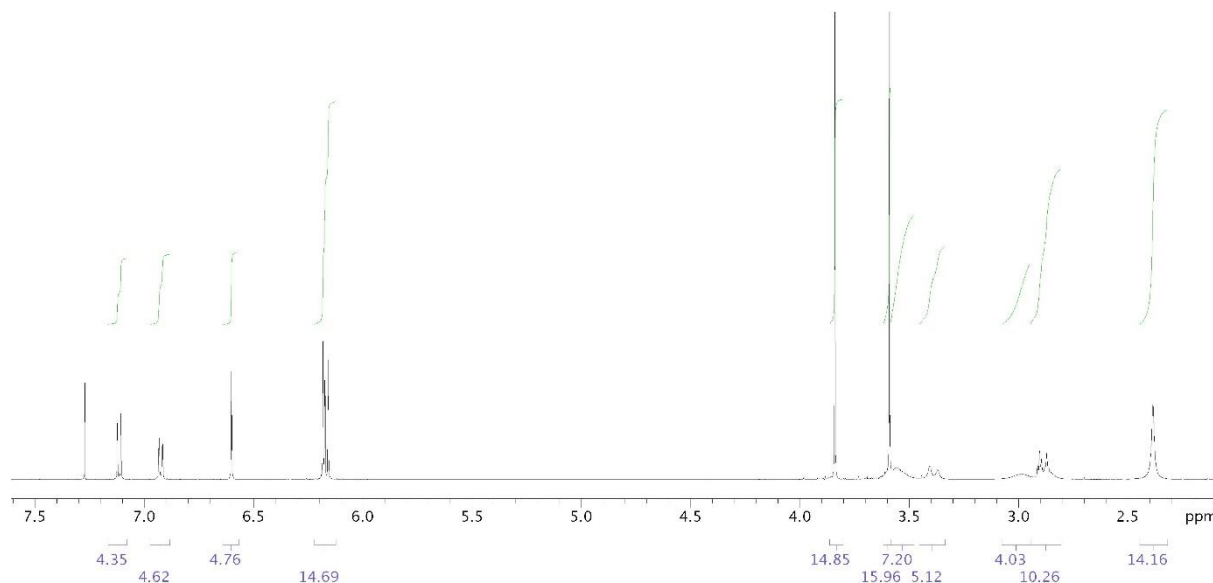
Obrázek 18: Struktura (+)-parfumidinu (LM-4)

**EI-MS** (m/z): 367(61), 338(100), 308(73), 324(65), 352(35), 339(33), 265(15), 191(24), 135(19).



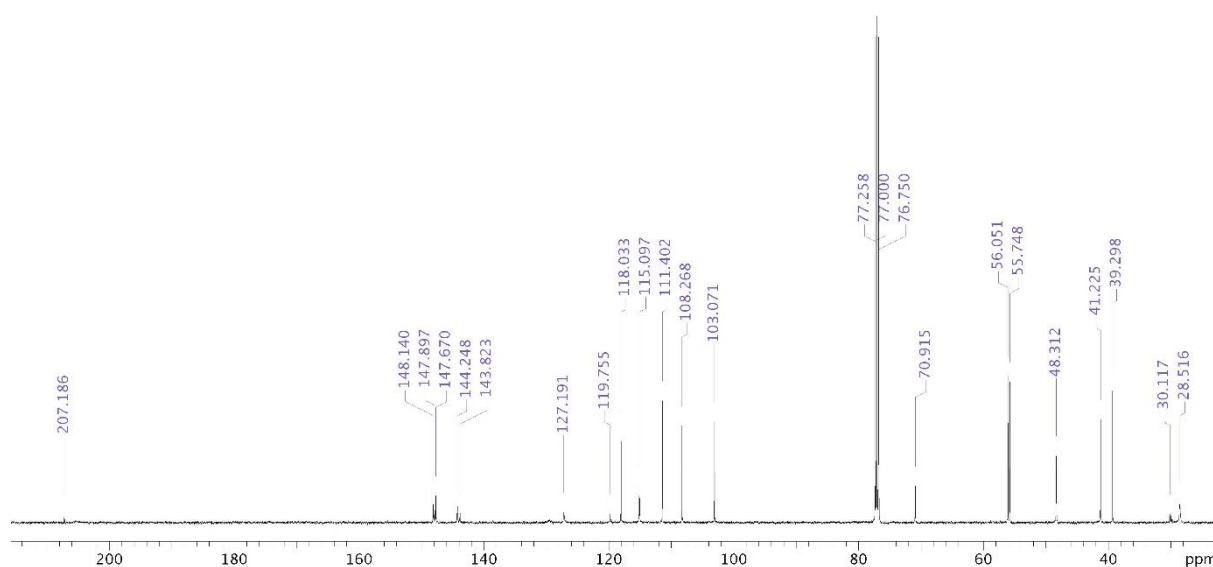
Obrázek 19: Hmotnostní spektrum (+)-parfumidinu

**<sup>1</sup>H NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 7.11 (1H, d, J = 7.9 Hz, H11), 6.91 (1H, d, J = 7.9 Hz, H12), 6.59 (1H, s, H4), 6.17 (1H, s, H1), 6.16 (1H, d, J = 1.2 Hz, OCH<sub>2</sub>O), 6.14 (1H, d, J = 1.2 Hz, OCH<sub>2</sub>O), 3.83 (3H, s, C3 - OCH<sub>3</sub>), 3.58 (3H, s, C2 - OCH<sub>3</sub>), 3.56 (1H, d, J = 17.9 Hz, H13), 3.53-3.47 (1H, m, H6), 3.37 (1H, d, J = 17.9 Hz, H13), 2.98-2.91 (1H, m, H5), 2.91-2.81 (2H, m, H5, H6), 2.36 (3H, s, N7 - CH<sub>3</sub>).



