

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

DIPLOMOVÁ PRÁCE

STUDIUM BIOLOGICKÉ AKTIVITY ALKALOIDŮ IZOLOVANÝCH Z ARGEMONE

GRANDIFLORA (PAPAVERACEAE) II.

STUDY OF BIOLOGICAL ACTIVITY OF ISOLATED ALKALOIDS FROM ARGEMONE

GRANDIFLORA (PAPAVERACEAE) II.

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

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

Hradec Králové, 2015 Vojtěch Michal

PROHLÁŠENÍ

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

Hradec Králové,

.....

PODĚKOVÁNÍ

Rád bych poděkoval PharmDr. Jakubu Chlebkovi, PhD. za vedení práce, odborné rady a celkový přístup. Dále bych chtěl poděkovat prof. RNDr. Lubomíru Opletalovi, CSc. a ing. Kateřině Macákové, Ph.D. za změření cholinesterasových inhibičních aktivit izolovaných látek, Mgr. Martině Hrabínové za změření inhibice prolyloligopeptidasy, za měření a interpretaci NMR spekter doc. PharmDr. Jiřímu Kunešovi, Ph.D. a Ing. Miroslavu Ločárkovi za provedení GC-MS analýzy izolovaných látek. Také bych chtěl poděkovat všem ostatním z Katedry farmaceutické botaniky a ekologie za skvělý kolektiv a praktické rady v laboratoři a poskytnuté pracovní podmínky.

SEZNAM ZKRATEK

| | |
|-----------|--------------------------------------|
| A β | β -amyloid |
| AD | Alzheimerova nemoc |
| AChE | acetylcholinesterasa |
| AICD | intracelulární C-terminální fragment |
| APP | amyloid-prekurzorový protein |
| BuChE | butylcholinesterasa |
| CT | počítačová tomografie |
| DM | diabetes mellitus |
| GSK3 | glykogen syntasa kinasa 3 |
| MMSE | Mini-Mental State Examination |
| MRI | magnetická rezonance |
| NMDA | <i>N</i> -methyl-D-aspartát |
| POP | prolyloligopeptidasa |

SEZNAM OBRÁZKŮ

| | |
|---|----|
| Obr. 1 - Štěpení APP fyziologickou cestou a u pacientů s AD | 15 |
| Obr. 2 – <i>Argemone grandiflora</i> Sweet. | 23 |
| Obr. 3 – Pavinany izolované z <i>A. grandiflora</i> | 25 |
| Obr. 4 - Protopiny izolované z <i>A. grandiflora</i> | 26 |
| Obr. 5 - Benzylisochinoliny izolované z <i>A. grandiflora</i> | 27 |
| Obr. 6 - Benzofenanthridiny izolované z <i>A. grandiflora</i> | 28 |
| Obr. 7 - Aporfiny izolované z <i>A. grandiflora</i> | 28 |
| Obr. 8 - Protoberberiny izolované z <i>A. grandiflora</i> | 29 |
| Obr. 9 - Hmotnostní spektrum EtOAc extraktu nati <i>A. grandiflora</i> | 37 |
| Obr. 10 Hmotnostní spektrum EtOAc extraktu kořene <i>A. grandiflora</i> | 38 |
| Obr. 11 - Celkové TLC spojených frakcí | 41 |
| Obr. 12 - Kontrolní TLC frakce 91-135 | 43 |
| Obr. 13 - Kontrolní TLC frakce 141-144 rozdělené na 6 podfrakcí | 44 |
| Obr. 14 - Struktura allokryptopinu | 45 |
| Obr. 15 - hmotnostní spektrum allokryptopinu | 45 |
| Obr. 16 - ¹ H NMR spektrum allokryptopinu | 46 |
| Obr. 17 - ¹³ C NMR spektrum allokryptopinu | 47 |
| Obr. 18 - Struktura (–)-munitaginu | 48 |
| Obr. 19 - Hmotnostní spektrum (–)-munitaginu | 48 |
| Obr. 20 - ¹ H NMR spektrum (–)-munitaginu | 49 |
| Obr. 21 - ¹³ C NMR spektrum (–)-munitaginu | 50 |
| Obr. 22 - Struktura (–)-norargemoninu | 51 |
| Obr. 23 - Hmotnostní spektrum (–)-norargemoninu | 51 |
| Obr. 24 - ¹ H NMR spektrum (–)-norargemoninu | 52 |
| Obr. 25 - ¹³ C NMR spektrum (–)-norargemoninu | 53 |

SEZNAM TABULEK

| | |
|---|----|
| Tabulka 1 - Inhibiční aktivita standardních látek | 36 |
| Tabulka 2 - Biologická aktivita extraktů a standardů | 37 |
| Tabulka 3 - Souhrnné frakce | 40 |
| Tabulka 4 - Biologická aktivita vybraných alkaloidů <i>Argemone grandiflora</i> | 54 |

Obsah

| | |
|--|----|
| 1. Úvod | 11 |
| 2. Cíl diplomové práce..... | 12 |
| 3. Teoretická část | 13 |
| 3.1. Alzheimerova nemoc..... | 13 |
| 3.1.1. Symptomy a epidemiologie | 13 |
| 3.1.2. Diagnostika | 14 |
| 3.1.3. Etiologie | 14 |
| 3.1.3.1. β -amyloid..... | 14 |
| 3.1.3.2. Senilní plaky | 15 |
| 3.1.3.3. Apolipoprotein E | 16 |
| 3.1.3.4. Neuronální klubka | 16 |
| 3.1.3.5. Zánět a oxidativní stres | 17 |
| 3.1.3.6. Další rizikové faktory AD..... | 17 |
| 3.1.4. Farmakoterapie..... | 18 |
| 3.1.4.1. Inhibitory cholinesteras..... | 18 |
| 3.1.4.2. Inhibitory NMDA receptorů..... | 20 |
| 3.1.4.3. Ostatní farmakoterapie | 21 |
| 3.1.5. Potenciální terapeutické zásahy | 21 |
| 3.1.5.1. Inhibitory γ -sekretasy..... | 21 |
| 3.1.5.2. Inhibitory β -sekretasy | 22 |
| 3.1.5.3. Elicitory α -sekretasy..... | 22 |
| 3.1.5.4. GSK3 β inhibitory | 22 |
| 3.1.5.5. Inhibitory POP | 22 |
| 3.1.6. Nefarmakologická léčba | 23 |

| | | |
|----------|---|----|
| 3.2. | <i>Argemone grandiflora</i> Sweet..... | 23 |
| 3.2.1. | Rod <i>Argemone</i> L..... | 24 |
| 3.2.2. | Morfologie | 24 |
| 3.2.3. | Výskyt, doba květu | 24 |
| 3.2.4. | Obsahové látky..... | 24 |
| 3.2.5. | Aktivita alkaloidů rodu <i>Argemone</i> L..... | 25 |
| 3.2.5.1. | Pavinany | 25 |
| 3.2.5.2. | Protopiny | 26 |
| 3.2.5.3. | Benzylisochinoliny..... | 27 |
| 3.2.5.4. | Benzofenanthridiny..... | 28 |
| 3.2.5.5. | Aporfiny | 28 |
| 3.2.5.6. | Protoberberiny..... | 29 |
| 4. | Experimentální část | 30 |
| 4.1. | Materiál a vybavení..... | 30 |
| 4.1.1. | Rozpouštědla a chemikálie | 30 |
| 4.1.2. | Chemikálie a materiál použitý při stanovení inhibičních aktivit | 30 |
| 4.1.3. | Chromatografické adsorbenty | 31 |
| 4.1.4. | Pomocné látky | 31 |
| 4.1.5. | Přístrojové vybavení..... | 32 |
| 4.1.6. | Rostlinný materiál | 32 |
| 4.2. | Obecné postupy práce | 32 |
| 4.2.1. | Příprava a čištění rozpouštědel..... | 32 |
| 4.2.2. | Odpařování extraktů a frakcí | 32 |
| 4.2.3. | Skladování frakcí a izolovaných látek..... | 33 |
| 4.2.4. | Preparativní TLC | 33 |

| | | |
|----------|---|----|
| 4.2.5. | Detekce alkaloidů | 33 |
| 4.2.6. | Strukturní analýza | 33 |
| 4.2.6.1. | GC-MS analýza | 33 |
| 4.2.6.2. | NMR analýza | 33 |
| 4.2.6.3. | Optická otáčivost | 34 |
| 4.2.6.4. | Teplota tání..... | 34 |
| 4.2.7. | Stanovení inhibičních aktivit..... | 34 |
| 4.2.7.1. | Příprava biologického materiálu | 34 |
| 4.2.7.2. | Stanovení cholinesterasové inhibiční aktivity (IC ₅₀) | 35 |
| 4.2.7.3. | Stanovení inhibiční aktivity vůči POP (IC ₅₀) | 36 |
| 4.2.8. | Příprava kolony pro sloupcovou chromatografii | 37 |
| 4.3. | Izolace alkaloidů | 37 |
| 4.3.1. | Výběr rostlinného materiálu..... | 37 |
| 4.3.2. | Příprava sumárního alkaloidního extraktu | 38 |
| 4.3.3. | Separace alkaloidního výtřepku na chromatografickém sloupci..... | 39 |
| 4.3.4. | Separace alkaloidů z frakce 41-43..... | 41 |
| 4.3.5. | Separace alkaloidů z frakce 91-135..... | 41 |
| 4.3.6. | Separace alkaloidů z frakce 136-140..... | 43 |
| 4.3.7. | Separace alkaloidů z frakce 141-144..... | 43 |
| 5. | Výsledky | 45 |
| 5.1. | Strukturní analýza | 45 |
| 5.1.1. | Allokryptopin (VM1)..... | 45 |
| 5.1.2. | (-)-Munitagin (VM2) | 48 |
| 5.1.3. | (-)-Norargemonin (VM3)..... | 51 |
| 5.2. | Inhibiční aktivity izolovaných alkaloidů | 54 |

| | |
|------------------------------|----|
| 6. Diskuze..... | 55 |
| 7. Citovaná literatura | 56 |
| 8. Abstrakt | 66 |
| 9. Abstract | 67 |

1. ÚVOD

Člověk jako druh od počátku věků bojuje proti přirozenému běhu, který mu nastavila příroda, a to jak úspěšně, či neúspěšně můžeme vidět všude nejen okolo nás, ale i v nás samotných. Lidské tělo jako takové, je schopno fungovat velmi dlouho – o více než stoletých lidech jsou zmínky už ve starověké literatuře, byť se tyto zdroje nedají pokládat za relevantní – v dnešní době však díky pokroku docílujeme prodloužení střední délky života [1]. Tento úspěch však s sebou nese i oběti, a těmi je výskyt tzv. civilizačních nemocí. Mezi nimi jsou jak choroby, které si způsobujeme nesprávným způsobem života – kardiovaskulární onemocnění, obezita, deprese, tak i choroby, které se bohužel nevyhnou ani těm nejzodpovědnějším – rakovina, Alzheimerova choroba nebo jiné další. Boj proti rakovině je velmi dobře zpopularizován a každoročně se objevují pozitivní zprávy o nových metodách boje proti tomuto druhu nemocí. Oproti tomu pokroky moderní vědy v léčbě a hlavně prevenci Alzheimerovy choroby jsou spíše malé.

Nemoci nervové soustavy patří k 6. nejčastější vnitřní příčině úmrtí v České republice mezi lety 2001 až 2010[2] a všeobecně se Alzheimerova nemoc drží na prvních deseti příčkách v příčinách úmrtí na světě[3][4].

Alzheimerova nemoc má zatím stále zcela nezjištěnou patologii, průzkum genů, které by ji zapříčiňovaly, neprokázal zcela jednoznačně zodpovědné segmenty. V momentální terapii se používá pouze léčba symptomatická. Lékem první volby na Alzheimerovu chorobu u nás jsou inhibitory acetylcholinesterasy, mezi které patří i látky objevené právě izolací z rostlin – galanthamin získaný ze sněženky (*Galanthus* L.), nebo relativně nová sloučenina izolovaná sloučenina z *Huperzia serrata* huperzin A[5].

Perspektivním terapeutickým zásahem v oblasti vývoje cholinesterasových inhibitorů se jeví látky inhibující acetylcholinesterasu a butylcholinesterasu. Mezi další potenciální zásah v terapii AD můžeme zařadit inhibitory prolyloligopeptidasy. Tento enzym hraje významnou roli v degradaci neuropeptidů, které jsou důležité pro paměť a kognitivní funkce. Přírodními sloučeninami - inhibitory cholinesteras a prolyloligopeptidasy a dalšími biologickými aktivitami potenciálně využitelné v terapii AD se zabývá i pracovní vědecká skupina ADINACO na Katedře farmaceutické botaniky a ekologie na Farmaceutické fakultě Univerzity Karlovy.

2. CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE

Cíle mé diplomové práce jsou:

- sumární sloupcová chromatografie diethyletherového alkaloidního výtřepku z *A. grandiflora*,
- izolace nejméně jednoho alkaloidu v čisté formě z vybraných frakcí získaných ze sumárního chromatografie výtřepku *A. grandiflora*,
- podíl na určení struktury pomocí spektroskopických a spektrálních metod (ESI, GC-MS, NMR), popř. optickou otáčivostí,
- podíl na stanovení biologické aktivity u čistých látek, na inhibici acetylcholinesterasy (AChE), butylcholinesterasy (BuChE) a prolyloligopeptidasy (POP) – určení hodnot jejich IC₅₀.

3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1. Alzheimerova nemoc

Demence je označení pro skupinu duševních nemocí, objevujících se až po ukončení mentálního vývoje. Projevují se především úbytkem kognitivních funkcí. Nejčastějším typem demence je Alzheimerova nemoc (AD).

AD je chronické onemocnění s dosud zcela neobjasněnými příčinami, projevující se především poruchami paměti, později i poškozením vyšších kortikálních funkcí.

Onemocnění bylo nazváno na počest Dr. Aloise Alzheimerera, který jako jeden z prvních lékařů popsal tuto nemoc u jedné ze svých pacientek, hospitalizované v psychiatrické léčebně ve Frankfurtu nad Mohanem, ačkoliv sám Dr. Alzheimer tuto pacientku popisoval pouze jako atypický případ stařecké senility s tím, že je potřeba nalézt vysvětlení pro některé nemoci, a nesnažit se všechny pacienty násilně rozřazovat do kategorií již známých onemocnění [6].

3.1.1. Symptomy a epidemiologie

V prvotním stádiu je nemoc často nerozeznatelná, navenek se projevuje jako menší poruchy paměti.

AD postihuje především starší populaci, počínaje 62,5 lety života. Výskyt onemocnění před 45. rokem života je vzácný, ale po 65. roku života se počet pacientů zvyšuje na dvojnásobek každých 5 let[7]. AD se ve výsledku podle odhadů vyskytuje asi u 5% pacientů nad 65 let u nás, což činí asi 123 000 nemocných[8].

Podle času objevení prvních příznaků pak rozdělujeme formy s *časným počátkem*, tzv. *presenilní*, pokud se příznaky objeví před 65. rokem, a formu s *pozdním počátkem*. Dále pak rozlišujeme tzv. formu *familiární*, kde nalézáme dědičné predispozice, především na chromozomech 1, 14, 12 a 21. Přesto však výskyt těchto predispozic nemusí nutně znamenat jistotu, že se AD skutečně vyskytne[7][9].

V pokročilých stádiích pacienti trpí typickými poruchami krátkodobé i dlouhodobé paměti, dále pak se může rozvinout i agresivita, halucinace, bludy, poruchy spánku, deprese [7][10]. V terminálním stadiu je pak nemocný zcela nesoběstačný, nepoznává

své nejbližší, objevují se poruchy příjmu potravin a tekutin, péče o hygienu, pacient je imobilizován. Ve svých důsledcích je AD považována za letální nemoc[9].

3.1.2. Diagnostika

Základním nástrojem pro diagnostiku demencí je Mini-Mental State Examination test (MMSE), díky němuž můžeme porovnávat jak jednotlivé pacienty s normální populací, tak i stav jedince a jeho zlepšení nebo zhoršení, bez subjektivního zkreslení vyšetřujícího[11].

K diagnóze AD se však užívá i dalších vyšetření a testů, jelikož podle MMSE nemusí být jednoznačně odlišitelná od jiných druhů demencí. Dalšími využívanými testy jsou např. test kreslení hodin, nebo test kognitivních funkcí. Pacient je dále podroben vyšetření na CT nebo MRI, kde se hledá úbytek mediálních temporálních struktur mozku a rozšíření komorového systému, zkoušky likvoru na některé chemické markery, např. pozměněný poměr proteinů τ -proteinu a fosforylovaného τ -proteinu, úbytek $A\beta_{1-42}$ [12].

3.1.3. Etiologie

Přesná příčina vzniku a průběhu AD nebyla doposud zcela objasněna. U pacientů dochází k úbytku cholinergní transmise v mozku, dochází ke zmenšení objemu mozku a objevují se i některé další společné znaky, pro které mají odborníci různá vysvětlení, žádná z hypotéz není doposud jednoznačně uznávaná[7].