Obrázek 20: <sup>1</sup>H NMR spektrum (+)-parfumidinu

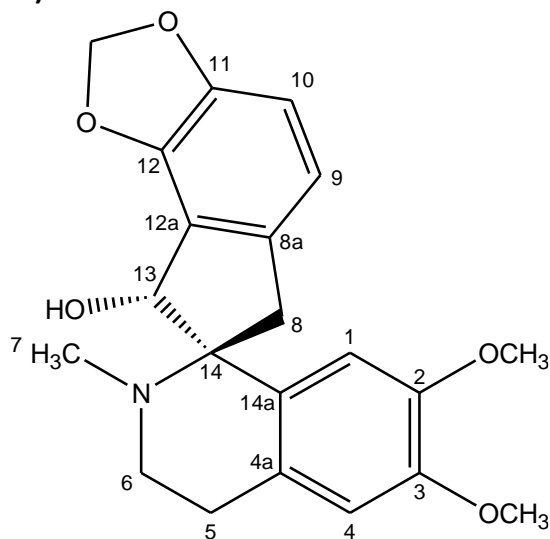
**<sup>13</sup>C NMR** (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 207.2 (C8), 148.1 (C3), 147.9 (C10), 147.7 (C2), 144.2 (C12a), 143.8 (C9), 129.5 (C14a), 127.2 (C4a), 119.8 (C8a), 118.0 (C12), 115.1 (C11), 111.4 (C4), 108.3 (C1), 103.1 (OCH<sub>2</sub>O), 70.9 (C14), 56.1 (C2-OCH<sub>3</sub>), 55.7 (C3-OCH<sub>3</sub>), 48.3 (C6), 41.2 (C13), 39.3 (N7 - CH<sub>3</sub>), 28.5 (C5).



Obrázek 21: <sup>13</sup>C NMR spektrum (+)-parfumidinu

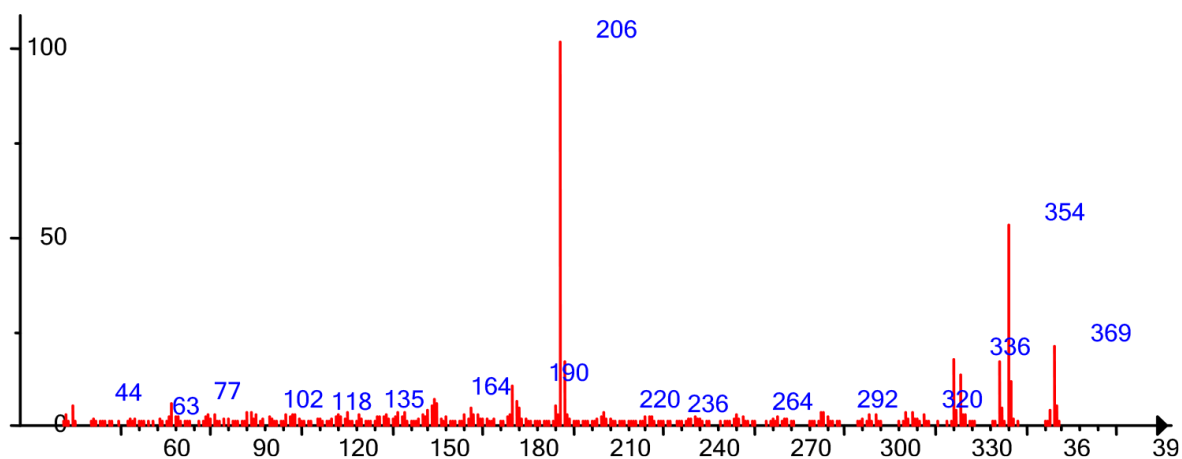


### 6.1.5 (-)-fumaricin (LM-5)



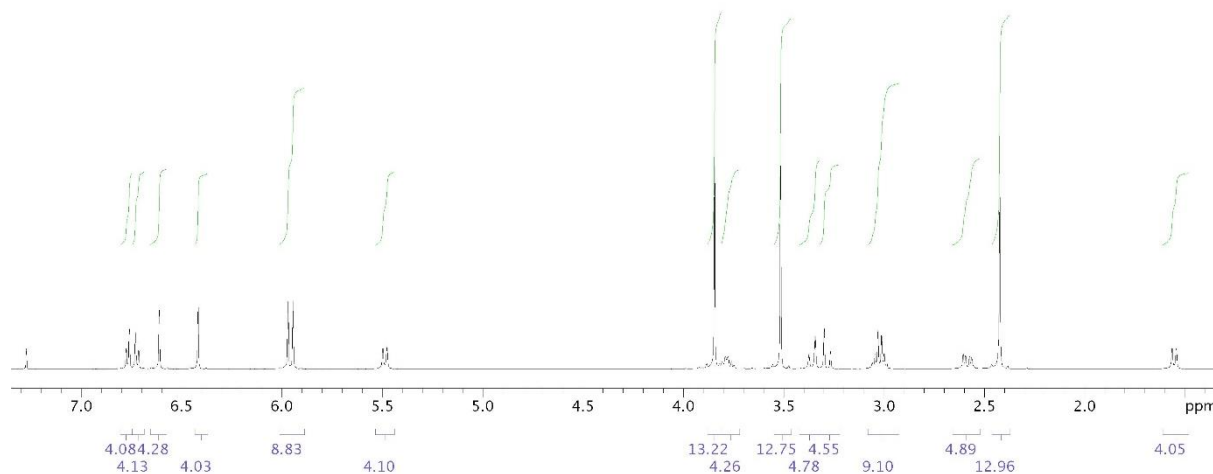
Obrázek 22: Struktura (-)-fumaricinu (LM-5)

**EI-MS** (m/z): 369(21), 354(52), 336(17), 206(100), 190(10).



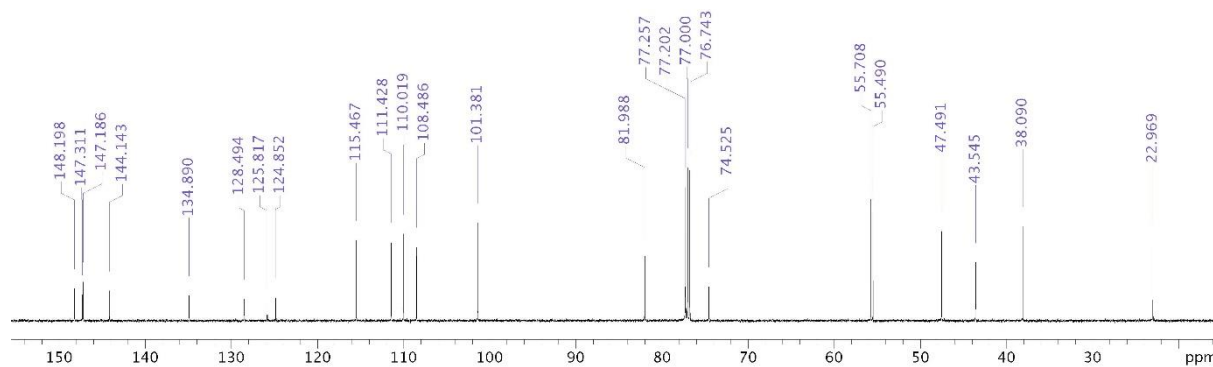
Obrázek 23: Hmotnostní spektrum (-)-fumaricinu

**$^1\text{H}$  NMR** (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $25^\circ\text{C}$ ): 2.41, s, 3H (N - Me); 2.57, m, 1H, (H-5a); 2.97-3.06, m, 2H, (H-65a, H-5b); 3.28, dd, 1H, (H-13a); 3.34, dd, 1H, (H-13b); 3.51, s, 3H, (2-OCH<sub>3</sub>); 3.78, m, (H-6b); 3.84, s, 3H, (3-OCH<sub>3</sub>); 4.56, brs, 1H, (H-8); 5.94, d, 1H, (-O-CH<sub>2</sub>-O-); 5.97, d, 1H, (-O-CH<sub>2</sub>-O-); 6.41, s, 1H, (H-1); 6.61, s, 1H, (H-4); 6.72, ddd, 1H, (H-12); 6.76, dd, 1H, (H-11).



Obrázek 24:  $^1\text{H}$  NMR spektrum (-)-fumaricinu

**$^{13}\text{C}$  NMR** (125 Hz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $25^\circ\text{C}$ ): 23.03, t, (C-5); 38.15, q, (N - Me); 43.64, t, (C-13); 47.53, t, (C-6); 55.52, q, (2-OCH<sub>3</sub>); 55.73, q, (3-OCH<sub>3</sub>); 74.51, s, (C-7); 82.10, d, (C-8); 101.40, t, (-O-CH<sub>2</sub>-O-); 108.51, d, (C-11); 110.03, d, (C-1); 111.46, d, (C-4); 115.48, d, (C-12); 124.92, s, (C-8a); 125.93, s, (C-7a); 128.62, s, (C-4a); 134.98, s, (C-12a); 144.16, s, (C-9); 147.18, s, (C-2); 147.31, s, (C-10); 148.19, s, (C-3).



Obrázek 25:  $^{13}\text{C}$  NMR spektrum (-)-fumaricinu

## 6.2 Teplota tání izolovaných alkaloidů

| Izolovaný alkaloid |      | Teplota tání                        |
|--------------------|------|-------------------------------------|
| protopin           | LM-1 | 205-206 °C                          |
| (+)-fumarillin     | LM-2 | nestanoveno<br>(amorfní sloučenina) |
| kryptopin          | LM-3 | 219-220 °C                          |
| (+)-parfumidin     | LM-4 | 171-172 °C                          |
| (-)-fumaricin      | LM-5 | 174-176 °C                          |

Tabulka 1: Teploty tání izolovaných alkaloidů

## 6.3 Specifická optická otáčivost izolovaných alkaloidů

| Izolovaný alkaloid | Specifická optická otáčivost $[\alpha]^{25}_D$ |
|--------------------|--|
| (+)-fumarillin     | +77 (c, 0,09 v $\text{CHCl}_3$ )               |
| (+)-parfumidin     | +28,4 (c, 0,099 v $\text{CHCl}_3$ )            |
| (-)-fumaricin      | -21 (c, 0,146 v $\text{CHCl}_3$ )              |

Tabulka 2: Specifická optická otáčivost izolovaných alkaloidů

## 6.4 Inhibiční aktivity izolovaných alkaloidů

| Izolovaný alkaloid | AChEi ( $\text{IC}_{50}$ $\mu\text{M}$ ) | BuChEi ( $\text{IC}_{50}$ $\mu\text{M}$ ) | POPi ( $\text{IC}_{50}$ $\mu\text{M}$ ) |
|--------------------|--|---|---|
| protopin           | 345,4 $\pm$ 24                           | 239,6 $\pm$ 22,3                          | > 1000                                  |
| (+)-fumarillin     | > 1000                                   | 330,6 $\pm$ 31,2                          | > 1000                                  |
| kryptopin          | 477,71 $\pm$ 47,33                       | 270,82 $\pm$ 39,12                        | > 1000                                  |
| (+)-parfumidin     | 674,92 $\pm$ 85,57                       | > 1000                                    | 99,2                                    |
| (-)-fumaricin      | > 1000                                   | > 1000                                    | > 1000                                  |
| galanthamin        | 1,710 $\pm$ 0,065                        | 42,30 $\pm$ 1,30                          | nestanoveno                             |
| huperzin A         | 0,033 $\pm$ 0,001                        | > 1000                                    | nestanoveno                             |
| fysostigmin        | 0,063 $\pm$ 0,001                        | 0,130 $\pm$ 0,004                         | nestanoveno                             |
| Z-Pro-prolinal     | nestanoveno                              | nestanoveno                               | 3,269 $\pm$ 0,02 $\times 10^{-3}$       |
| bajkalin           | nestanoveno                              | nestanoveno                               | 0,6059 $\pm$ 0,021 $\times 10^3$        |