3.1.3.1. β -amyloid

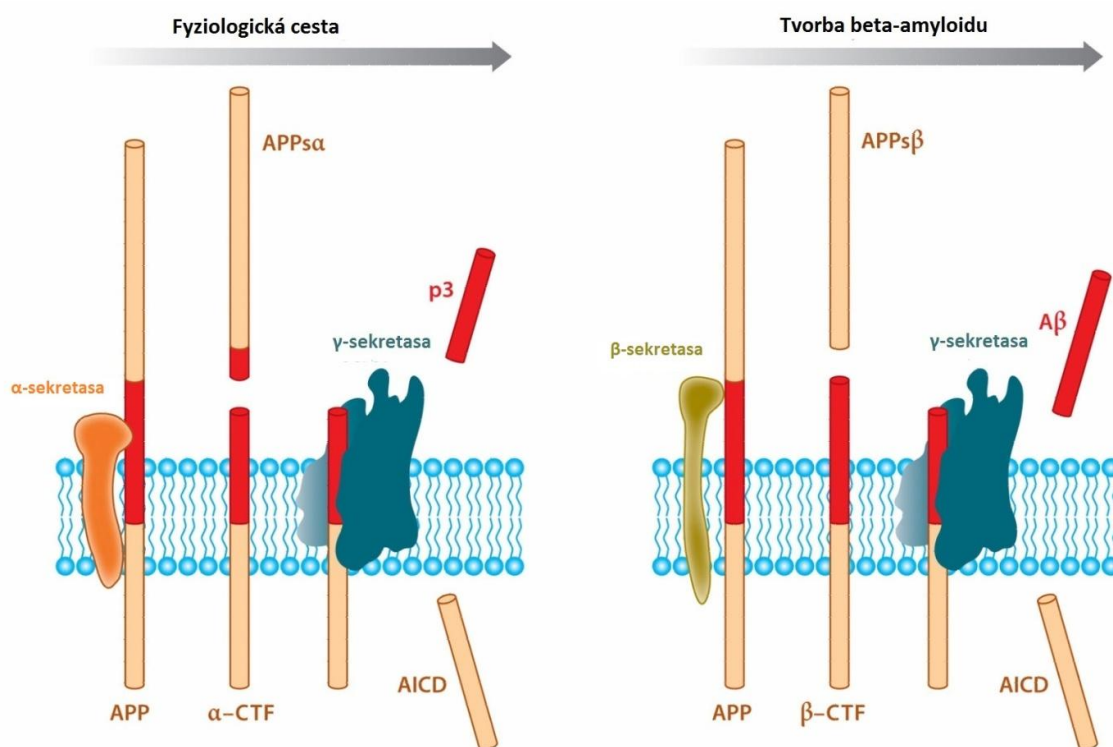
Za jedno z možných vysvětlení vzniku AD byla některými autory považována tzv. „amyloidová hypotéza“[13]. U zdravých lidí je amyloid-prekursorový protein (APP) štěpen α -sekretasou, následně poté je štěpen γ -sekretasou. Ačkoliv není funkce APP a produktů jeho fyziologického štěpení přesně známá, je v mozku hojně vytvářen a má se za to, že mají vyživovací a neuroprotektivní vlastnosti[14]. U nemocných s AD je APP štěpen β -sekretasou a γ -sekretasou, kde je produktem nerozpustný β -amyloid ($A\beta$), zatímco při zapojení enzymů α -sekretasy a následně γ -sekretasy k tvorbě $A\beta$ nedochází, ale tvoří se solubilní protein p3 (Obr. 1). U obou těchto procesů dále vzniká intracelulární C-terminální fragment (AICD) a solubilní extracelulární ektodomény

APPs α a APPs β [14]. Převážně A β_{42} pak tvoří jádro senilních plaků, a A β_{40} se zase ukládá ve stěnách cév, kde způsobuje cerebrální angiopatii. Několik studií ukazuje, že zvýšená hladina A β vede k poškození synapsí a neurodegeneraci[15]. Přejchod A β dovnitř buňky má za následek zvýšení hladiny p53 [16].

Volného A β_{42} v likvoru se využívá k diagnostice AD[17].

Zvýšená tvorba A β může být podmíněna mutací pro APP na 21. chromozomu, genu pro tvorbu presenilinu 1 na 14. chromozomu a presenilinu 2 na 1. chromozomu, nebo mutací mRNA, kdy pak dochází k tvorbě odlišného APP a ubiquitinu[7].

Obr. 1 - Štěpení APP fyziologickou cestou a u pacientů s AD [14]



3.1.3.2. Senilní plaký

Senilní plaký se vytvářejí v mozkové kůře, podkorové vrstvě šedých buněk a kůře mozečku, kde jsou obarvitelné buď stříbrem, thioflavinem S nebo konžskou červení a mohou být pozorovány, nebo jsou detekovatelné imunohistologicky. V menší míře se vyskytují i u normálně stárnoucího mozku.

Rozlišujeme dvě formy plaků, amorfní, tzv. difuzní plaký, ty nejsou obarvitelné thioflavinem S ani konžskou červení, a formu fibrilární, tvořící klasické, neboli

amyloidní plaký[18]. V klasických plakách najdeme denzní jádro neuritů s párovými spirálními vlákny tvořených hyperfosforylovaným τ -proteinem a $A\beta$, případně jen hrudky amyloidu. Difuzní plaký se považují za jakýsi předstupeň plaků klasických a žádná neuritý v nich nenajdeme[7].

Někteří autoři se však domnívají, že tvorba $A\beta$ a senilních plaků je důsledkem dystrofie neuritů, což si odvozují z nálezů $A\beta$ u mladých pacientů s Downovým syndromem [7]. Podle některých úbytek kognitivních funkcí koreluje pouze s úbytkem neuronů, nezávisle na hladině $A\beta$ a výskytu neuronálních klubek[19].

3.1.3.3. Apolipoprotein E

Apolipoprotein E (ApoE) se podílí na redistribuci lipidů jak mezi orgány, tak i mezi buňkami. Ukázalo se, že se také hojně vyskytuje v mozcích pacientů s AD, a předpokládá se jeho podíl na ukládání $A\beta$ v placích. ApoE je kódován ve třech alelách, vyskytují se čtyři izoformy. Vyšší ohrožení AD mají lidé s izoformou ApoE4, která se u osob s AD vyskytuje nejčastěji. ApoE se v imunohistochemických vyšetřeních našel především v placích difuzního typu, zatímco v klasických téměř není. Předpokládá se tedy, že ukládání ApoE je předchozím krokem ukládání $A\beta$ v placích[7].

3.1.3.4. Neuronální klubka

Neuronální klubka, prvně pozorována právě Aloisem Alzheimerem[7], jsou tvořena hyperfosforylovaným τ -proteinem. Za fyziologických podmínek se mozkový τ -protein účastní tvorby mikrotubulů a zabezpečuje jejich stabilitu. Při AD je τ -protein hyperfosforylován, tehdy svoji funkci ztrácí, stáčí se do dvojité šroubovice a vytváří tak neuronální klubka. V klubkách je τ -protein ubikvitinizován a následuje dystrofie postiženého neuronu. Hyperfosforylace je pravděpodobně spuštěna změnou konformace mutovaného τ -proteinu, kdy je τ -protein fosforylován, ale nemůže být defosforylován.

Hyperfosforylace nacházíme nejen u AD, ale i jiných chorob např. Downova syndromu, Pickovy nemoci aj.[20] Enzymem zodpovědným za hyperfosforylací je enzym glykogen syntasa kinasa 3 (GSK3) a v souvislosti s jeho působením na zvýšenou produkci $A\beta$, zvýšenou zánětlivou odpověď, snížení produkce acetylcholinu a mediátory apoptózy

mluví někteří autoři o tzv. GSK3 hypotéze AD [21]. GSK3 se vyskytuje ve dvou izoformách – GSK3 α (51kDa) a GSK3 β (46kDa)[22], přičemž izoforma GSK3 β je v mozku častější a tedy je zodpovědná za hyperfosforylaci τ -proteinu[23].

3.1.3.5. Zánět a oxidativní stres

Ačkoliv sterilní zánět je jedním z faktorů procesů při vzniku AD, vědecká společnost se neshoduje v tom, zda jde o hlavní nebo vedlejší příčinu nebo jen související úkaz s rozvinutím AD[24]. Zánět vzniká okolo usazenin A β , aktivované mikroglie pak mohou vylučovat neurotoxické cytokiny, které mohou způsobit odumření neuronu. Další cytokiny mohou zaktivovat také monocyty, které přilnou k endotelu kapilár a začnou uvolňovat kyslíkové radikály[7]. Vzniká tak oxidační stres, což je nepoměr mezi oxidanty a antioxidanty. Oxidanty mohou poškozovat všechny druhy makromolekul (cukry, proteiny, lipidy, DNA), což může vést k aktivování dalších řídících molekul a tvorbě A β , poškození dalších buněk a nastartování jejich apoptózy[25].

3.1.3.6. Další rizikové faktory AD

U pacientů s AD často nacházíme i poškození mozkových cév. To vedlo k vytvoření alternativních hypotéz ke zmíněné hypotéze s A β s tím, že neurodegenerativní proces je zahájen díky cévní nedostatečnosti.

Nejvýznamnějším faktorem je hypertenze. Osoby s vyšším tlakem krve mají větší predispozice k rozvinutí AD. Byly provedeny studie, ale pouze studie s nitrendipinem vykazala zlepšení oproti kontrolní skupině. Jsou ovšem spekulace, zda úspěšnost nitrendipinu nespočívá v jeho mechanismu blokace vápníkových kanálů, tedy podobného jako má memantin.

Diabetes mellitus je v pořadí druhý rizikový faktor, především se jedná o DM 2. typu. Zde se uvažuje jak o vlivu DM na stěny cév, tak i o vlivu na odumírání neuronů a také tvorbu senilních plaků. Studie s rosiglitazonem však neprokázala účinek[13].

Cholesterolemie je třetí rizikový faktor. Při zvýšené cholesterolemii je zvýšené i množství A β a dále cholesterol přispívá k ateroskleróze mozkových cév. Studie se statiny však také nepřinesly požadované výsledky[26].

3.1.4. Farmakoterapie

Etiopatogeneze AD není zcela plně objasněna, současná léčba podle medicíny založené na důkazech tak funguje pouze kauzálně, což znamená, že pouze snižuje příznaky a zpomaluje průběh nemoci. V praxi se užívají především dvě skupiny léčiv, které ovlivňují kognitivní funkce – inhibitory cholinesteras a inhibitory NMDA.

Další farmakoterapie zkoušená v minulosti dnes nemá dostatek důkazů o jejich účinnosti. V historii byly zkoušeny extrakty z *Ginkgo biloba*, nesteroidní antirevmatika, vitamin E, estrogeny a statiny. Poněkud nadějněji se jeví standardizovaný extrakt EGb761 z *Ginkgo biloba*, která zatím v několika studiích má prokázané účinky, a přemýšlí se o jejím nasazení u pacientů, kteří nejsou vhodní pro standardní léčbu inhibitory cholinesteras, nebo jako adjuvantní léčbu[27].

Vzhledem k tomu, že jsou nemocní s AD často postihováni i poruchami chování, depresemi nebo úzkostí, je u nich nasazována léčba ovlivňující tyto nekognitivní funkce – antidepresiva (SSRI, mirtazapin, venlafaxin, milnacipran, moklobemid), anxiolytika (buspiron), antipsychotika (tiaprid, melperon, risperidon, quetiapin, olanzapin, ziprasidon, amisulpirid, aripiprazol), thymostabilizátory (karbamazepin, valproát, gabapentin, lamotrigin) [9].

3.1.4.1. Inhibitory cholinesteras

Léčiva této skupiny blokují enzymy, které odbourávají acetylcholin, a tím zlepšují poškozenou acetylcholinergní transmisi v mozku, čímž zlepšují kognitivní funkce, zvyšují pozornost a také snižují některé poruchy v chování.

Inhibice cholinesteras se ukázala být lepší než přímá terapie receptorovými agonisty, protože inhibitory cholinesteras zvyšují účinek fyziologicky produkovaného acetylcholinu, než aby tonicky nebo celkově ovlivňovaly nikotinové nebo muskarinové receptory[28]. V důsledku poznání, že při AD je funkce AChE snížena a její roli přebírá BuChE, je zacílená pozornost také na inhibitory BuChE. Výhody takovéto inhibice jsou jak větší účinnost, ale také méně nežádoucích účinků mimo centrální nervovou soustavu[29].

Donepezil je chemicky piperidinový derivát, působí pouze inhibicí AChE, a je to inhibitor nekompetitivní, rychle reverzibilní. Má vysokou vazbu na plazmatické

proteiny (kolem 96%), vysoký plazmatický poločas (70h), eliminuje se přes jaterní enzymy, jeho dávkování je okolo 5-10 mg jedenkrát denně. Dnes je produkován ve formě tablet, pracuje se na vývinu perorálního roztoku.

Rivastigmin je léčivo ze skupiny karbamátových derivátů, a působí inhibičně jak na AChE, tak i BuChE. Stejně jako u donepezilu jde o nekompetitivní, ale tentokrát velmi pomalu působící reverzibilní inhibitor. Je selektivní pro mozkové cholinesterázy. Rivastigmin se váže na plazmatické proteiny asi ze 40%, jeho plazmatický poločas je okolo 1-2 hodin, je metabolizován přímo AChE a BuChE, vylučován ledvinami. Denní dávka je 6-12 mg denně, rozdělené do dvou dávek braných s jídlem. Používá se ve formě tobolek, perorálního roztoku, vyvíjí se transdermální náplasti.

Galanthamin je terciární alkaloid se strukturou fenanthrenu, byl izolován z několika rostlin rodu např. *Galanthus* L. (*Amaryllidaceae*). Galanthamin je inhibitor jak AChE tak BuChE, zároveň allostericky moduluje receptory nikotinového typu, což způsobuje další potenciaci neurotransmise. Receptory nikotinového typu jsou důležité pro paměť a učení. Galanthamin se málo váže na plazmatické proteiny (18-20%), je metabolizován na cytochromu p450 a vylučován z 97% močí, 18-22% látky v nezměněném stavu. Na AChE soutěží s acetylcholinem o vazbu, jedná se tedy o kompetitivní inhibici, která je reverzibilní. Galanthamin kromě AChE inhibuje i BuChE, k AChE je ale 13-50krát selektivnější. Dále má galanthamin antiapoptotické účinky, které chrání neurony proti apoptóze vyvolané A β . Galanthamin se užívá v dávce 16-24 mg na den, v jedné (v případě, že podává ve formě tobolek s řízeným uvolňováním) až dvou dávkách v podobě tablet s jídlem[30],[31].

Huperzin A je seskviterpenový alkaloid [32], který byl izolován z plavuně *Huperzia serrata* (Thunb.) Trevis (*Lycopodiaceae*)[33]. Huperzin A je výborný inhibitor AChE, v tomto směru předčí i galanthamin, ale slabší inhibitor BuChE. Jedná se o reverzibilní inhibitor. V porovnání s donepezilem a rivastigminem má huperzin A lepší prostupnost skrze hematoencefalickou bariéru, vyšší biologickou dostupnost po perorálním podání a delší trvání inhibice. Huperzin A je metabolizován izoenzymy CYP1A2 a CYP3A1/2. Vylučuje se převážně močí.[5] U této látky jsou dokončené klinické studie 2. fáze s uspokojivými výsledky, ale je třeba ještě provést rozsáhlejší kvalitní studie[34].

Nežádoucí účinky této skupiny léčiv souvisí s prudkým zvýšením hladiny acetylcholinu, většinou v oblasti akutních gastrointestinálních problémů: nevolnost, zvracení, průjem nebo ztráta chuti k jídlu. Těmto problémům lze předcházet pomalou titrací dávky, kdy se zvyšuje tolerabilita pacientů k těmto léčivům. Nevolnosti a zvracení lze případně zmírnit pomocí centrálně působících antiemetik. Během udržovací fáze pak může dojít k výskytu neurologických, svalových a kardiopulmonálních potíží.

Zatím neexistuje důkaz, zda by inhibitory AChE zpomalovaly vývoj onemocnění, ze studií ale již dnes vyplývá, že ke zhoršení onemocnění dochází u pacientů později [31].

3.1.4.2. Inhibitory NMDA receptorů

NMDA receptory jsou jedním typem glutamátových receptorů. Glutamát zprostředkovává přenos signálů u 40-60% synapsí, zejména v hipokampu a neokortexu, má vliv především na učení a paměť.

Při AD je hladina glutamátu zvýšená, což vede k hyperexcitaci NMDA receptorů, dochází ke zvýšenému influxu vápenatých iontů do buňky, kde aktivuje enzymy a tvorbu kyslíkových radikálů, což vede až k poškození nebo zničení neuronů.

Jediným užívaným inhibitorem NMDA receptorů dnes je memantin. Jde o nekompetitivního antagonistu. Memantin blokuje místo pro Mg^{2+} ionty a blokuje tak vstup Ca^{2+} do buněk, nemá však vysokou afinitu, a tak při případném impulzu z presynapse uvolňuje svoje místo, díky čemuž fyziologická funkce neuronu není blokována.

Memantin dále blokuje 5-HT₃ receptory, jejichž případná aktivace také znesnadňuje proces učení a paměti. Inhibice tohoto typu receptorů také snižuje případnou nevolnost a narušenou motilitu, což z něj dělá skvělý doplněk k terapii donepezilem.