Tabulka 3: Inhibiční aktivity izolovaných alkaloidů

## 7 DISKUSE

V dnešní době patří inhibitory acetylcholinesterasy k nejpoužívanějším léčivům AD. Zjistilo se, že v pozdním stadiu onemocnění hraje větší roli butyrylcholinesterasa než u zdravého člověka. Proto se hledají nové látky s inhibičním účinkem obou enzymů.

V rámci screeningu na Katedře farmaceutické botaniky a ekologie FaF UK vykazoval celkový ethylacetátový extrakt *Fumaria officinalis* L. inhibiční aktivitu  $IC_{50} AChE = 39,2 \pm 1,96 \mu\text{g/ml}$  a  $IC_{50} BuChE = 40,32 \pm 1,9 \mu\text{g/ml}$ . Měření probíhalo na enzymech získaných z lidské krve upravenou Ellmanovou spektrofotometrickou metodou. Celkový extrakt byl rozdělen na podfrakce a cílem této práce bylo izolovat čisté alkaloidy z podfrakce A4, jejich identifikace a stanovení biologických aktivit vůči AChE, BuChE a POP.

Podařilo se izolovat 5 alkaloidů, které byly na základě NMR a GC-MS spekter porovnaných s literaturou, teploty tání a optické otáčivosti, identifikovány jako protopin, kryptopin, (–)-fumaricin, (+)-fumarilin a (+)-parfumidin.

Získané hodnoty inhibiční aktivity cholinesteras byly vyjádřeny jako  $IC_{50}$  (pokles aktivity enzymu o 50 %) a porovnány s přírodními látkami galanthaminem ( $IC_{50} AChE 1,710 \pm 0,065 \mu\text{M}$ ,  $IC_{50} BuChE 42,30 \pm 1,30 \mu\text{M}$ ), huperzinem A ( $IC_{50} AChE 0,033 \pm 0,001 \mu\text{M}$ ,  $IC_{50} BuChE$  bez aktivity) a fysostigminem ( $IC_{50} AChE 0,063 \pm 0,001 \mu\text{M}$ ,  $IC_{50} BuChE 0,130 \pm 0,004 \mu\text{M}$ ), které slouží jako standardy inhibiční aktivity cholinesteras. Ze získaných hodnot (protopin  $IC_{50} AChE 345,4 \pm 24 \mu\text{M}$ ,  $IC_{50} BuChE 239,6 \pm 22,3 \mu\text{M}$ ; kryptopin  $IC_{50} AChE 477,71 \pm 47,33 \mu\text{M}$ ,  $IC_{50} BuChE 270,82 \pm 39,12 \mu\text{M}$ ; (–)-fumaricin  $IC_{50} AChE$  bez aktivity,  $IC_{50} BuChE$  bez aktivity; (+)-fumarillin  $IC_{50} AChE$  bez aktivity,  $IC_{50} BuChE 330,6 \pm 31,2 \mu\text{M}$ ; (+)-parfumidin  $IC_{50} AChE 674,92 \pm 85,57 \mu\text{M}$ ,  $IC_{50} BuChE$  bez aktivity) je patrné, že ani jeden z alkaloidů nedosahuje takových aktivit jako standardy, ani že není nositelem inhibiční aktivity sumárního alkaloidního extraktu.

Další biologická aktivita zkoumaná u izolovaných alkaloidů byla inhibice prolyloligopeptidasy. Ve srovnání se standardy, Z-Pro-prolinalem ( $IC_{50} POP 3,269 \pm 0,02 \text{ nM}$ ) a bajkalinem ( $IC_{50} POP 605,9 \pm 0,021 \mu\text{M}$ ), vykazoval aktivitu pouze (+)-parfumidin. Oproti bajkalinu vykazuje (+)-parfumidin vyšší inhibiční aktivitu ( $IC_{50} POP 99,2 \mu\text{M}$ ), ovšem nedosahuje takových inhibičních aktivit jako syntetický Z-Pro-prolinal.

Žádný z izolovaných alkaloidů, kromě (+)-parfumidinu, nevykazuje vůči zkoumaným enzymům vyšší inhibiční aktivitu, ovšem tyto látky budou podrobeny dalším biologickým testům v potencionální léčbě AD (inhibice BACE1, antioxidační aktivita, inhibice agregace A $\beta$ ).