Memantin se váže z 45% na plazmatické bílkoviny, metabolizuje se jen z 20%, zbytek je vyloučen nezměněn ledvinami. Podává se v dávce 10 mg dvakrát denně, přičemž se dávka po týdnech titruje po 5 mg/den. I díky tomu, že neinhibuje žádný z izoenzymů cytochromu P450, má velmi málo interakcí, interaguje s léky, které se také vylučují tubulární sekrecí. Jeho vylučování je sníženo při alkalizaci moče. Mezi nežádoucí účinky patří závratě, bolesti hlavy, únava, zmatenost.

Memantin je možné a výhodné kombinovat s inhibitory AChE [12] [35].

3.1.4.3. Ostatní farmakoterapie

K léčbě se mimo předchozích skupin léčiv používají i další, které se snaží ovlivňovat patogenezí jinými mechanismy, jejich užití však není založeno na důkazech.

Nootropika – piracetam, pyritinol, nicergolin – zvyšují mozkový metabolismus, odolnost mozkové tkáně vůči hypoxii, neuronální proteosyntézu. Bývají dobře tolerována, mají minimum nežádoucích účinků.

Vzhledem k tomu, že velkou roli v AD hrají také volné kyslíkové radikály, svoje opodstatnění má i použití **antioxidantů** – např. α -tokoferol, kyselina askorbová, retinol, melatonin, extrakt *Gingko biloba* (ten má i nootropní vlastnosti).

Ze studií se zjistilo, že u žen, které po menopauze prodělaly substituční terapii **estrogeny**, je výskyt AD nižší než u žen, které touto terapií neprošly. Estrogeny se tak považují za preventivní opatření proti AD[7][12][27].

3.1.5. Potenciální terapeutické zásahy

Moderní medicína se snaží najít možné cesty, jak AD vyléčit nebo ji úplně předejít, což komplikuje doposud nejasná patologie AD. Kromě zde uvedených látek existují i další, které se snaží zasáhnout příčiny AD ať už podle amyloidové hypotézy, GSK3 hypotézy nebo i jiné. Jelikož těchto látek existuje bezpočet a hlavní náplní této práce není jejich výčet, jsou uvedené látky pouze jako příklady a kromě nich existuje řada dalších [36].

3.1.5.1. Inhibitory γ -sekretasy

Inhibice γ -sekretasy by měla přímý vliv na redukci $A\beta$ (Obr. 1 - Štěpení APP fyziologickou cestou a u pacientů s AD). γ -Sekretasa má kromě úpravy APP také jiné funkce. Na zvířecích modelech se ukázalo, že neselektivní inhibice může mít systémové vedlejší účinky. Výhledově se výzkum zaměřuje spíše na selektivní inhibitory tohoto enzymu.

Semagacestat je neselektivní inhibitor γ -sekretasy. Mezi vedlejšími účinky se objevily gastrointestinální potíže a kožní problémy, jinak je relativně dobře tolerován a prokázal se jeho účinek na snížení hladiny $A\beta$. Dvě proběhnuvší klinické zkoušky fáze 3 však ukázaly zhoršení kognitivních schopností, což může souviset jak se zvýšením γ -sekretasy v důsledku rebound efektu, ale třeba i ztráty funkce γ -sekretasy v dráhách mimo APP důležitých pro správnou funkci neuronů[36].

Tarenflurbil, enantiomer flurbiprofenu[37], je nesteroidní antiflogistikum, u kterého se prokázala schopnost snížení hladiny $A\beta_{42}$ díky změně funkce γ -sekretasy. Ta účinkem tarenflurbilu štěpí $A\beta_{42}$ na menší kousky, které mají menší tendenci tvořit plaky. Zkoušky fáze 2 prokázaly pozitivní efekt na denní aktivity a všeobecné fungování pacientů, ale žádný efekt na kognitivní funkce. Žádný efekt na kognitivní funkce neprokázala ani fáze 3[36].

3.1.5.2. Inhibitory β -sekretasy

Další teoretickou cestou, jak narušit tvorbu $A\beta$ je inhibice β -sekretasy. β -sekretasa se vyskytuje ve dvou homolozích BACE1 a BACE2, přičemž BACE1 se ukazuje být dominantní v tvorbě $A\beta$ [36].

Molekul inhibujících β -sekretasu je k dispozici více, ale jen některé jsou zahrnutý v klinických zkouškách. **MK-8931** dokončila fázi 1 a momentálně je ve fázi 2/3, **LY2886721** je ve fázi 1/2. **GRL-8234** prokázala pozitivní účinky v preklinických zkouškách u myší[37].

3.1.5.3. Elicitory α -sekretasy

Stimulace α -sekretasy by měla vést k snižování hladiny volného APP, který by mohl být metabolizován amyloidogenní cestou[36]. Zástupcem této skupiny je **etazolát**, inhibitor fosfodiesterasy 4, modulátor $GABA_A$ receptorů a elicitor α -sekretasy, momentálně ve 2. fázi klinického zkoušení[38]. Zatím je dobře tolerován a postrádá významnější nežádoucí účinky[39].

3.1.5.4. GSK3 β inhibitory

Inhibice GSK3, především její β -izoformy zabraňuje hyperfosforylaci τ -proteinu, která je spojována s odumíráním neuronů a rozvojem AD. Nadějnou látkou tohoto druhu se zdá být thiadiazolidinonová sloučenina **tideglusib**. Ve fázi 2 klinických zkoušek vykazovali pacienti nárůst kognitivních schopností, nyní probíhá fáze 2b[40].

3.1.5.5. Inhibitory POP

POP je enzym štěpící peptidické hormony a neuropeptidy související se ztrátou paměti [41]. U pacientů s AD byl zjištěn nedostatek látek, jako jsou substance P,

vasopresin a thyrotropin uvolňující hormon, které jsou tímto enzymem štěpeny. Předpokládá se tedy spojitost činnosti tohoto enzymu a ztráty paměti během AD[42]. Inhibitory tohoto enzymu je i řada přírodních látek jako například berberin[43].

3.1.6. Nefarmakologická léčba

Diagnóza AD je těžká jak pro pacienta, tak i pro jejich blízké, kteří o ně pečují. Jak je psáno výše, moderní medicína neumí zvrátit průběh onemocnění. Jsme pouze schopni oddálit těžší stadia.

Základem dnešní péče o pacienty je tak kromě farmakoterapie i edukace nemocného, příp. i jeho pečovatелů, postupy a návyky, které mu umožní fungovat déle samostatně. Pacientův mozek by měl být hodně stimulován, nemocný by si měl vést deník s důležitými informacemi. Ačkoliv se průběh nemoci těmito cvičeními nezvolní, pomáhá pacientům se cítit lépe i navzdory jejich nemoci[44].

Pečující jsou poučeni, jak se k pacientovi chovat a i jak zvládat některé situace, pokud je nemocný v domácí péči[45].

3.2. *Argemone grandiflora* Sweet

| | |
|-----------|------------------------|
| Oddělení: | Magnoliophyta |
| Třída: | Magnoliopsida |
| Podtřída: | Ranunculidae |
| Řád: | Papaverales |
| Čeleď: | Papaveraceae |
| Rod: | <i>Argemone</i> L.[46] |



Obr. 2 – *Argemone grandiflora* Sweet. [77]

3.2.1. Rod *Argemone* L.

Rod *Argemone* je široký původně rozšířený v teplých a suchých oblastech Severní a Jižní Ameriky. Jde o roční nebo vytrvalé byliny, méně často keře. Mají vykrajované listy, kalich trojčetný, dvojitě trojčetnou korunu.

V celém rodu se vyskytují alkaloidy, které již byly v minulosti studovány různými autory pro použití k lékařským účelům. Rod *Argemone* je možné rozdělit na dvě podskupiny podle výskytu druhů alkaloidů. Do první skupiny patří druhy obsahující především pavinanové alkaloidy, do druhé pak druhy s protoberberinovými alkaloidy a jejich deriváty, tzn. protopiny nebo benzofenantridiny. Do této druhé skupiny patří i zkoumaný druh *A. grandiflora*[47].

3.2.2. Morfologie

A. grandiflora, česky pleskanka velkokvětá, je jednorocní bylina dorůstající 1 – 1,5 metru. Lodyha nese peřenolaločné zelené listy s bělavými středami. Květy jsou velké, opadavý kalich ze tří hladkých lístků, šest okvětních plátků čistě bílé barvy, tyčinky mnohočetné, překrývající se, oranžovo-žluté barvy. Semeník je složený ze čtyř plodolistů, čtyři přirostlé blizny měsíčitého tvaru[48].

3.2.3. Výskyt, doba květu

Pleskanka je původní v Mexiku, na slunečných, písčiny nebo štěrkových suchých stanovištích. Kvete od července do září[49].

3.2.4. Obsahové látky

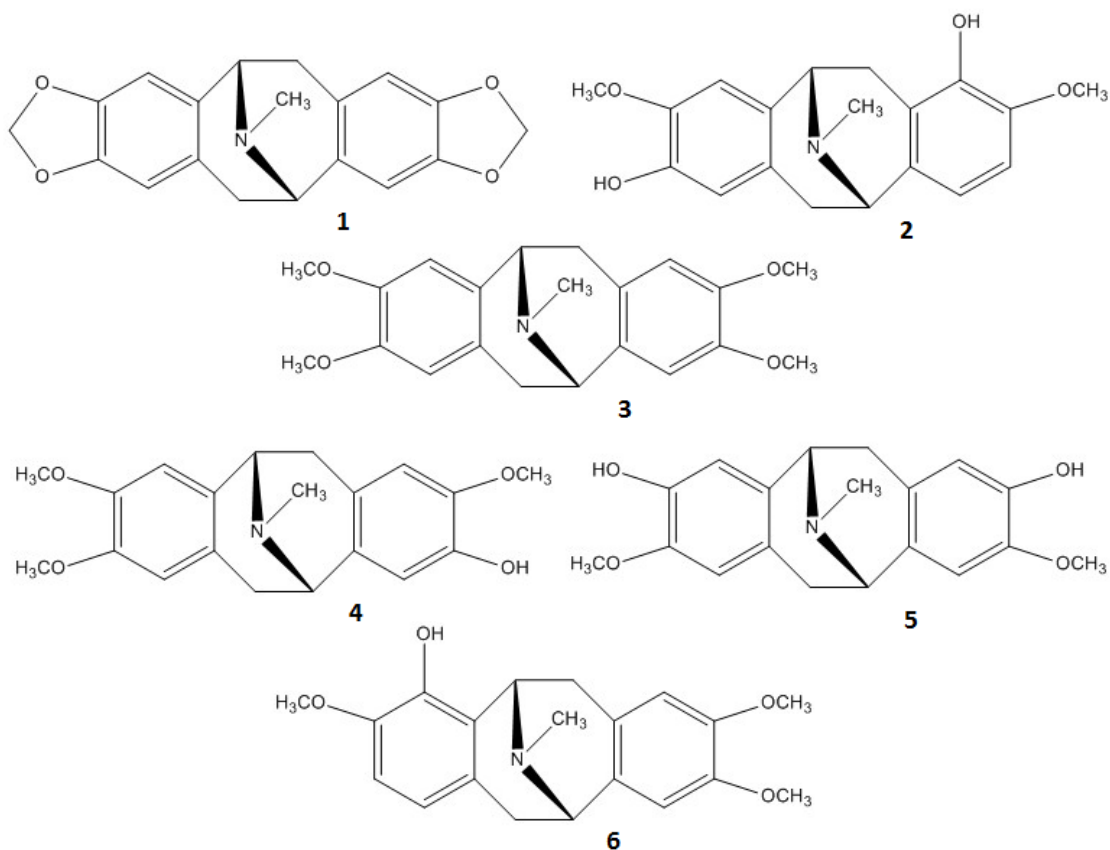
Rostliny rodu *Argemone* L. jsou významné především obsahem alkaloidů, mimo nich obsahují i jiné sekundární metabolity, jako jsou flavonoidy, glykosidy, saponiny, taniny, fenoly, aj.[50].

Doposud se v *A. grandiflora* podařilo identifikovat alkaloidy berberin, α -allokryptopin, protopin, platycerin, isonoargemonin, munitagin, glaucin, bisnoargemonin, argemonin, laudanosin, kodamin, cheilanthifolin, kryptokavin, korypalmin, sanguinarin, chelerythrin, reticulín, escholtzin[51][52].

3.2.5. Aktivita alkaloidů rodu *Argemone* L.

3.2.5.1. Pavinany

Obr. 3 – Pavinany izolované z *A. grandiflora*

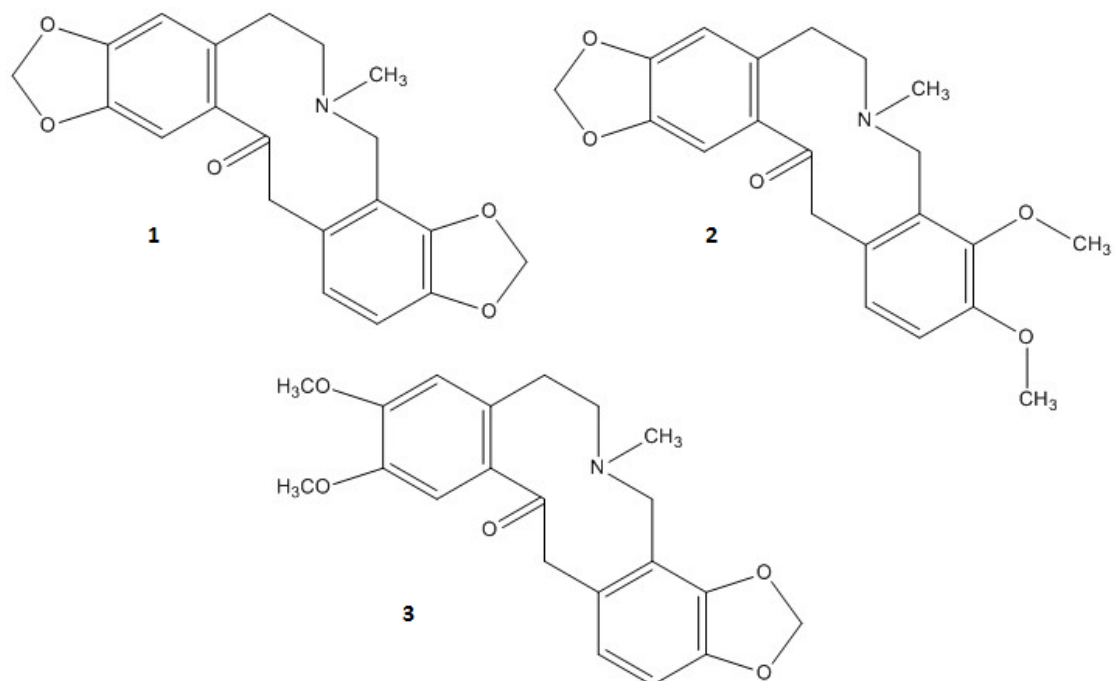


1 – (–)-escholtzin (kalifornin), 2 – (–)-munitagin, 3 – (–)-argemonin, 4 – (–)- isonoargemonin, 5 – (–)-bisnoargemonin, 6 – (–)-platycerin

- (–)-Escholtzin (kalifornin) – inhibice [³H]8-Hydroxy-2-(di-*N*-propylamino)tetralinu na 5-HT_{1A} receptoru, inhibitor CYP3A4 *in vitro*[53].
- (–)-Munitagin – biologická aktivita není známa.
- (–)-Argemonin –antiproliferativní schopnosti[54], inhibice POP[43].
- (–)-Norargemonin (isonoargemonin) – biologická aktivita není známa.
- (–)-Bisnoargemonin (rotundin) – snížení produkce žaludeční kyseliny a žaludečních šťáv bez ovlivnění pepsinu[55], analgetické, antiischemické, antihypertenzní, sedativní a hepatoprotektivní vlastnosti[56].
- (–)-Platycerin – inhibice POP[43].

3.2.5.2. Protopiny

Obr. 4 - Protopiny izolované z *A. grandiflora*

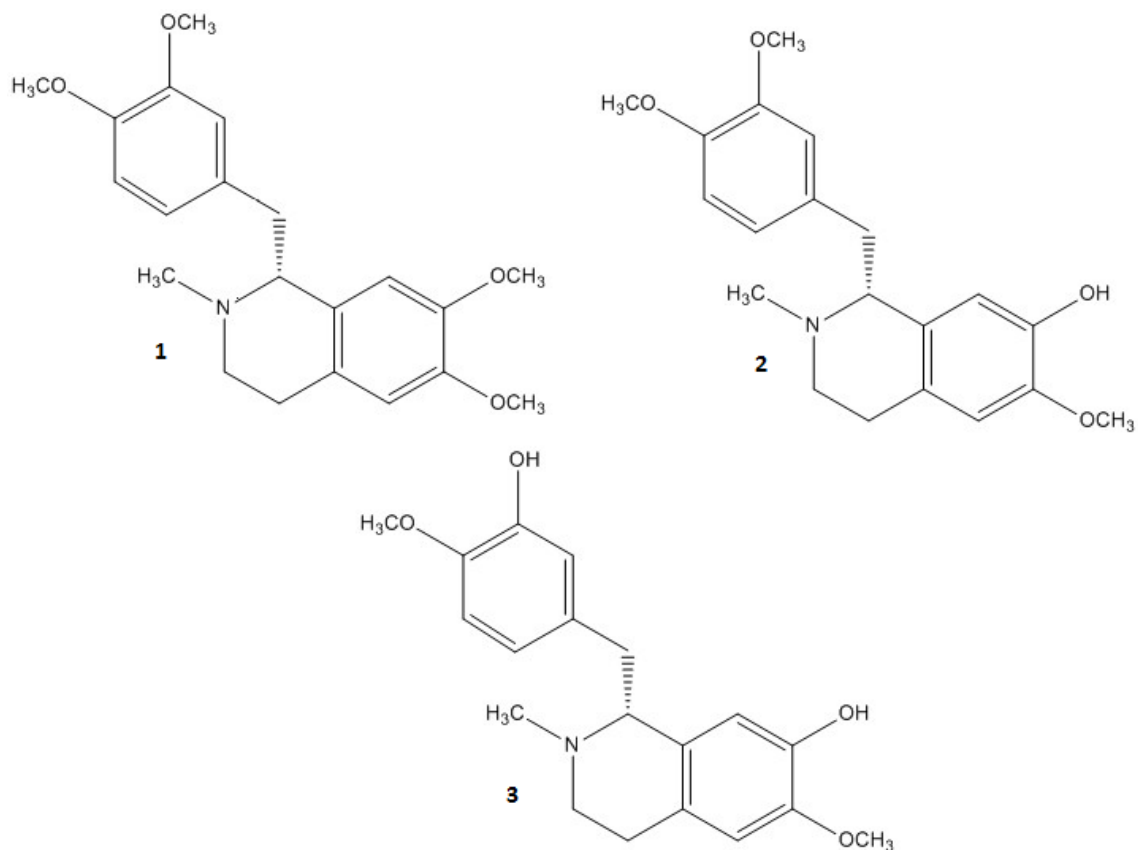


1 - protopin, 2 - α -allokryptopin, 3 - kryptokavin

- Protopin – inhibice následujících enzymů: alkoholreduktasa 1, aldosareduktasa, α -amylasa, aminopyrin-N-demetylasa, antiamebická aktivita, antimalarická aktivita, antiamnestické účinky, zvýšení prokrvení mozku, hepatoprotektivní a antiototoxický účinek, potlačení spermatogeneze, antitrombotický efekt, inhibice metabolismu arachidonátu, snížení hladiny ATP, snížení viskozity krve, inhibice uvolňování a reuptake Ca^{++} iontů, negativní chronotropní[57], negativní inotropický a vasodilatační efekt, inhibice AChE, cytotoxický a anti-proliferativní účinek[58].
- α -Alloalkryptopin – antihypertenzní[59], antifungální, anthelmintický účinek[58].
- Kryptokavin (kryptopin) – inhibice DNA I polymerázy, antiarytmická aktivita, antihepatotoxická aktivita, inhibice reverzní transkriptázy[57].

3.2.5.3. Benzylisochinoliny

Obr. 5 - Benzylisochinoliny izolované z *A. grandiflora*

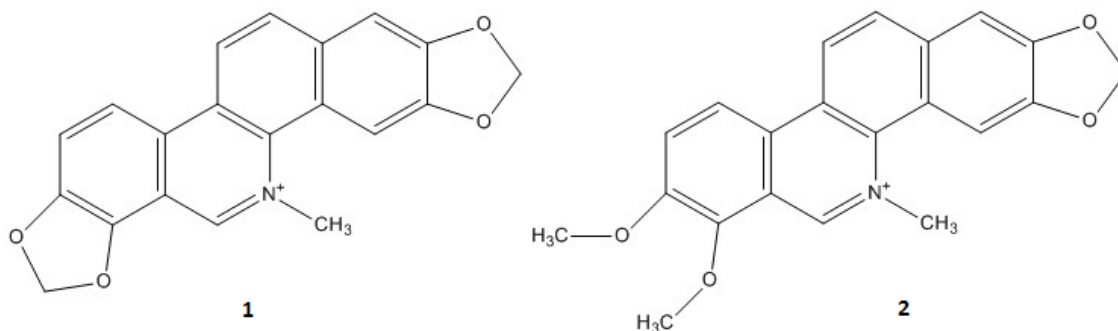


1 – (+)-laudanosin, 2 – (+)-kodamin,
3 – (+)-retikulín

- (+)-Laudanosin – kardiovaskulární aktivita[60].
- (+)-Kodamin – antimalarické účinky [61].
- (+)-Retikulín – tlumivý účinek na centrální soustavu[62], antimikrobiální a antimalarické účinky[63], inhibice POP[43].

3.2.5.4. Benzofenanthridiny

Obr. 6 - Benzofenanthridiny izolované z *A. grandiflora*

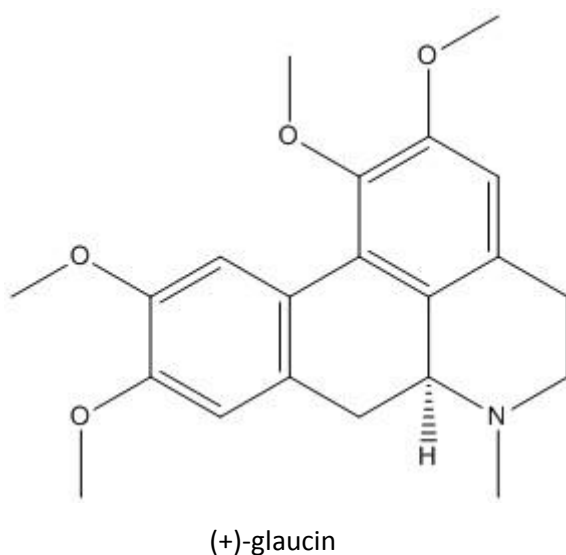


1 - sanguinarin, 2 - chelerythrin

- Sanguinarin – inhibice monoaminooxidasy[64], antifungální aktivita[65], antibakteriální[66] a cytotoxická aktivita[67].
- Chelerythrin – antifungální aktivita[65], spouštěč apoptózy[68], protizánětlivé, antiagregační a antibakteriální vlastnosti[69].

3.2.5.5. Aporfiny

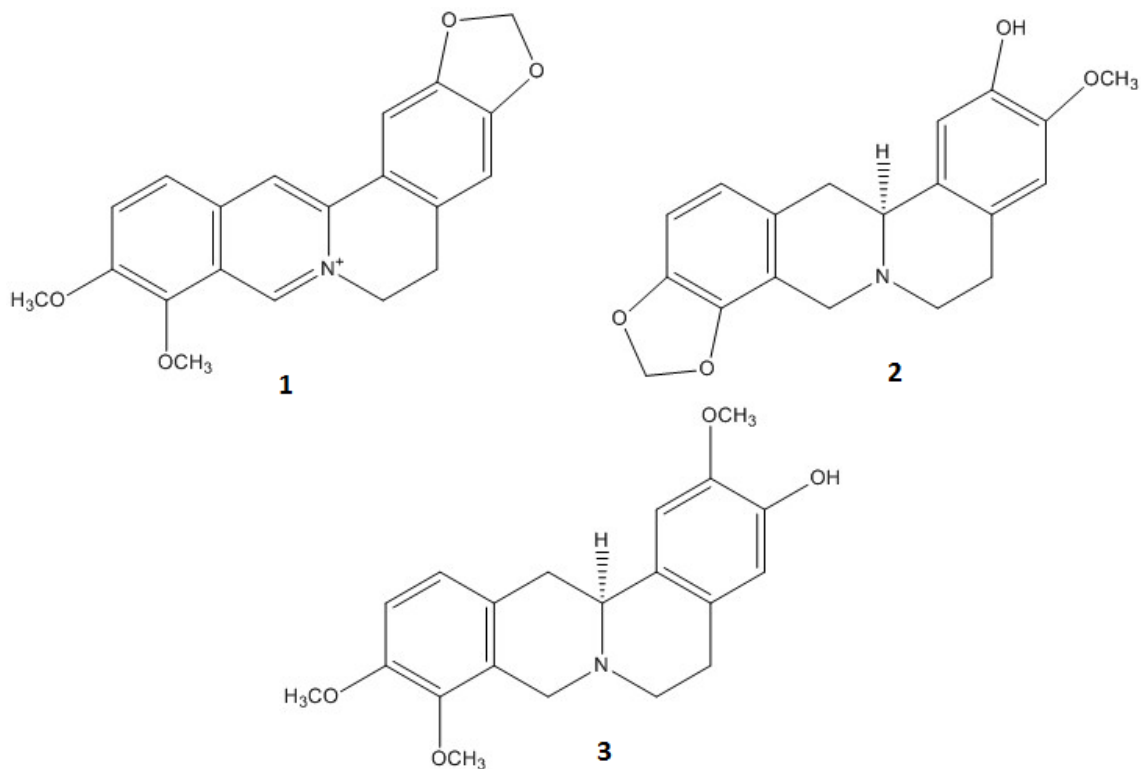
Obr. 7 - Aporfiny izolované z *A. grandiflora*



- (+)-Glauicin – bronchodilatační a protizánětlivé účinky[70].

3.2.5.6. Protoberberiny

Obr. 8 - Protoberberiny izolované z *A. grandiflora*



1 - berberin, 2 – (-)-cheilanthifolin,
3 – (-)-korypalmin

- Berberin – inhibuje POP [43], bakteriostatické účiny, antimalarické účinky, hypolipidemikum, antihypertenzní vlastnosti, cytotoxicita proti nádorům dělohy, konečníku, nasofaryngeálnímu nádoru, antikancerogenní aktivita[71], výrazná inhibice AChE a BuChE[43]
- (-)-Cheilanthifolin – antioxidační aktivita[72], antimalarické účinky[73].
- (-)-Korypalmin – antibakteriální, antifungální, antimykobakteriální, antikvasinková aktivita, blokáce dopaminových receptorů a inhibice zpětné absorpce dopaminu, inhibice POP[43], inhibice AChE[74].

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1. Materiál a vybavení

4.1.1. Rozpouštědla a chemikálie

- chloroform p. a. (CHCl_3) (Penta a.s.),
- cyklohexan p. a. (cHx) (Penta a.s.),
- lékařský benzín lékopisné kvality ČL 2009 (LB) (Penta a.s.),
- ethanol 95%, denaturovaný methanolem, p. a. (EtOH) (Penta a.s.),
- toluen p. a. (To) (Penta a.s.),
- diethylether (Et_2O) (Penta a.s.),
- diethylamin p. a. (DEA) (LachNer),
- ethylacetát (EtOAc) (Penta a.s.),
- acetonitril (ACN) (Penta a.s.),
- trifluoroctová kyselina (TFFA) (Fluka),
- destilovaná voda (H_2O),
- hexan p. a. (Hx) (Penta a.s.),
- Dragendorffovo činidlo – skládá se z roztoku 1,7 g dusičnanu bismutitého zásaditého a 20 g kyseliny vinné v 80 ml destilované vody a roztoku 16 g jodidu draselného v 40 ml destilované vody smíšených v poměru 1:1

4.1.2. Chemikálie a materiál použitý při stanovení inhibičních aktivit

- acetylthiocholin jodid (Sigma-Adrich) (10mM roztok),
- butyrylthiocholin jodid (Sigma-Adrich) (10mM roztok),
- dimethylsulfoxid p. a. (Sigma-Adrich),
- 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina $\geq 98\%$ (Sigma-Aldrich) (5mM roztok),
- galanthamin hydrobromid (Changsha Organic Haerb Inc., China),
- huperzin A (TAZHONGHUI – Tai'an zhonghui Plant Biochemical Co., Ltd., China).
- 5mM Fosfátový pufr pH 7,4

Zásobní roztok A

10 mM roztok NaH_2PO_4 (1 litr roztoku obsahuje 1,20 g NaH_2PO_4 , nebo 1,38 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, nebo 1,56 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$).

Zásobní roztok B

10 mM roztok Na_2HPO_4 (1 litr roztoku obsahuje 1,42 g Na_2HPO_4 , nebo 1,78 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, nebo 3,58 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$).

Smíchá se 57 ml roztoku A a 283 ml roztoku B a 300 ml vody.

- 5mM Fosfátový pufr pH 7,4 obsahující 150 mM chloridu sodného
8,766 g chloridu sodného p. a. se rozpustí v 5mM fosfátovém pufru pH 7,4 a doplní se jím do 1000 ml.
- 100mM Fosfátový pufr, pH 7,4

Zásobní roztok A

200 mM roztok NaH_2PO_4 (1 litr roztoku obsahuje 24,0 g NaH_2PO_4 , nebo 27,6 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, nebo 31,2 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$).

Zásobní roztok B

200 mM roztok Na_2HPO_4 (1 litr roztoku obsahuje 28,4 g Na_2HPO_4 , nebo 35,6 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, nebo 71,63 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$).

Smíchá se 57 ml roztoku A a 243 ml roztoku B a 300 ml vody.

- Acetylcholinesterasa (HuAChE) - zdrojem je hemolyzát lidských erytrocytů,
- butyrylcholinesterasa (HuBuChE) - zdrojem je lidská plazma.

4.1.3. Chromatografické adsorbenty

- oxid hlinitý (neutrální Al_2O_3) deaktivovaný 6% H_2O , stupeň deaktivace Brockmann III, velikost zrn 40-200 μm (ACROSS),
- Kieselgel SiO_2 60 F254, 20x20 cm, hliníková deska s vrstvou silikagelu pro TLC s hloubkou vrstvy 0,2 mm (Merck).

4.1.4. Pomocné látky

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

4.1.5. Přístrojové vybavení

- vakuová odparka Büchi Rotavapor R-114 (Büchi, Flawil, Switzerland),
- NMR Varian Iniova 500 (Varian, USA),
- plynový chromatograf s hmotnostním detektorem Agilent Technologies 7890 A GC 5975 inert MSD (Agilent Technologies Santa Clara, California, USA),
- 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,
- Polarimetr P3000 (A. Krüss Optronic, Germany),
- centrifuga Boeco U-32R, rotor Hettich 1611.

4.1.6. Rostlinný materiál

- Nať *Argemone grandiflora*
Původ: Botanická zahrada Kraví Hora, vyseto 2007, sběr 30. 8. 2007
- Nať a kořen *Argemone grandiflora*
Původ: Botanická zahrada léčivých rostlin FaF UK, vyseto 2013, sběr 2.9. 2013

Rostlina byla verifikována prof. RNDr. Lubomírem Opletalem, CSc.

4.2. Obecné postupy práce

4.2.1. Příprava a čištění rozpouštědel

Všechna používaná rozpouštědla byla před použitím přečištěná destilací podle tabulkových hodnot teploty varu. Do okamžiku použití byla uchovávána v hnědých stojatkách.

4.2.2. Odpařování extraktů a frakcí

Odpařování frakcí získaných sloupcovou chromatografií a podfrakcí během přečišťování tenkovrstvou chromatografií probíhalo na vodní lázni ve vakuové odparce Büchi Rotavapor R-114 za sníženého tlaku do 50°C.

4.2.3. Skladování frakcí a izolovaných látek

Frakce a izolované látky byly po odpaření umístěny nejméně po dobu 24 hodin do exsikátoru a pak uchovávány v chladničce při teplotě 2-8°C.

4.2.4. Preparativní TLC

Preparativní tenkovrstvá chromatografie byla prováděna na deskách Kieselgel (Merck), upravených na rozměry 10x20 cm. Využití bylo prováděno v nasycených komorách.

4.2.5. Detekce alkaloidů

Detekovaná látka se rozpustila ve směsi CHCl₃ a EtOH 95% a nanasla na odstřížek desky Kieselgel (Merck), nebo chromatogram TLC, který byl nasvícen pod ultraviolovou zářivkou při délkách 254 a 366 nm. Posléze byly alkaloidy detekovány postřikem Dragendorffova činidla, kterým se obarvily na žlutou, oranžovou, či hnědou.

4.2.6. Strukturní analýza

4.2.6.1. GC-MS analýza

Měření hmotnostních spekter bylo prováděno plynovým chromatografem s hmotnostním detektorem Agilent Technologies 7890 A GC 5975 inert MSD pracujícím v režimu EI při 70 eV. Pro separaci byla použita kolona DP-5 MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm, Agilent Technologies Santa Clara, California, USA). Program byl nastaven na teplotní gradient od 100°C, rychlost 15°C/min do teploty 180°C, která byla udržována po dobu 1 minuty. Od této hodnoty teplota stoupala rychlostí 5°C/min do hodnoty 300°C, na které byla udržována 40 minut. Injektor měl teplotu 280°C, detektor 200°C, rychlost průtoku nosného plynu (helium) byla 0,8 ml/min. Detekční rozmezí bylo m/z 35-600. 1 μl roztoku alkaloidů (1 mg/ml) byl nastříknut ve „split mode“ při poměru 1:10. Identifikace alkaloidů byla provedena srovnáním naměřených spekter se spektry v knihovně NIST, literaturou a spektry referenčních látek dříve izolovaných na Katedře farmaceutické botaniky a ekologie.