## 8 LITERATURA

- <sup>1</sup> Pidrman V.: *Demence*. Grada, Praha 2007.
- <sup>2</sup> Raboch J., Jiráček R., Paclt I.: *Psychofarmakologie pro praxi*. Triton, Praha 2005.
- <sup>3</sup> Čahlíková L., Macáková K., Benešová N., Chlebek J., Hošťálková A., Opletal L.: *Stud. Nat. Prod. Chem.* **42**, 153 (2014).
- <sup>4</sup> Berkov S., Bastida J., Nikolova M., Viladomat F., Codina C.: *Phytochem. Anal.* **19**, 411 (2008).
- <sup>5</sup> Soušek J., Valešová M.: *Chem. listy* **89**, 489 (1995).
- <sup>6</sup> Kassemová D.: *Diplomová práce*. Univerzita Karlova, Hradec Králové 2013.
- <sup>7</sup> Šafratová M.: *Diplomová práce*. Univerzita Karlova, Hradec Králové 2013.
- <sup>8</sup> Seidl Z., Obenberger J.: *Neurologie pro studium i praxi*. Grada, Praha 2004.
- <sup>9</sup> Sonsalla P. K., v knize: *Modern Pharmacology With Clinical Applications*. (eds. Craig C. R., Stitzel R. E.), kap. 31. Lippincott Williams & Wilkins, USA 2004.
- <sup>10</sup> O'Brien R. J., Wong P. C.: *Annu. Rev. Neurosci.* **34**, 185 (2011).
- <sup>11</sup> Götz J., Ittner L. M., Kins S.: *J. Neurochem.* **98**, 993 (2006).
- <sup>12</sup> Akiyama H., Barger S., Barnum S., Bradt B., Bauer J., Cole G. M., Cooper N. R., Eikelenboom P., Emmerling M., Fiebich B. L., Finch C. E., Frautschy S., Griffin W. S. T., Hampel H., Hull M., Landreth G., Lue L.-F., Mucke R., Mackenzie I. R., McGeer P. L., O'Banion M. K., Pachter J., Pasinetti G., Plata-Salman C., Rogers J., Rydel R., Shen Y., Streit W., Strohmayer R., Tooyoma I., van Muiswinkel F. L.: *Neurobiol. Aging* **21** (3), 383 (2000).
- <sup>13</sup> Khoury J. E., Hickman S. E., Thomas C. A., Loike C. D., Silverstein S. C.: *Neurobiol. Aging* **19** (1), S81 (1998)
- <sup>14</sup> Giacobini E.: *Int. J. Geriatr. Psychiatry* **18**, S1 (2003).
- <sup>15</sup> Selkoe D. J.: *Physiol. Rev.* **81**, 741 (2001).
- <sup>16</sup> Lipton S. A., Nicotera P.: *Cell Calcium* **23** (2-3), 165 (1998).
- <sup>17</sup> Puttonen K. A., Lehtonen S., Raasmaja A., Männistö P. T.: *Toxicol. In Vitro* **20**, 1446 (2006).
- <sup>18</sup> Hort J., v knize: *Kognitivní poruchy a demence*. (ed. Rektorová I.), kap. 1. Triton, Praha 2007.
- <sup>19</sup> Bartoš A., v knize: *Kognitivní poruchy a demence*. (ed. Rektorová I.), kap. 5. Triton, Praha 2007.
- <sup>20</sup> Jiráček R., Koukolík F.: *Demence: neurobiologie, klinický obraz, terapie*. Galén, Praha 2004.
- <sup>21</sup> Opletal L.: *Nutraceutika, primární metabolity a látky obsažené ve strukturovaných biologických systémech*. Karolinum, Praha 2010.
- <sup>22</sup> Scott L. J., Goa K. L.: *Drugs* **60** (5), 1095 (2000).
- <sup>23</sup> Ma X., Tan Ch., Zhu D., Gang D. R., Xiao P.: *J. Ethnopharmacol.* **113** (1), 15 (2007).
- <sup>24</sup> Zhang H. Y., Tang X. C.: *Trends Pharmacol. Sci.* **27** (12), 619 (2006).
- <sup>25</sup> Zhang H. Y., Zheng Ch. Y., Yan H., Wang Z. F., Tang L. L., Gao X., Tang X. C.: *Chem.-Biol. Interact.* **175** (1-3), 396 (2008).
- <sup>26</sup> Yang G., Wang Y., Tian J., L. J. P.: *PLoS ONE* **8**(9), e74916 (2013).
- <sup>27</sup> Camps P., Cusack B., Mallender W. D., El AChab R., Morral J., Munoz-Torrero D., Rosenberry T. L.: *Mol. Pharmacol.* **57** (2), 409 (2000).
- <sup>28</sup> Cannudas A. M., Pubill D., Sureda F. X., Verdaguer E., Camps P., Munoz-Torrero D., Jiménez A., Camins A., Pallàs M.: *Exp. Neurol.* **180** (2), 123 (2003).
- <sup>29</sup> Alcalá M. M., Maderuleo A., Vivas N. M., Camps P., Munoz-Torretto D., Clos M. V., Badia A.: *Neurosci. Lett.* **379** (2), 106 (2005).
- <sup>30</sup> Tariot P. N., Farlow M. R., Grossberg G. T., Graham S. M., McDonald S., Gergel I.: *JAMA J. Am. Med. Assoc.*, **291** (3), 317 (2004).
- <sup>31</sup> Mazza M., Capuano A., Bria P., Mazza S.: *European Journal of Neurology* **13** (9), 981 (2006).
- <sup>32</sup> Barnard N. D., Bush A. I., Ceccarelli A., Cooper J., de Jager C. A., Erickson K. I., Fraser G., Kesler S., Levin S. M., Lucey B., Morris M. C., Squitti R.: *Neurobiol. Aging* **35** (2), S74 (2013).
- <sup>33</sup> Ubhi K., Rockenstein E., Vasquez-Roque R., Mante M., Inglis Ch., Patrick Ch., Adame A., Fahnstock M., Doppler E., Novak P., Moessler H., Masliah E.: *J. Neurosci. Res.* **91** (2), 167 (2013).
- <sup>34</sup> Lim G. P., Yang F., Chu T., Chen P., Beech W., Teter B., Tran T., Ubeda O., Hsiao Ashe K., Frautschy S. A., Cole G. M.: *J. Neurosci.* **20** (15), 5709 (2000).
- <sup>35</sup> Schenk D., Barbour R., Dunn W., Gordon G., Grajeda H., Guido T., Hu K., Huang J., Johnson-Wood K., Khan K., Kholodenko D., Lee M., Liao Z., Lieberburg I., Motter R., Mutter L., Soriano F., Shopp G., Vasquez N., Vandeventer Ch., Walker S., Wogulis M., Yednock T., Games D., Seubert P.: *Nature* **400**, 173 (1999).
- <sup>36</sup> Orgogozo J.-M., Gilman S., Dartigues J.-F., Laurent B., Puel M., Kirby L. C., Jouanny P., Dubois B., Eisner L., Flitman S., Michel B. F., Boada M., Frank A., Hock C.: *Neurology* **61** (1), 46 (2003).