4.2.6.2. NMR analýza

Pro měření NMR spekter byl použit přístroj Varian Iniova 500 (Varian) s pracovní frekvencí 499,9 MHz pro ¹H a 125,7 MHz pro ¹³C. Spektra ¹³C NMR byla měřena v 5 mm

SW širokopásmové sondě. ^1H NMR spektra byla měřena v inverzní 5 mm ID PFG sondě s využitím standardních pulzních frekvencí. Měření byla prováděna v deuteriochloroformu a při teplotě 25°C. Hodnoty spekter ^1H jsou vztaženy k inertnímu standardu hexamethyldisilanu (0,04 ppm). Hodnoty spekter ^{13}C jsou vztaženy k signálu rozpouštědla (76,99 ppm).

4.2.6.3. Optická otáčivost

Optická otáčivost byla měřena na polarimetru P3000 (A. Krüss Optronic) v CHCl_3 při 25°C.

4.2.6.4. Teplota tání

Teplota tání byla měřena pomocí bodotávku Büchi Melting Point B-540. Rychlost výhřevnosti byla 15°C/min do 10°C před předpokládanou teplotou tání dané látky. Pak byla teplota postupně zvyšována o 0,5°C/min do maximální teploty, která byla o 10°C vyšší než předpokládaná teplota tání dané látky.

4.2.7. Stanovení inhibičních aktivit

4.2.7.1. Příprava biologického materiálu

Erythrocyty pochází z čerstvě odebrané krve (18 ml krve + 2 ml 3,4% roztoku citrátu), která je odebírána zdravým dobrovolníkům. Ihned po odběru se krev rozdělí po 5 ml do šroubovacích zkumavek a odstředí se pomocí centrifugy při rychlosti 4000 rpm při 4°C po dobu 10 minut. Po prvním odstředění se provede extrakce plazmy, aby v ní nebyly erythrocyty. Tato plazma se uchovává do doby stanovení aktivity BuChE v chladničce při 4 °C (nejdéle však 6 hodin).

Zkumavky se nakloní a zbytek plazmy z erythrocytárního sedimentu se opatrně odsaje bezpopelovým filtračním papírem s hlazeným povrchem se sestříženou špičkou. Objem erythrocytární masy se odečte a posléze se sediment zředí stejným množstvím 5 mM fosfátového pufru pH 7,4 obsahujícím 150 mM chloridu sodného. Tato suspenze se rozdělí do osmi zkumavek o objemu 13 ml tak aby objem v každé z nich byl 10-12 ml. Suspenze uvnitř se promíchá a provede se odstředění za stejných podmínek, jako tomu bylo při oddělování plazmy. Takto se erythrocyty promyjí celkem 3x a promývací kapalina se zcela odstraní. K erythrocytům se posléze přidá 5 mM fosfátový pufr pH 7,4

bez chloridu sodného, v poměru erythrocyty:pufir 1:9, směs se opět homogenizuje, přelije do Erlenmayerovy baňky a erythrocyty se ponechají spontánně hemolyzovat za použití teflonového míchadla při 300 rpm. Bezprostředně po skončení řízené hemolýzy se u suspenze stanoví aktivita, v případě potřeby se 5mM fosfátovým pufrem upraví absorbance, tak aby byla v hodnotách 0,08–0,15. Naředěný hemolyzát je uchováván při -22°C až do použití.

Cholinesetasová aktivita plazmy se stanoví stejným způsobem (hodnota absorbance musí být 0,15–0,20). Plazma je uchovávána za stejných podmínek jako hemolyzát.

4.2.7.2. Stanovení cholinesterasové inhibiční aktivity (IC_{50})

Pro stanovení hodnoty IC_{50} se použije Ellmanova spektrofotometrická metoda s použitím 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoové kyseliny (DTNB)[75]. Jako substráty se používají estery thiocholinu; při reakci vzniká žlutě zbarvený produkt, který se stanoví spektrofotometricky při $\lambda=436$ nm (AChE), nebo $\lambda=412$ nm (BuChE). Sleduje se nárůst absorbance za 1 minutu. Hodnoty IC_{50} jsou vypočítány z naměřených hodnot poklesu aktivity AChE nebo BuChE nelineární regresí v programu GraphPaD Prism (verze 3.02 pro Windows; Graph PaD Software, San Diego, California, USA). Výsledky jsou porovnány s hodnotami IC_{50} galanthaminu, fysostigminu a huperzinu A jako standardy. Procenta inhibice (% I) jsou počítána podle vzorce $\% I = 100 - (\Delta A_{BL} / \Delta A_{SA}) * 100$, kde ΔA_{BL} je nárůst absorbance slepého vzorku za 1 minutu a ΔA_{SA} je nárůst absorbance měřeného vzorku.

Stanovení aktivity enzymů

Do jamek mikrotitračních destiček se v případě měření aktivity enzymů napipetuje 8,3 μ l plazmy nebo hemolyzátu, přidá se 283 μ l 5 mM DTNB, 8,3 μ l DMSO (6 jamek vedle sebe), po jednominutovém promíchání na mikrotřepačce se směs inkubuje v komoře readeru při 37 °C po dobu 5 minut, potom se přidá 33,3 μ l roztoku substrátu (10 mM acetylthiocholinjodidu nebo 10mM butyrylthiocholinjodidu) a zjistí se při příslušné vlnové délce absorbance (AChE-hemolyzát: 436 nm; BuChE-plazma: 412 nm) absorbance. Obvyklým způsobem (viz výše) se vypočte rozdíl a stanoví průměr se směrodatnou odchylkou.

Stanovení aktivity látek

Použijí se stejné objemy činidel a roztoku substrátu (6 řad po 3 jamkách), stejný postup měření, a použijí se koncentrace látky: 40 mM, 10 mM; 4 mM; 1 mM; 0,4 mM; případně další série koncentrací v tomto početním modu, je-li aktivita vysoká. Do poslední, 6. řady se pipetuje DMSO (slepý vzorek).

Stanovení aktivity extraktů

Při měření extraktů se postupuje stejně, ředění extraktů je však: 20 mg/ml; 2 mg/ml; 0,2 mg/ml; 0,02 mg/ml; 0,002 mg/ml a DMSO.

Cholinesterasová inhibiční aktivita se porovnává s referenčními látkami (Tabulka 1).

Tabulka 1 - Inhibiční aktivita standardních látek

| Látka | HuAChE (IC ₅₀) | HuBuChE (IC ₅₀) |
|--------------------|----------------------------|-----------------------------|
| Galanthamin | 1,710 ± 0,065 μM | 42,30 ± 1,30 μM |
| Huperzin A | 0,033 ± 0,001 μM | >1000 μM |
| Fysostigmin | 0,063 ± 0,001 μM | 0,130 ± 0,004 μM |

4.2.7.3. Stanovení inhibiční aktivity vůči POP (IC₅₀)

POP byla rozpuštěna ve fosfátovém pufru (PBS; 0,01 M Na/K fosfátový pufr o pH 7,4 obsahoval 137 mM NaCl a 2,7 mM KCl). Specifická aktivita enzymu byla 0,2 U/ml. Zkouška byla provedena na polystyrenové 96 jamkové mikrodestičce s plochým čířým dnem. Zásobní roztoky testovaných látek byly připraveny v DMSO (10 mM). Jednotlivá ředění (10⁻³M – 10⁻⁷M) byla připravena ze zásobních roztoků ředěním deionizovanou vodou. Kontrolní vzorek obsahoval totožnou koncentraci DMSO. Z-gly-pro-*p*-nitroanilid (substrát propyloligopeptidasy) byl rozpuštěn v 40% 1,4-dioxanu (10 mM). Pro každou reakci bylo smícháno 170 μl PBS, 5 μl testované látky a 5 μl roztoku POP. Směs byla inkubována po dobu 5 minut při 37°C. Poté bylo přidáno 20 μl substrátu a směs byla inkubována po dobu dalších 30 minut při 37°C. Přítomnost *p*-nitroanilidu, jehož tvorba byla přímo úměrná aktivitě POP, byla měřena spektrofotometricky při vlnové délce λ = 405 nm. Pro měření byl použit ELISA reader EL800 (Bio-Tek Instruments, Inc.) Inhibiční aktivita testovaných látek byla po naměření vyjádřena jako IC₅₀. Hodnoty byly porovnány se standardy Z-pro-prolinalem a bajkalinem.

4.2.8. Příprava kolony pro sloupcovou chromatografii

Chromatografický sloupec byl připraven naléváním suspenze neutrálního Al_2O_3 o velikosti zrn 40-200 μm (ACROSS) v mobilní fázi. Na kolonu byla nanášena směs látek ve formě roztěru připraveném smícháním látek s oxidem hlinitým v poměru 1:5, který byl před nanášením 24 hodin v exsikátoru.

4.3. Izolace alkaloidů

4.3.1. Výběr rostlinného materiálu

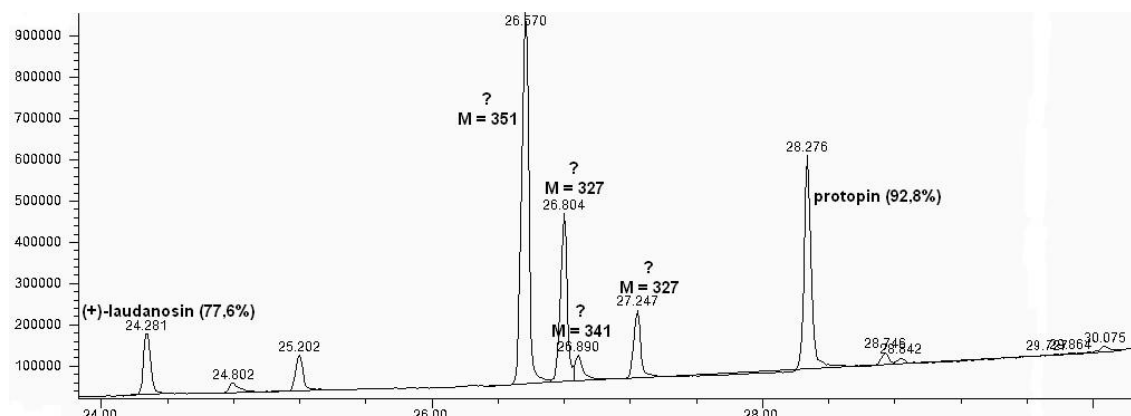
Druh *Argemone grandiflora* byl vybrán na základě screeningu potenciálních inhibitorů cholinesteras na Katedře farmaceutické botaniky a ekologie. Příprava EtOAc extraktů rostlin probíhala podle postupu diplomové práce Mgr. Petry Suchánkové [76].

Tabulka 2 - Biologická aktivita extraktů a standardů

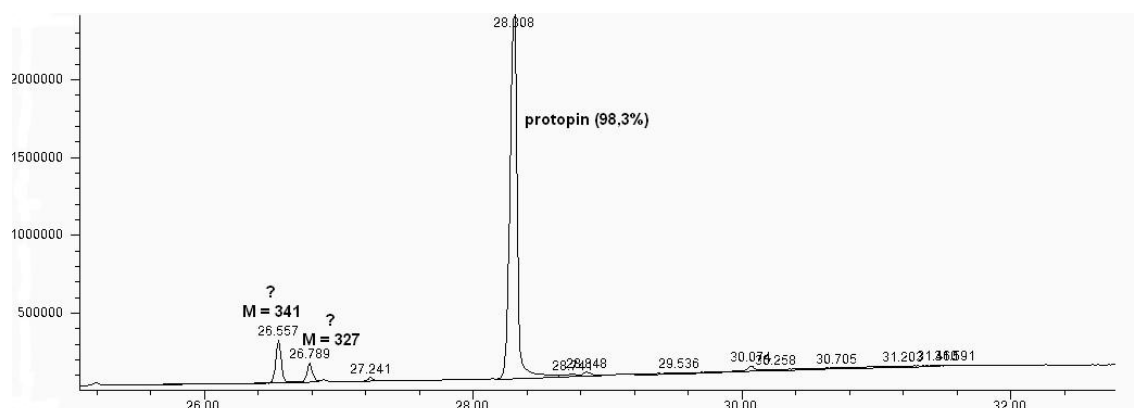
| Extrakty | AChE (IC50) | BuChE (IC50) |
|--------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| EtOAc extrakt nati AG | 15,75 ± 2,89 ug/ml | 25,47 ± 1,82 ug/ml |
| EtOAc extrakt kořenů AG | 17,60 ± 2,83 ug/ml | 35,69 ± 6,57 ug/ml |
| Galanthamin | 1,710 ± 0,065 μM | 42,30 ± 1,30 μM |
| Huperzin A | 0,033 ± 0,001 μM | >1000 μM |
| Eserin | 0,063 ± 0,001 μM | 0,130 ± 0,004 μM |

Extrakty nati a kořenů byly pak před nanášením na chromatografickou kolonu spojeny na základě podobnosti hmotnostních spekter (Obr. 9 a Obr. 10).

Obr. 9 - Hmotnostní spektrum EtOAc extraktu nati *A. grandiflora*



Obr. 10 Hmotnostní spektrum EtOAc extraktu kořene *A. grandiflora*



4.3.2. Příprava sumárního alkaloidního extraktu

Zpracování nati – původ Kraví Hora, Brno

6,22 kg nati bylo extrahováno vyvařením 95% EtOH (1:6) dvakrát po dobu 30 minut, ethanolové extrakty spojeny a odpařeny. Temně zelený olejovitý odparek byl smíchán se 1,5 l vody, rozehrán na 80 °C, přidána 2% HCl (pH 1), suspenze zředěna vodou na 3 l a po zchlazení byl roztok zfiltrován přes vliselin (odstraněn chlorofyl a sedimenty). Vzniklo 2,7 l vodného hnědého extraktu.

Výtřeppek A-CHCl₃

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

Výtřeppek A-Et₂O (vyčištěný A-CHCl₃)

Předcházející výtřeppek byl rozpuštěn za tepla (cca 70 °C) ve 200 ml 2% HCl, roztok byl zředěn vodou na 400 ml, sonikován, posléze zfiltrován, filtry promyty a filtráty spojeny. Celkový obsah filtrátu byl po zředění 700 ml. Kyselý roztok alkaloidů (pH ca 1) byl vytřepán 2x 200 ml Et₂O. Vodná fáze byla zalkalizována 10% Na₂CO₃ na pH 9-10 a vytřepána 4x 300 ml Et₂O. Tento Et₂O roztok byl promyt 4x 150 ml 2% HCl, 600 ml vodného roztoku alkaloidů zneutralizováno 10% Na₂CO₃ a suspenze alkaloidů vytřepána 3x 300 ml Et₂O. Tento postup čištění byl opakován ještě 2x (vždy vytřepání 1/3 objemu Et₂O). **Bylo získáno 9,0 g bezbarvého, sklovitého, jen velmi jemně nahnědlého výtřepku.**

Výtřeppek J₁

Vodný roztok po přípravě výtřepku A-CHCl₃ byl zneutralizován 25% HCl na pH 3 a k roztoku bylo přidáno 60 g jodidu draselného, rozpuštěném ve 100 ml vody. Roztok byl ponechán stát přes noc. 4 litry tohoto roztoku byly vytřepány 3x 1 litrem směsi CHCl₃:EtOH 95:5, žlutý roztok organické fáze odpařen.

Vodná fáze stále poskytovala zákal s Mayerovým činidlem, ale vytřepávání už dále nebylo prováděno (je možné, že roztok obsahuje některé bazické alkaloidy vytřepatelné jako výtřeppek B, ale to nebylo provedeno). Tento výtřeppek o hmotnosti 2,6 g byl hnědý, s jasně žlutou vyloučenou práškovitou fází.

Zpracování nati a kořenů – původ Botanická zahrada léčivých rostlin FaF UK, Hradec Králové

Pro získání většího množství terciárních alkaloidů bylo extrakčně zpracováno ještě 1726 g nati a kořenů *A. grandiflora* (1300 g nati a 426 g kořenů).

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

Výtřeppek A-CHCl₃

Tento extrakt byl rozdělen na 2x 1 litr vodného extraktu, který byl každý alkalizován 10% Na₂CO₃ na pH 9-10 a suspenze vytřepána 3x 300 ml CHCl₃. Chloroformové výtřepky byly pak spojeny. Spojený chloroformový výtřeppek byl přečištěn vytřepáním s 4x 100 ml 2% H₂SO₄. Následně byla vodná fáze alkalizována 10% Na₂CO₃ na pH 9-10 a suspenze byla vytřepána 4x 100 ml diethyletheru. Po odpaření diethyletheru bylo získáno 1,35 g světle nahnědlého, viskózního výtřepku, který byl přidán k předešlému výtřepku A-Et₂O. **Celkově bylo získáno 10,35 g výtřepku A-Et₂O.**

4.3.3. Separace alkaloidního výtřepku na chromatografickém sloupci

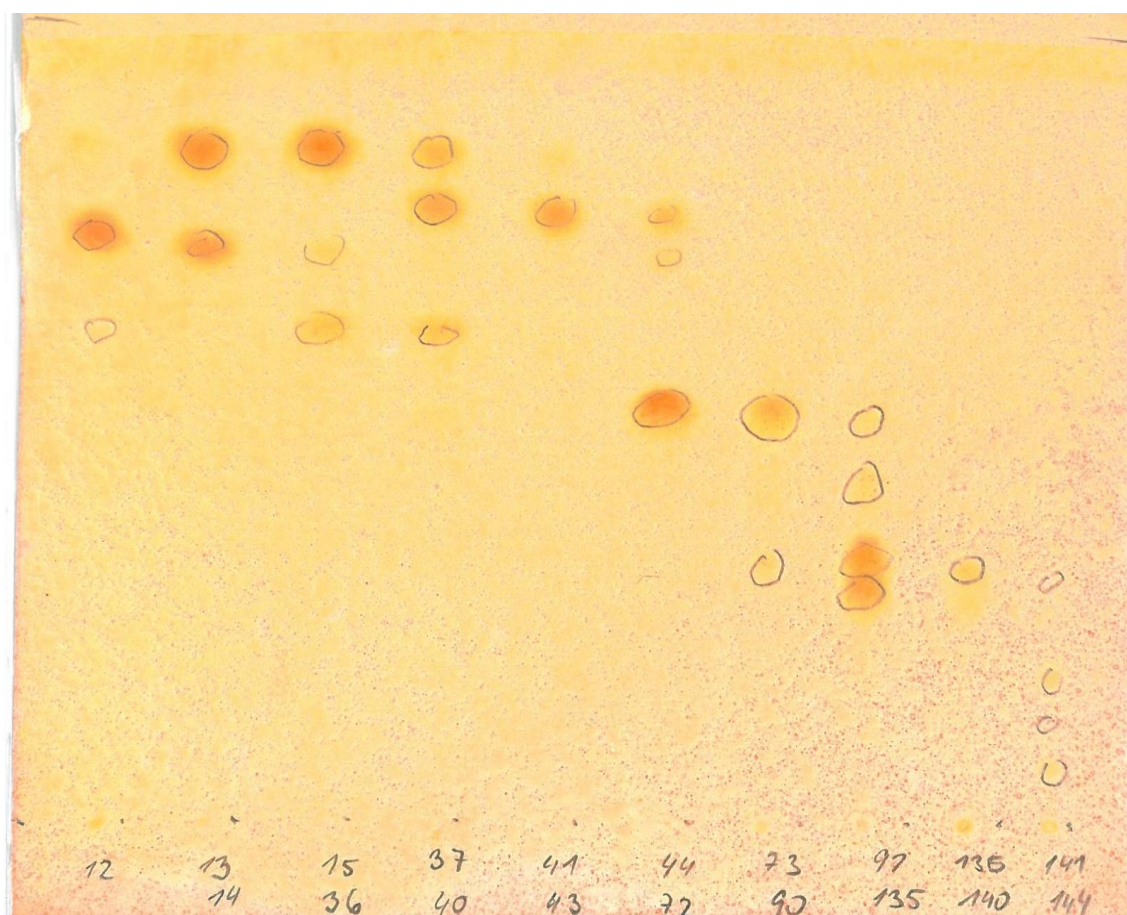
Byl připraven roztěr sumárního diethyletherového výtřepku s 52,5 g neutrálního Al₂O₃ o velikosti zrn 140-200 μm (ACROSS). K náplni kolony bylo použito 621 g stejného adsorbentu. Eluce pak byla prováděna směsmi měnící se polaritou z CHCl₃, LB a EtOH.

Frakce byly jímány po 0,5 l. Bylo získáno 144 frakcí, které byly podle zkoušek na TLC (Obr. 11) spojeny do 9 souhrnných frakcí, jak je popsáno v (Tabulka 3).

Tabulka 3 - Souhrnné frakce

| Frakce | Eluční soustava | Hmotnost [g] |
|----------------|--|--------------|
| 12 | CHCl ₃ :LB 20:80 | 0,220 |
| 13-14 | CHCl ₃ :LB 20:80 | 0,650 |
| 15-36 | CHCl ₃ :LB 20:80 | 1,680 |
| 37-40 | CHCl ₃ :LB 20:80 CHCl ₃ :LB 25:75 | 0,230 |
| 41-43 | CHCl ₃ :LB 25:75 | 0,066 |
| 44-90 | CHCl ₃ :LB 25:75 | 3,137 |
| 91-135 | CHCl ₃ :LB 25:75 CHCl ₃ :LB 40:60 CHCl ₃ :LB 50:50 CHCl ₃ :LB 75:25 CHCl ₃ 100 CHCl ₃ :EtOH 50:50 | 0,7624 |
| 136-138 | CHCl ₃ :EtOH 50:50 | 0,311 |
| 141-144 | EtOH 100 | 0,353 |

Obr. 11 - Celkové TLC spojených frakcí



adsorbent SiO₂ (Merck), eluční soustava To:EtAc:DEA 50:45:5, vyvíjeno 1x

4.3.4. Separace alkaloidů z frakce 41-43

Frakce byla rozpuštěna ve směsi EtOH a CHCl₃. Krystalizací ze směsi EtOH a CHCl₃ bylo získáno 32 mg bílé krystalické sloučeniny **VM-1**.

Podle GC-MS analýzy se jedná pravděpodobně o allokryptopin.

4.3.5. Separace alkaloidů z frakce 91-135

Pro separaci byla použita preparativní TLC na 44 komerčních SiO₂ deskách (Merck, 20x10 cm) za použití soustavy EtOAc:ACN:TFFA 40:10:0,1, počet vyvíjení 4x (Obr. 12). Soustava ethyl-acetát (EtOAc), acetonitril (ACN) a trifluoroctová kyselina (TFFA) byla použita, protože v soustavách s DEA se nepodařilo látky od sebe rozdělit. To se podařilo se to až v kombinaci s TFFA. Byly získány 4 zóny:

1. zóna 250 mg (RF 0,64)
2. zóna 306 mg (RF 0,59)

3. zóna 209 mg (RF 0,15) – přečištěna vytřepáním rozpuštěním v 2% HCl a následným vytřepáním po alkalizaci 10 % Na₂CO₃ do Et₂O. Získáno bylo 2,5 mg alkaloidu, které dále nebylo zpracovááno, protože toto množství není dostatečné na určení struktury i biologické testy.
4. zóna 144 mg (RF 0,06) – rovněž přečištěna vytřepáváním do Et₂O, tato podfrakce obsahovala stopy alkaloidu (2 mg), nebyla dále zpracovávána.

Alkaloidy ze zóny 1 a 2 podle kontrolní TLC (stejná soustava a počet vyvíjení), se nepodařilo od sebe úplně oddělit, byly dále děleny jako směs na preparativním TLC (30 desek), soustava EtOAc:ACN:TFFA 45:5:0,1, počet vyvíjení 4x).

Byly získány 2 zóny:

1. zóna 200 mg (Rf 0,44)
2. zóna 159 mg (Rf 0,39).

Alkaloidy z 1. zóny byl přečištěn (200 mg, Rf 0,44) přečištěný přetřepáním do Et₂O a následnou krystalizací z Et₂O bylo získáno 18 mg bílých krystalů s Mr 327 (**VM2** – podle GC-MS analýzy jde o munitagin), 2. zóna (159 mg, Rf 0,39) obsahovala směs 2 alkaloidů s Mr 341 a 343. Alkaloidy byly od sebe rozděleny preparativní TLC na 10 deskách 20x10 cm (SiO₂ F254, Merck). Byla použita eluční soustava cHx:aceton:NH₃ (40:60:1), počet vyvíjení 1x.

Byly získány 2 zóny:

1. zóna 33 mg (Rf 0,38)
2. zóna 45 mg (Rf 0,26)

Obě frakce byly přečištěny vytřepáním do Et₂O a byly získány bílé práškovité látky. Z první zóny 1,35 mg (alkaloid s Mr 343, dále neurčeno – nedostatečné množství na analýzu – 1,35 mg) a 7,1 mg alkaloidu s Mr 341 (**VM-3** – podle GC-MS analýzy jde o norargemonin).

Obr. 12 - Kontrolní TLC frakce 91-135



adsorbent SiO_2 , eluční soustava EtOAc:acetonitril:trifluoroctová kys. 40:10:0,1, počet vyvíjení 4x

4.3.6. Separace alkaloidů z frakce 136-140

Frakce byla rozpuštěna ve vodě s 2% HCl, přefiltrována s křemelinou a 4x vytřepána s Et_2O . Frakce nebyla dále zpracovávána - obsahovala stejné alkaloidy jako frakce 91-135 a poskytovala pouze slabou reakci s Dragendorffovým činidlem – nízký obsah alkaloidů.

4.3.7. Separace alkaloidů z frakce 141-144

Frakce byla přečištěna přetřepáním do Et_2O , nanesena na 24 desek 20x10 cm SiO_2 Klieselgel (Merck), která byla rozdělena na 6 zón.

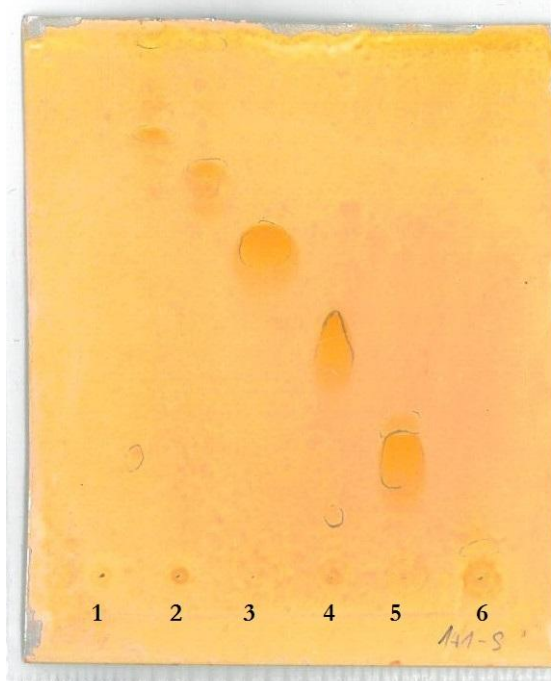
1. zóna 10 mg (Rf 0,847)
2. zóna 7 mg (Rf 0,788)
3. zóna 43 mg (Rf 0,682)
4. zóna 123 mg (Rf 0,576)
5. zóna 112 mg (Rf 0,318)
6. zóna 42 mg (Rf 0,094)

Na kontrolním TLC (Obr. 13: Rf 1 - 0,219; 0,945; 2 - 0,712; 0,740; 3 - 0,589; 4 - 0,411; 5 - 0,205; 0,274; 6 - 0,068) se ukázalo, že zóny 1, 2, a 5 obsahují směs minimálně dvou alkaloidů.

Ze zón 141-1, 141-2, 141-6 se nepodařilo extrahovat alkaloidy v potřebném množství a čistotě pro jakákoliv měření. Z podfrakce 142-3 se podařilo izolovat 13,5 mg hnědé krystalické látky **VM2** (podle GC-MS analýzy jde o munitagin), z podfrakce 141-4 se izolací získalo 19,2 mg látky **VM4**, ve formě hnědozelené pěny. Frakce byla silně znečištěna, nebyla analyzována ze strukturního hlediska, předpoklad získání jen stopového množství alkaloidu.

Podfrakce 141-5 byla dále preparativně rozdělena na deskách Klieselgel (Merck) za použití eluční soustavy To:DEA 9:1, 6x vyvíjeno. Po obtížném dělení byly vyizolovány dvě látky, 2,2 mg **VM5** (amorfní, hnědá barva) a 2,9 mg **VM6** (amorfní, hnědá barva). Tyto sloučeniny nebyly analyzovány ze strukturního hlediska, protože nebyly izolovány v dostatečném množství pro provedení biologických testů.

Obr. 13 - Kontrolní TLC frakce 141-144 rozdělené na 6 podfrakcí



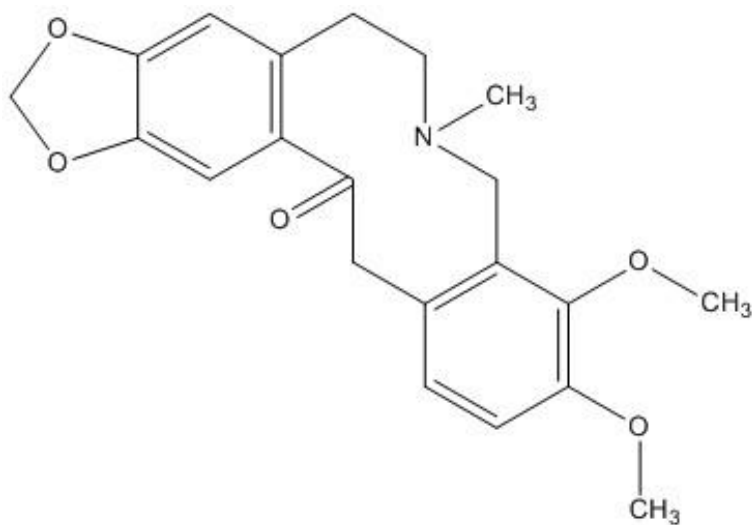
eluční soustava To:EtOAc:DEA 4:5:1, vyvíjeno 4x

5. VÝSLEDKY

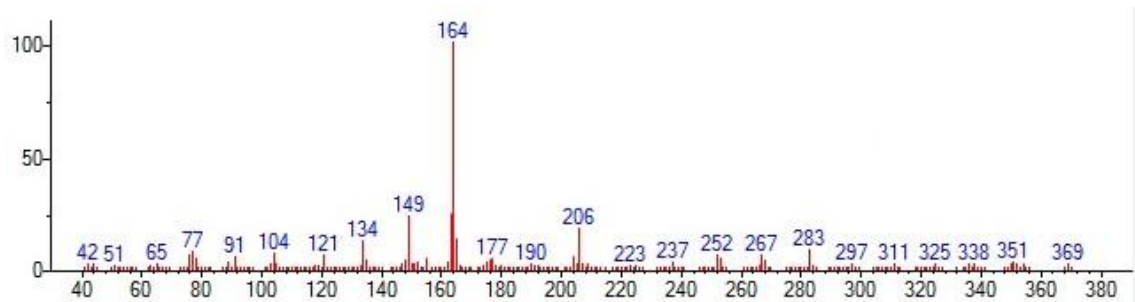
5.1. Strukturní analýza

5.1.1. Allokryptopin (VM1)

Obr. 14 - Struktura allokryptopinu



Obr. 15 - hmotnostní spektrum allokryptopinu

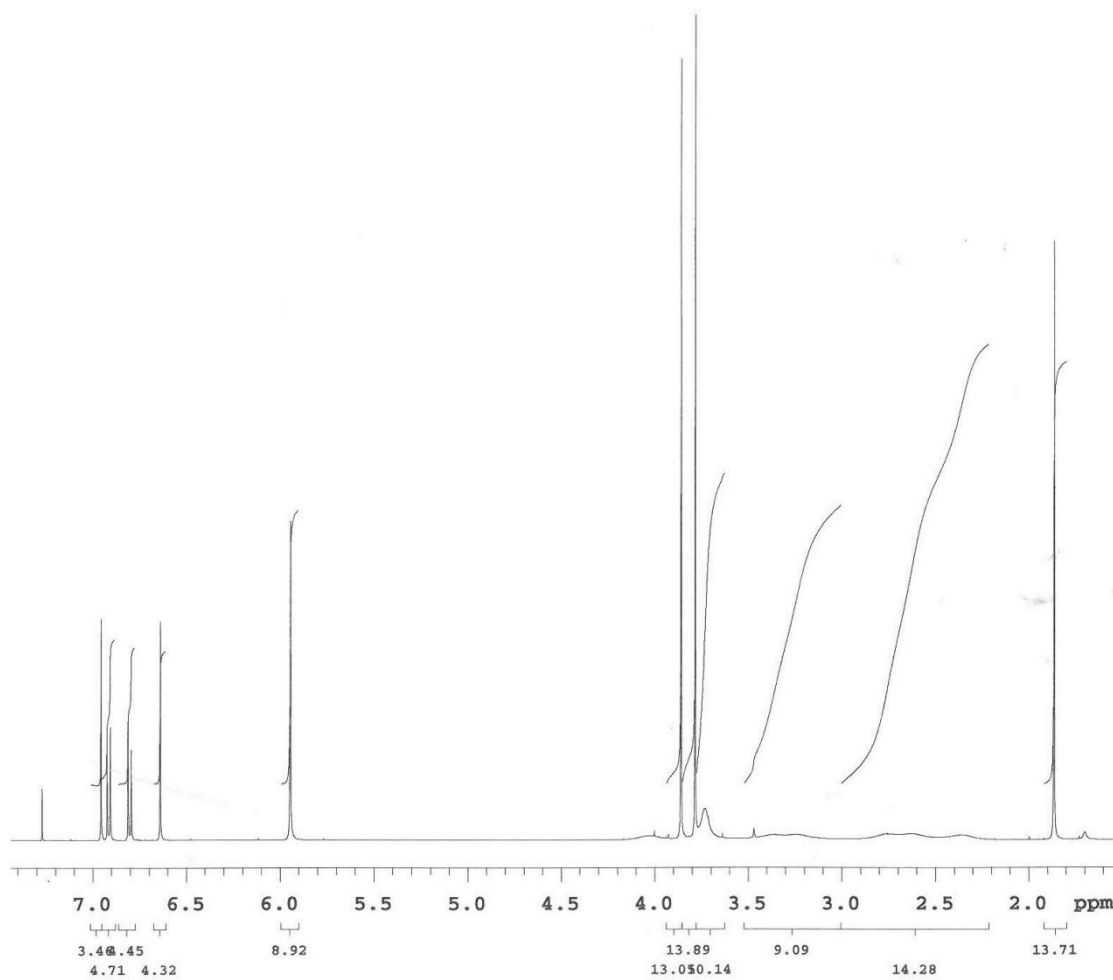


Optická otáčivost: Allokryptopin je opticky neaktivní sloučenina – neměřeno.