- <sup>37</sup> Jahodář L.: *Farmakobotanika, semenné rostliny*. Karolinum, Praha 2006.
- <sup>38</sup> Jirásek V., Starý F.: *Kapesní atlas léčivých rostlin*. SPN, Praha 1989.
- <sup>39</sup> Hruška B.: *Jak se léčit rostlinami*. Josef Hokr, Praha (bez roku vydání).
- <sup>40</sup> Garms H.: *Rostliny a živočichové, příručka k určování*. Knižné centrum, Žilina 1995.
- <sup>41</sup> <http://www.pfaf.org/user/Plant.aspx?LatinName=Fumaria+officinalis>, staženo 23.7.2014.
- <sup>42</sup> Khattak S. G., Gilani S. N., Ikram M.: *J. Ethnopharmacol.* **14**, 45 (1985).
- <sup>43</sup> Hilal S. H., Aboutabl E. A., Youssef S. A. H., Shalaby M. A., Sokkar N. M.: *Plantes Med. Phytother.* **23**, 109 (1989).
- <sup>44</sup> Al-Shaibani I. R. M., Phulan M. S., Shiekh M.: *Int. J. Agric. Biol.* **11**, 431 (2009)
- <sup>45</sup> Gorbunov N. P., Molokhova L. G., Sukhanov A. A.: *Khim. Farm. Zh.* **11**, 56 (1991).
- <sup>46</sup> Ivanov I. G., Vrancheva R. Z., Marchev A. S., Petkova N. T., Aneva I. Y., Denev P. P., Georgiev V. G., Pavlov A. I.: *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.* **3** (2), 296 (2014).
- <sup>47</sup> Maiza-Benabdesselam F., Khentache S., Bougoffa K., Chibane M., Adach S., Chapeleur Y., Max H., Laurain-Mattar D.: *Rec. Nat. Prod.* **1** (2-3), 28 (2007).
- <sup>48</sup> Gilani A. H., Janbazz K. H., Shoaib Akhtar M.: *Gen. Pharmacol.* **27** (6), 979 (1996).
- <sup>49</sup> Orhan I. E., Sener B., Musharraf S. G.: *Exp. Toxicol. Pathol.* **64** (3), 206 (2012).
- <sup>50</sup> Rao Ch., Verma A., Gupta P., Vijayakumar M.: *Acta Pharm.* **57** (4), 491 (2007).
- <sup>51</sup> Pandey G., Kumar G. R., Gupta S. S., Ojha S. K., Rao Ch, V.: *Br. J. Pharm. Res.* **4** (2), 257 (2014).
- <sup>52</sup> Gilani A. H., Bashir S., Janbaz K.H., Khan A.: *J. Ethnopharmacol.* **96** (3), 585 (2005).
- <sup>53</sup> Southen I. W., Buckingham J.: *Dictionary of Alkaloids*. Chapman and Hall, New York 1989.
- <sup>54</sup> Sarma B. K., Pandey V. B., Mishra G. D., Singh U. P.: *Folia Microbiol.* **44** (2), 164 (1999).
- <sup>55</sup> Kim D. K., Lee K. T., Baek N. I., Kim S. H., Park H. W., Lim J. P., Shin T. Y., Eom D. O., Yang J. H., Eun J. S.: *Arch. Pharm. Res.* **27**, 1127 (2004) .
- <sup>56</sup> Orhan I., Özcelik B., Karaoglu T., Sener B.: *Z. Naturforsch.* **62c**, 19 (2007).
- <sup>57</sup> Aljofan M., Netter H. J., Aljarbou A. N., Hadda T. B., Orhan I. E., Sener B., Mungall B. A.: *Arch. Virol.* **159**, 1119 (2014).
- <sup>58</sup> Preininger V., v knize: *The Alkaloids* (ed. Arnold Brossi), vol. 29, kap. 1. Academic Press, London 1986.
- <sup>59</sup> Shamma M. (ed): *The Isoquinoline Alkaloids: chemistry and pharmacology*. Academic Press, NY 1972.
- <sup>60</sup> Adsersen A., Kjolbye A., Dall O., Jäger A. K.: *J. Ethnopharmacol.* **113** (1), 179 (2007)
- <sup>61</sup> Soušek J., Guédon D., Adam T., Bochořáková H., Táborská E., Válka I., Šimánek V.: *Phytochem. Anal.* **10**, 6 (1999).
- <sup>62</sup> Misík V., Bezáková L., Máleková L., Kostálová D.: *Planta Med.* **61** (4), 372 (1995)
- <sup>63</sup> Wangchuk P., Keller P. A., Pyne S. G., Willis A. C., Kamchonwongpaisan S.: *J. Ethnopharmacol.* **143** (1), 310 (2012).
- <sup>64</sup> Correché E. R., Andujar S. A., Kurdelas R. R., Gómez Lechón M. J., Freile M. L., Enriz R. D.: *Bioorg. Med. Chem.* **16** (7), 3641 (2008).
- <sup>65</sup> Kong W. J., Zhao Y. L., Xiao X. H., Li Z. L., Jin C., Li H.B.: *J. Appl. Microbiol.* **107** (4), 1072 (2009).
- <sup>66</sup> Ro J. S., Lee S. S., Lee K. S., Lee M. K.: *Life Sci.* **70** (6), 639 (2001).
- <sup>67</sup> Jang M. H., Kim H. Y., Kang K. S., Yokozawa T., Park J. H.: *Arch. Pharm. Sci. Res.* **32** (3), 341 (2009).
- <sup>68</sup> de Sousa Falcao H., Leite J. A., Barbosa-Filho J. M., de Athayde-Filho P. F., de Oliveira Chaves M. C., Moura M. D., Ferreira A. L., de Almeida A. B. A., Souza-Brito A. R. M., de Fátima Formiga Mello Diniz M., Batista L. M.: *Molecules* **13**, 3198 (2008)
- <sup>69</sup> Satou T., Koga M., Matsushashi R., Koike K., Tada I., Nikaido T.: *Vet. Parasitol.* **104** (2), 131 (2002).
- <sup>70</sup> Ji H. Y., Liu K. H., Lee H., Im S. R., Shim H. J., Son M., Lee H. S.: *Molecules* **16** (8), 6591 (2011).
- <sup>71</sup> Chlebek J., Macáková K., Cahlíková L., Opletal L., Kuneš J., Kurfürst M.: *Planta Med.* **57**, 77 (2011).
- <sup>72</sup> Jang S. I., Kim B. H., Lee W.-Y., An S. J., Choi H. G., Jeon B. H., Chung H.-T., Rho J.-R., Kim Y.-J., Chai K.-Y.: *Arch. Pharm. Sci. Res.* **27** (9), 923 (2004).
- <sup>73</sup> Li W., Huang H., Zhang Y., Fan T., Liu X., Xing W., Niu X.: *Eur. J. Pharmacol.* **715** (1-3), 62 (2013).
- <sup>74</sup> Li W., Huang H., Niu X., Fan T., Mu Q., Li H.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **272** (1), 21 (2013).
- <sup>75</sup> Bentley K. W.: *The Isoquinoline Alkaloids*. Harwood Academic Publishers, Amsterdam 1998.
- <sup>76</sup> Lee S. S., Kai M., Lee M. K.: *Phytother. Res.* **15**, 167 (2001).
- <sup>77</sup> Wang G.-X., Zhou Z., Jiang D.-X., Han J., Wang J.-F., Zhao L.-W., Li J.: *Vet. Parasitol.* **171** (3-4), 305 (2010).
- <sup>78</sup> Vrba J., Doležel P., Vičar J., Ulrichová J.: *Toxicol. In Vitro* **23** (4), 580 (2009).
- <sup>79</sup> Dzink J. L., Socransky S. S.: *Antimicrob. Agents Chemother.* **27** (4), 663 (1985).
- <sup>80</sup> Godowski K. C.: *Int. J. Clin. Dent.* **1** (4), 96 (1989).
- <sup>81</sup> Rathí A., Srivastava A. K., Shirwaikar A., Sing Rawat A. K., Mehrotra S.: *Phytomedicine* **15** (6-7), 470 (2008).
- <sup>82</sup> Saeed S. A., Gilani A. H., Majoo R. U., Shah B. H.: *Pharmacol. Res.* **36** (1), 1 (1997).
- <sup>83</sup> Souček J., Vavrecková C., Psotová J., Ulrychová J., Šimánek V.: *Acta Hort.* **501**, 239 (1999)