Teplota tání: 159-161°C

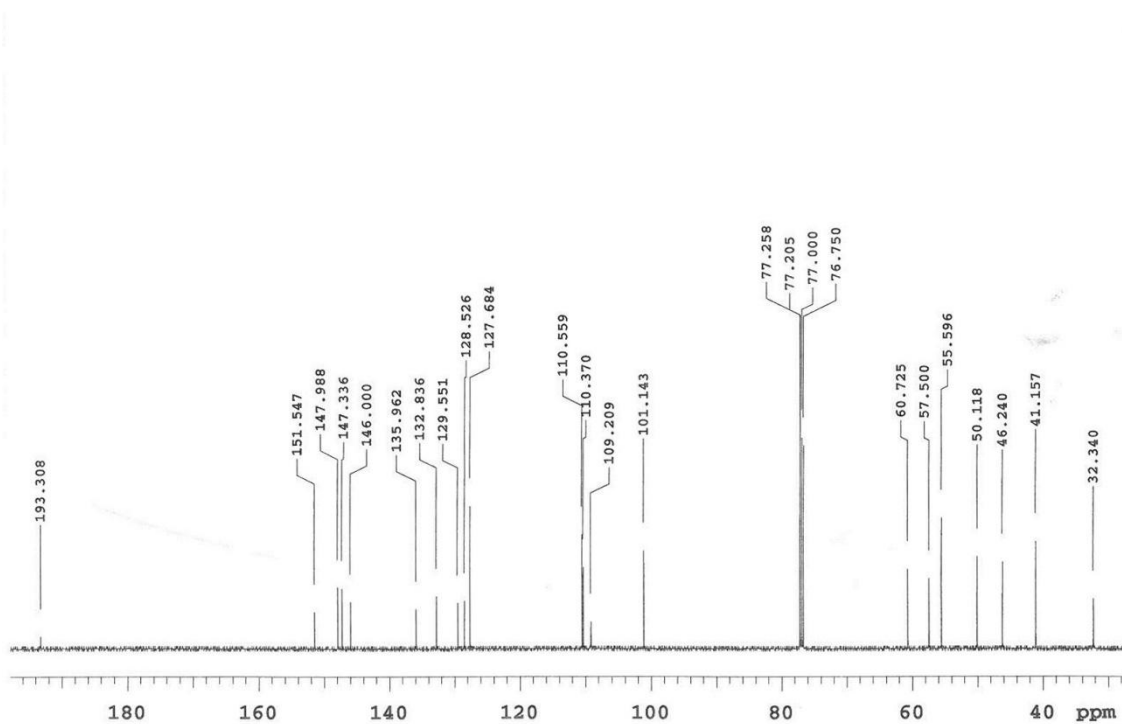
$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 25°C): δ 6.95 (1H, s); 6.91 (1H, d); 6.80 (1H, d, $J = 8.24$ Hz); 6.63 (1H, s); 5.94 (2H, s); 3.86 (3H, s); 3.78 (3H, s); 3.72 (2H, bs); 2.2-3.5 (3H, m); 1.86 (3H, s).

Obr. 16 - $^1\text{H NMR}$ spektrum allokryptopinu



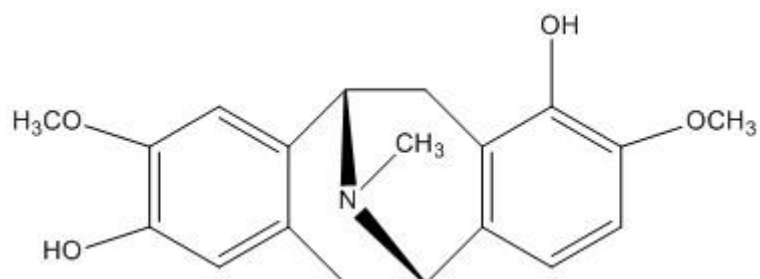
^{13}C NMR (CDCl_3 , 25°C): δ 193.6, 151.8, 148.3, 147.9, 146.6, 136.3, 133.1, 129.8, 128.8, 128.0, 110.8, 110.7, 109.5, 101.4, 61.0, 57.8, 55.9, 50.4, 46.5, 41.4, 32.6.

Obr. 17 - ^{13}C NMR spektrum allokryptopinu

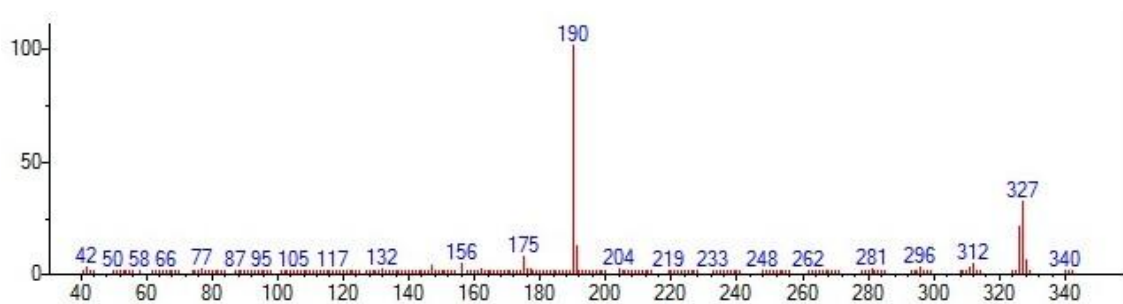


5.1.2. (-)-Munitagin (VM2)

Obr. 18 - Struktura (-)-munitaginu



Obr. 19 - Hmotnostní spektrum (-)-munitaginu

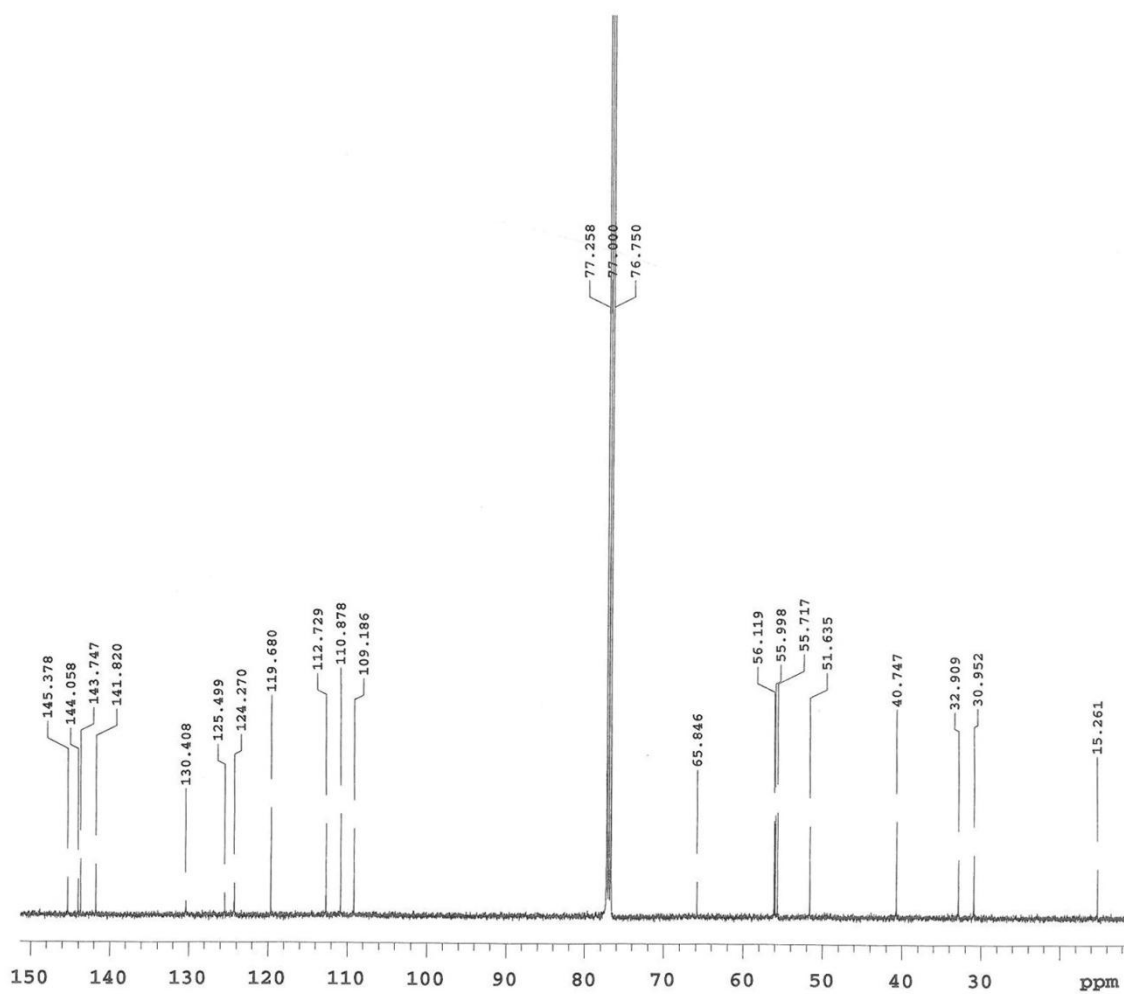


Optická otáčivost: $[\alpha]_D^{25} = -177,7^\circ (c\ 0.257; \text{CHCl}_3)$

Teplota tání: neměřena

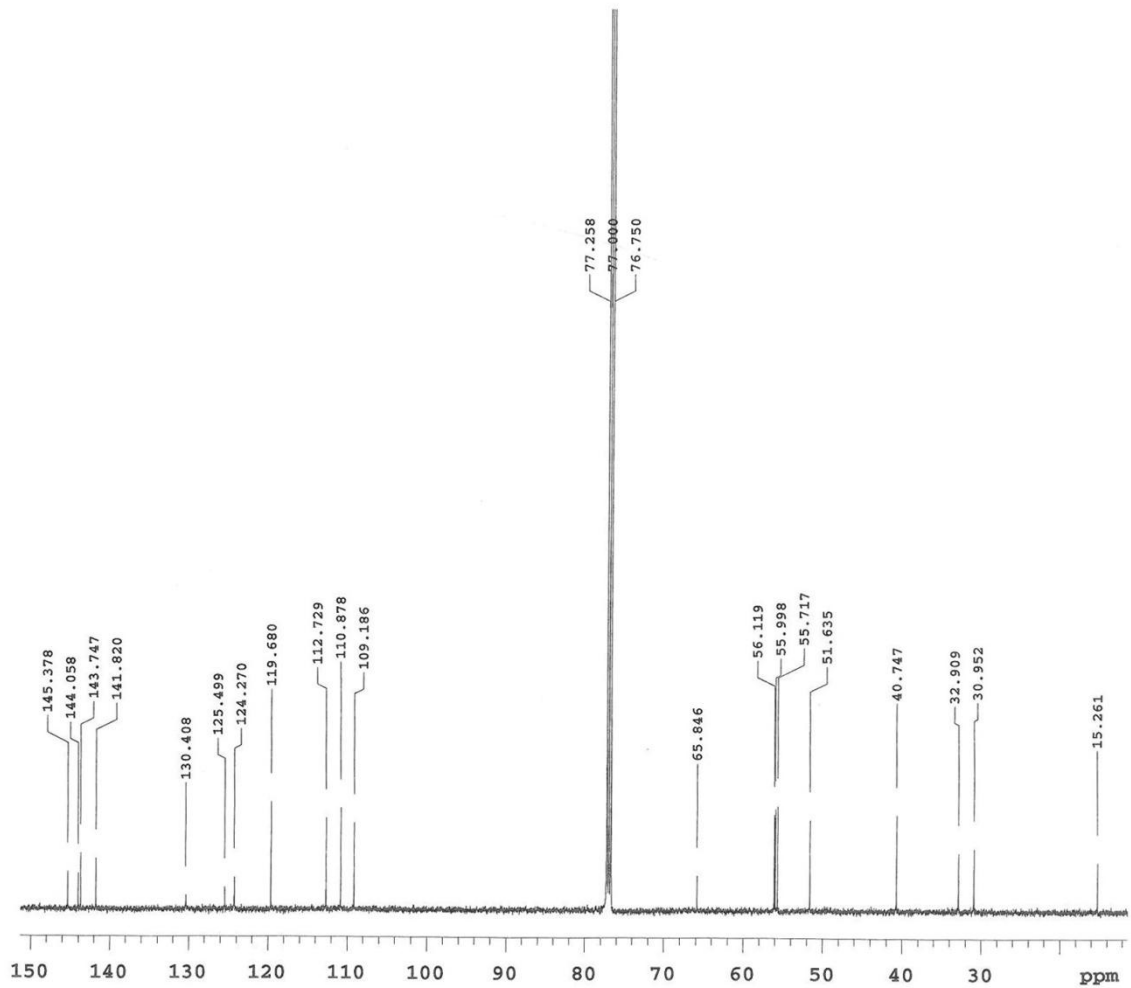
^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 6.66 (1H, d, $J=8.2$ Hz, H2), 6.66 (1H, s, H10), 6.50 (1H, d, $J=8.2$ Hz, H1), 6.44 (1H, s, H7), 5.72 (1H, bs, OH), 4.38 (1H, d, $J=5.7$ Hz, H5), 3.99 (1H, d, $J=5.7$ Hz, H11), 3.83 (3H, s, OCH_3), 3.78 (3H, s, OCH_3), 3.43-3.31 (2H, m, H6, H12), 2.75 (1H, d $J=16.1$ Hz, H6), 2.62 (1H, d, $J=16.1$ Hz, H12), 2.55 (3H, s, NCH_3)

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



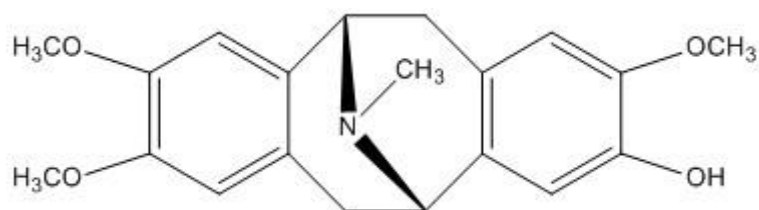
^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ 144.4, 144.1, 143.8, 141.8, 130.4, 125.5, 124.3, 124.3, 119.7, 112.7, 110.9, 109.2, 56.1, 56.0, 55.7, 51.6, 40.8, 32.9, 31.0

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

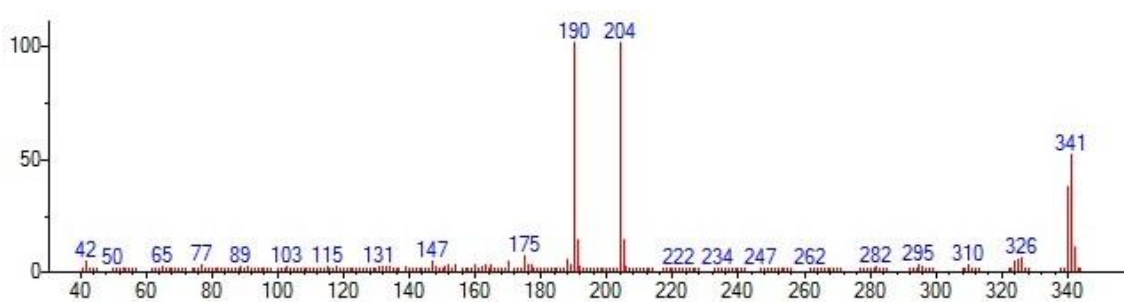


5.1.3. (-)-Norargemonin (VM3)