- 
- <sup>84</sup> Orhan I., Sener B., Choudhary M. I., Khalid A.: *J. of Ethnopharmacol.* 91, 57 (2004).
- <sup>85</sup> Soušek J., Guédon D., Adam T., Bochořáková H., Táborská E., Válka I., Šimánek V.: *Phytochem. Anal.* 10, 6 (1999).
- <sup>86</sup> Czok G., Midani W., Finke R. I.: *Ernährungswiss. Suppl.* 14, 68 (1972).
- <sup>87</sup> Ortiz de Urbina J. J., Martin M. L., Sevilla M. A., Montero M. J., Caron I. R., San Roman L.: *Phytoter. Res.* 4, 71 (1990).
- <sup>88</sup> Chang W. S., Chang Y. H., Lu F. J., Chiang H. C.: *Anticancer Res.* 14, 501 (1994).
- <sup>89</sup> Fesen M. R., Pommier Y., Leteurtre F., Hiroguchi S., Yong J., Kohn K. H.: *Biochem. Pharmacol.* 48, 595 (1994).
- <sup>90</sup> Laranjinha L. A., Almeida L. M., Madeira V. M.: *Biochem. Pharmacol.* 48, 487 (1994).
- <sup>91</sup> Zhang J., Stanley R. A., Melton L. D.: *Mol. Nutr. Food Res.* 50, 714 (2006).
- <sup>92</sup> Kitts D. D., Wijewickrene A. N.: *Plant Foods Hum. Nutr.* 45, 287 (1994).
- <sup>93</sup> Paya M. Ferrarandiz M. L., Sanz M. J., Alcaraz N. J.: *Xenobiotica* 23 (3), 327 (1993).
- <sup>94</sup> Francis A. R., Shetty T. K., Bhattacharya R. K.: *Cancer Lett.* 45 (3), 177 (1989).
- <sup>95</sup> Gutnisky A., Rizzo N., Castro N. E., Garbossa G.: *Acta Physiol. Pharmacol. Ther. Latinoam.* 42, 139 (1992).
- <sup>96</sup> Hynes M. J., O`Coinceanainn M.: *J. Inorg. Biochem.* 98, 1457 (2004).
- <sup>97</sup> Jiang Y., Kusama K., Satoh K., Takayama F., Watanabe S., Sakagami H.: *Phytomedicine* 7 (6), 483 (200).
- <sup>98</sup> Altmeyer P. J., Matthes U., Pawlak F., Hoffmann K., Frosch P. J., Ruppert P., Wassilew S. W., Horn T., Kreysel H. W., Lutz G., Barth J., Rietzschel I., Joshi R. K.: *J. Am. Acad. Dermatol.* 30, 977 (1994).
- <sup>99</sup> Ismail N., Collins P., Rogers S., Kirby B., Lally A.: *Br. J. Dermatol.* 171 (2), 397 (2014).
- <sup>100</sup> Haghikia A., Linker R., Gold R.: *Der Nervenarzt* 85 (6), 720 (2014).
- <sup>101</sup> Rugierri S., Tortorella C., Gasperini C.: *Ther. Clin. Risk Manag.* 10, 229 (2014).
- <sup>102</sup> Ellman G. L., Courtney K. D., Andres jr. V., Featherstone R. M.: *Biochem. Pharmacol.* 7 (2), 88 (1961).
- <sup>103</sup> Cahlíková L., Hrabínová M., Kulhánková A., Benešová N., Chlebek J., Jun D., Novák Z., Macáková K., Kuneš J., Kuča K., Opletal L.: *Nat. Prod. Commun.* 8 (11), 1541 (2013).

## 9 ABSTRAKT

Získaný diethyetherový extrakt *Fumaria officinalis* L. byl rozdělen na frakce sloupcovou chromatografií za použití lékařského benzínu, chloroformu a ethanolu. Preparativní TLC a krystalizace vedla k izolaci 5 alkaloidů ze zadané frakce. Alkaloidy byly identifikovány na základě GC-MS,  $^1\text{H}$  a  $^{13}\text{C}$  NMR spekter, optické otáčivosti a teploty tání jako protopin, kryptopin, (-)-fumaricin, (+)-fumarilin a (+)-parfumidin. Izolované alkaloidy byly testovány na jejich inhibiční aktivitu vůči acetyl- a butyrylcholinesterase a vůči prolyloligopeptidase a tyto aktivity  $\text{IC}_{50}$  byly porovnány se standardy. Nejzajímavější aktivitu oproti standardu galanthaminu ( $\text{IC}_{50 \text{ AChE}} 1,710 \pm 0,065 \mu\text{M}$ ,  $\text{IC}_{50 \text{ BuChE}} 42,30 \pm 1,30 \mu\text{M}$ ) vykazoval protopin ( $\text{IC}_{50 \text{ AChE}} 345,4 \pm 24 \mu\text{M}$ ,  $\text{IC}_{50 \text{ BuChE}} 239,6 \pm 22,3 \mu\text{M}$ ) a kryptopin ( $\text{IC}_{50 \text{ AChE}} 477,71 \pm 47,33 \mu\text{M}$ ,  $\text{IC}_{50 \text{ BuChE}} 270,82 \pm 39,12 \mu\text{M}$ ). Žádný z izolovaných alkaloidů nedosahuje takové inhibiční aktivity jako použité standardy. Nejvyšší inhibiční aktivitu POP vykazoval (+)-parfumidin ( $\text{IC}_{50 \text{ POP}} 99,2 \mu\text{M}$ ), dosahující vyšší aktivity než přírodní standard bajkalin ( $\text{IC}_{50 \text{ POP}} 605,9 \pm 0,021 \mu\text{M}$ ), ale není to tak vysoká inhibiční aktivita jakou vykazuje syntetický inhibitor Z-Pro-prolinal ( $\text{IC}_{50 \text{ POP}} 3,269 \pm 0,02 \text{ nM}$ ).

*Fumaria officinalis* L., Fumariaceae, isochinolinové alkaloidy, izolace, acetylcholinesterasa, butyrylcholinesterasa, prolyloligopeptidasa, Alzheimerova choroba, *in vitro* assay.



## 10 ABSTRACT

Obtained diethylether extract of *Fumaria officinalis* L. was separated to fractions in column chromatography with petrol, chloroform and ethanol. Preparative TLC and crystallisation led to isolation of five alkaloids from fraction. Alkaloids were identified by GC-MS and NMR specters, optical rotation and melting point as protopine, cryptopine, (–)-fumaricine, (+)-fumariline and (+)-parfumidine. Isolated alkaloids were tested for their inhibition activity towards acetyl- and butyrylcholinesterase and towards prolyl oligopeptidase. Activities were compared with standards. Natural inhibitor galanthamine showed  $IC_{50\text{ AChE}} 1.710 \pm 0.065 \mu\text{M}$ ,  $IC_{50\text{ BuChE}} 42.30 \pm 1.30 \mu\text{M}$ . Best inhibition activity showed protopine ( $IC_{50\text{ AChE}} 345.4 \pm 24 \mu\text{M}$ ,  $IC_{50\text{ BuChE}} 239.6 \pm 22.3 \mu\text{M}$ ) and cryptopine ( $IC_{50\text{ AChE}} 477.71 \pm 47.33 \mu\text{M}$ ,  $IC_{50\text{ BuChE}} 270.82 \pm 39.12 \mu\text{M}$ ). The highest prolyl oligopeptidase inhibition activity showed (+)-parfumidine with  $IC_{50\text{ POP}} 99.2 \mu\text{M}$ , which was more active than used natural inhibitor baicaline ( $IC_{50\text{ POP}} 605.9 \pm 0.021 \mu\text{M}$ ). Synthetic POP inhibitor Z-Pro-prolinal has  $IC_{50\text{ POP}} 3.269 \pm 0.02 \text{ nM}$ .

*Fumaria officinalis* L., Fumariaceae, isoquinoline alkaloids, isolation, acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase, prolyl oligopeptidase, Alzheimer's disease, *in vitro* assay.