Obr. 22 - Struktura (-)-norargemoninu



Obr. 23 - Hmotnostní spektrum (-)-norargemoninu

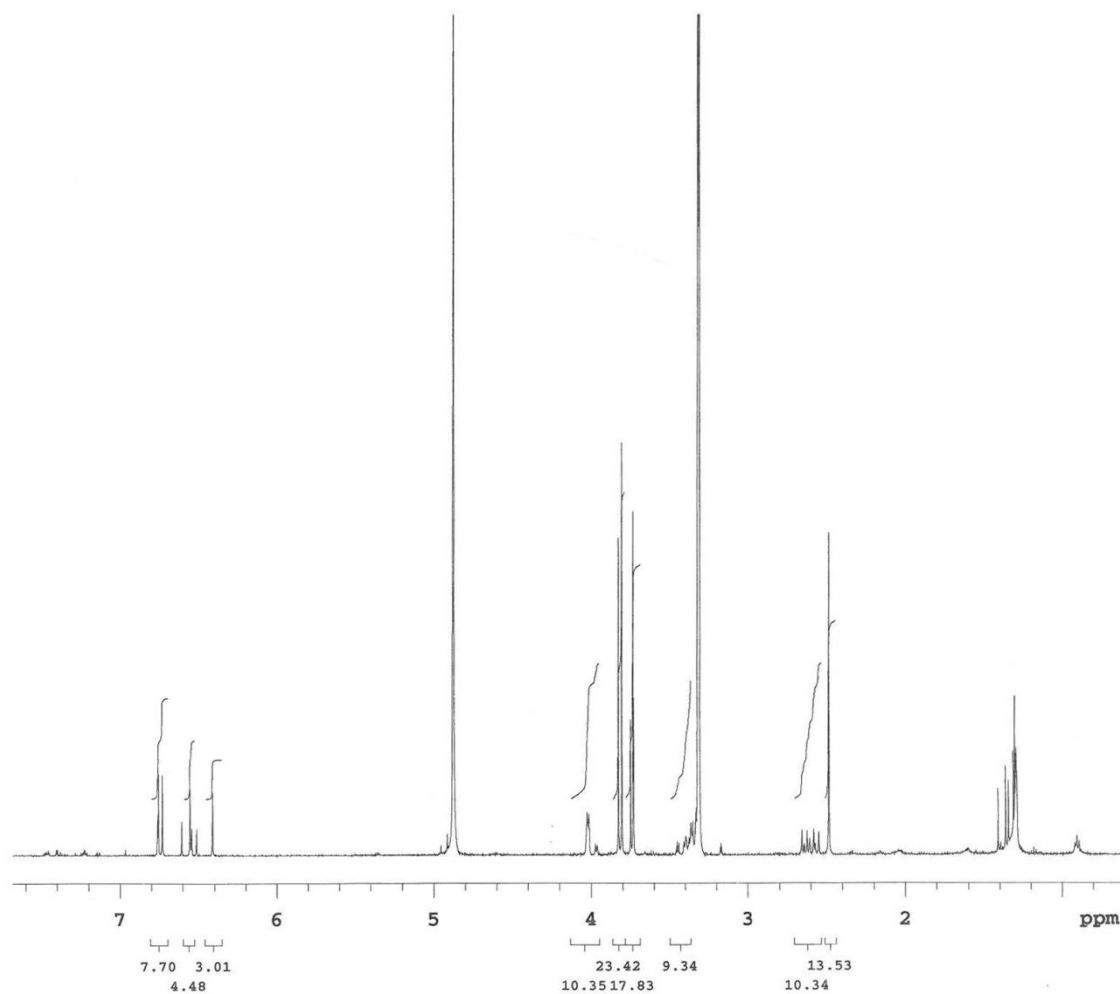


Optická otáčivost: $[\alpha]_D^{25} = -152^\circ$ (*c* 0.09; CHCl₃)

Teplota tání: 237-238°C

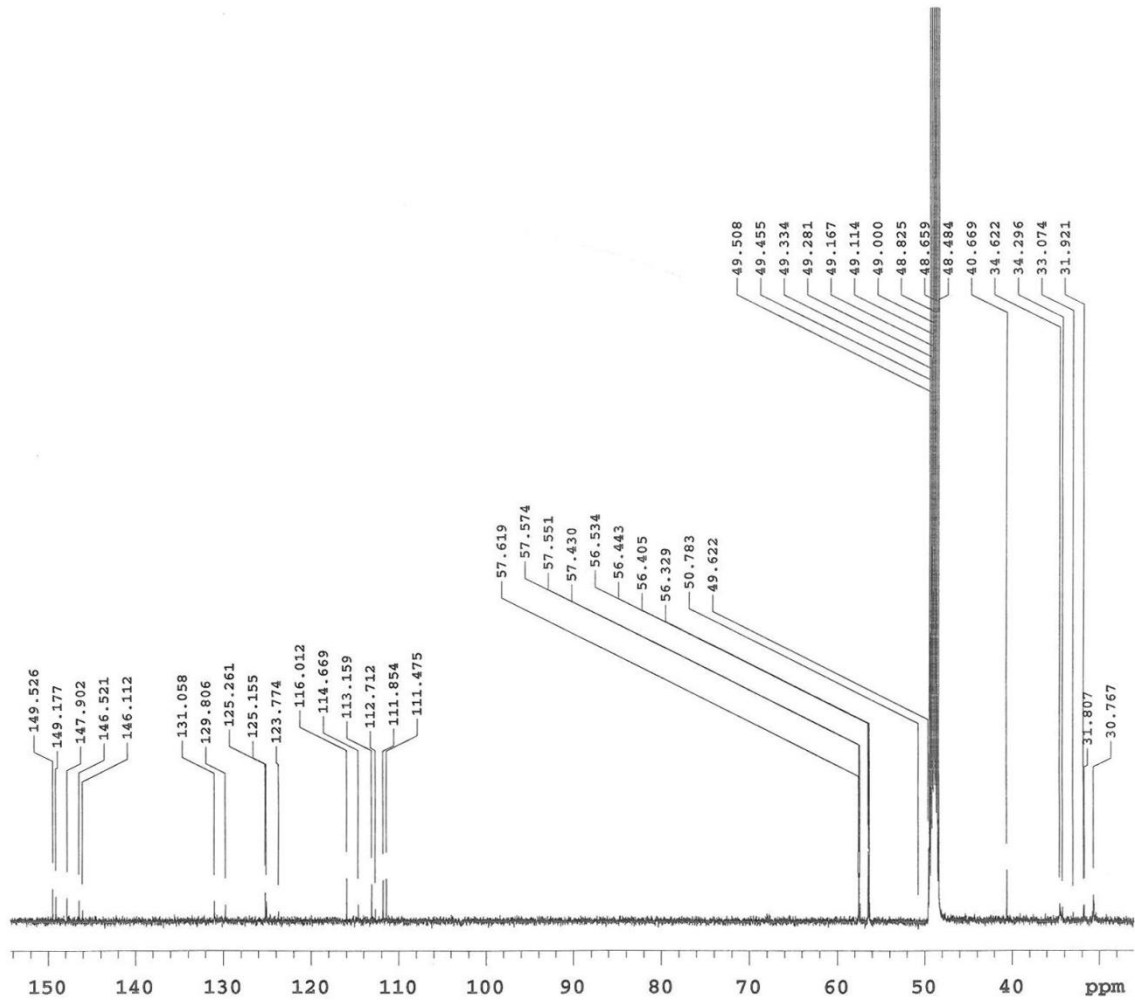
$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CD_3OD) δ 6.76 (1H, s, H4), 6.73 (1H, s, H7), 6.56 (1H, s, H1), 6.41 (1H, s, H10), 4.04-4.00 (2H, m, H5, H11), 3.83 (3H, s, OCH_3), 3.81 (3H, s, OCH_3), 3.74 (3H, s, OCH_3), 3.42-3.35 (2H, m, H6, H12), 2.68-2.53 (2H, m, H6, H12), 2.49 (3H, s, NCH_3)

Obr. 24 - $^1\text{H NMR}$ spektrum (-)-norargemoninu



^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD) δ 149.5, 149.2, 147.9, 146.5, 131.1, 129.8, 125.3, 125.2, 116.0, 113.2, 111.9, 111.5, 57.6, 57.6, 56.5, 56.4, 56.4, 40.7, 34.6, 34.3

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



5.2. Inhibiční aktivity izolovaných alkaloidů

Tabulka 4 - Biologická aktivita vybraných alkaloidů *Argemone grandiflora*

| Alkaloid | AChE (IC50 μM) | BuChE (IC50 μM) | POP (IC50 μM) |
|-----------------------------|---------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|
| allokryptopin | 250,0 \pm 2,52 | 530 \pm 28,2 | > 1000 |
| (-)-munitagin | 62,29 \pm 5,81 | 837,4 \pm 23,03 | M |
| (-)-norargemonin | 205,17 \pm 11,66 | > 1000 | netestováno ¹ |
| galanthamin ^R | 1,710 \pm 0,065 μM | 42,30 \pm 1,30 μM | netestováno |
| huperzin A ^R | 0,033 \pm 0,001 μM | >1000 μM | netestováno |
| eserin ^R | 0,063 \pm 0,001 μM | 0,130 \pm 0,004 μM | netestováno |
| bajkalin ^R | netestováno | netestováno | 610 \pm 21 |
| Z-pro-prolinal ^R | netestováno | netestováno | 3,27 \pm 0,02 $\times 10^{-3}$ |

^R – referenční látka, ¹ – izolováno pouze množství pro změření inhibice AChE a BuChE,

M – měří se,

6. DISKUZE

Zkoumaný druh *A. grandiflora* (*Papaveraceae* L.) byl vybrán pro dobré výsledky bio-guided assay při screeningu za použití Ellmanovy spektrofotometrické metody *in vitro* extraktů rostlin na inhibici AChE a BuChE.

Sumární alkaloidní extrakt byl pomocí sloupcové chromatografie rozdělen na frakce, ze kterých byly dalšími fytochemickými metodami extrahovány čisté terciární alkaloidy.

Podařilo se získat dostatečné množství allokryptopinu a (–)-munitaginu pro měření inhibiční aktivity k AChE, BuChE a POP, a množství (–)-norargemoninu pro měření inhibičních aktivit proti AChE a BuChE.

Hodnoty IC_{50} extraktů byly vyjádřeny v jednotkách $\mu\text{g/ml}$ pro nať: $IC_{50 \text{ AChE}} = 15,75 \pm 2,89$, $IC_{50 \text{ BuChE}} = 25,47 \pm 1,82$ a pro kořen: $IC_{50 \text{ AChE}} = 17,60 \pm 2,83$, $IC_{50 \text{ BuChE}} = 35,69 \pm 6,57$. Pro porovnání IC_{50} galanthaminu je $IC_{50 \text{ AChE}} = 0,534 \pm 0,021 \mu\text{M}$.

Námi naměřené biologické aktivity vybraných alkaloidů (Tabulka 4) bohužel neprokázaly, že by některý z obsažených alkaloidů byl zodpovědný za relativně slibnou inhibiční aktivitu sumárních extraktů kořene a nati. Nejlépe v inhibici AChE dopadl munitagin s $IC_{50 \text{ BuChE}} = 62,29 \pm 5,81 \mu\text{M}$. V inhibici BuChE neměl žádný z měřených vybraných izolovaných alkaloidů potenciálně zajímavou inhibici. Aktivita byla měřena za použití Ellmanovy metody za použití galanthaminu, huperzinu A a fysostigminu jako standardů.

Ani inhibice POP nepřinesla žádné potenciálně zajímavé výsledky. Měřený allokryptopin měl zanedbatelnou inhibiční aktivitu vůči POP. Jako standardu pro měření bylo použito Z-pro-prolinalu a bajkalinu.

7. CITOVANÁ LITERATURA

1. Český statistický úřad. *Jak dlouhý život máme před sebou? | ČSÚ v Českých Budějovicích* [online]. 16. 9. 2014 [cit. 2015-03-02]. Dostupné z: http://www.czso.cz/x/redakce.nsf/i/jak_dlouhy_zivot_mame_pred_sebou
2. Zemřelí podle seznamu příčin smrti, pohlaví a věku v ČR, krajích a okresech - Česká republika podle *Český statistický úřad* [online]. 17. 12. 2011 [cit. 2015-16-03]. Dostupné z: http://www.czso.cz/csu/2011edicniplan.nsf/kapitola/4017-11-r_2011-01
3. Annex Table 2: Deaths by cause, sex and mortality stratum in WHO regions, estimates for 2002. In: *The world health report 2004 - changing history*. [online]. 2004 [cit. 2015-03-16]. Dostupné z: http://www.who.int/whr/2004/annex/topic/en/annex_2_en.pdf
4. ANDERSON, R. N.; SMITH, B. L. Deaths: Leading Causes for 2002. *National Vital Statistics Reports*. Hyattsville (Maryland): National Center for Health Statistics, 7. března 2005, **52** (17), 1-92.
5. WANG, R.; YAN, H.; TANG, X. Progress in studies of huperzine A, a natural cholinesterase inhibitor from Chinese herbal medicine. *Acta Pharmacologica Sinica*. Shanghai: Shanghai Institute of Materia Medica, 2006, č. 27, s. 1-26. ISSN 1671-4083.
6. STELZMANN, R. A.; SCHNITZLEIN, H. N.; MURTAGH, F. R. An English Translation of Alzheimer's 1907 Paper "Über eine eigenartige Ekankung der Hirnrinde". *Clinical Anatomy*. Tampa (Florida, USA): Wiley-Liss, Inc. 1995, **8** (6), 429-31. ISSN 1098-2353.
7. KOUKOLÍK, F.; JIRÁK, R. *Alzheimerova nemoc a další demence*. Praha: Grada Publishing, 1998. ISBN 80-7169-615-3.
8. KLÁN, J. Demence - závažný medicínský problém stárnoucí populace. *practicus*. 2011, **2011** (5), 18-21. ISSN 1213-8711.
9. LUŽNÝ, J. *Gerontopsychiatrie*. Praha: Stanislav Jihaňák - TRITON, 2012. ISBN 987-

80-7387-573-2.

10. STREET, J. S.; CLARK, W. S.; GANNON, K. S.; CUMMINGS, J. L.; BYMASTER, F. P.; TAMURA, R. N.; MITAN, S. J. Olanzapine Treatment of Psychotic and Behavioral Symptoms in Patients With Alzheimer Disease in In: *JAMA Psychiatry* [online]. 2000 [cit. 2015-03-28]. DOI 10.1001/archpsyc.57.10.968
11. COCKRELL, J. R.; FOLSTEIN, M. F. Mini-Mental State Examination. In: *Principles and Practice of Geriatric Psychiatry*. 2nd ed. COPELAND, J. R. M. M. T. ABOU-SALEH a D. G. BLAZER, eds. Chichester (West Sussex, UK): John Wiley & Sons, Ltd. 2002, s. 140-41. ISBN 0-471-98197-4.
12. JIRÁK, R. Diagnostika a terapie Alzheimerovy choroby. *Neurologia pre prax*. Olomouc: SOLEN, s. r. o. 2008, **2008** (4). ISSN 1339-4223.
13. URBANOVÁ, B.; TOMEK, A.; MIKULÍK, R.; MAGEROVÁ, H.; SHEARDOVÁ, K.; HOŘÍNEK, D.; HORT, J. Vztah vaskulárních rizikových faktorů a Alzheimerovy choroby. *Česká a slovenská neurologie a neurochirurgie*. Brno: Ambit Media, 2012, **75** (6), 694-99. ISSN 1802-4041.
14. O'BRIEN, R. J.; WONG, P. C. Amyloid Precursor Protein Processing and Alzheimer's Disease. *Annual Review Of Neuroscience*. Annual Reviews, 2011, **2011** (34), 185–204. ISSN 1545-4126.
15. SERRANO-POZO, A.; FROSCHE, M. P.; MASLIAH, E.; HYMAN, B. T. Neuropathological Alterations in Alzheimer Disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. New York: Cold Spring Harb Perspect Med, 2011, č. 1. ISSN 2157-1422.
16. MALONEY, B.; LAHIRI, D. K. The Alzheimer's amyloid β -peptide ($A\beta$) binds a specific DNA $A\beta$ -interacting domain ($A\beta$ ID) in the *Gene*. Amsterdam: Elsevier, 15. listopadu 2011, **488** (1-2), 1-12. ISSN 1879-0038.
17. KOUDELKOVÁ, M. Diagnostika Alzheimerovy demence prostřednictvím proteinů tau, fosfo-tau a beta-amyloidu v *Labor Aktuell*. Praha: Roche Diagnostics, 2010, **10** (2), 8-12. ISSN 1214-7672.
18. ELLEDER, M. Amyloid a amyloidosy. In: *1. lékařská fakulta Univerzity Karlovy v*

Praze [online]. 2007 [cit. 2015-04-12]. Dostupné z: <http://www1.lf1.cuni.cz/udmp/web2/cell/amyloid.pdf>

19. ANDRADE-MORAES, C. H.; OLIVEIRA-PINTO, A. V.; CASTRO-FONSECA, E.; DA SILVA, C. G.; GUIMARAES, D. M.; SZCUPAK, D.; PARENTE-BRUNO, D. R.; CARVALHO, L. Cell number changes in Alzheimer's disease relate to dementia, not to plaques and tangles. *Brain: a Journal of Neurology*. Oxford: Oxford University Press, 2013, č. 136, s. 3738-52. ISSN 1460-2156.
20. IQBAL, K.; ALONSO, A. DEL C.; CHEN, S.; CHONAN, M. O.; EL-AKKAD, E.; GONG, C.; KHATOON, S.; BIN, L.; LIU, F.; RAHMAN, A.; TANIMUKAI, H.; GRUNDKE-IQBAL, I. Tau pathology in Alzheimer disease and other tauopathies. *Biochimica et Biophysica Acta*. Amsterdam: Elsevier, 2005, č. 1739, s. 198-210. ISSN 0006-3002.
21. HOOPER, C.; KILLICK, R.; LOVESTONE, S. The GSK3 hypothesis of Alzheimer's disease. *Journal of Neurochemistry*. Chichester: International Society for Neurochemistry, 2008, č. 104, s. 1433–39. ISSN 1471-4159.
22. HUANG, H.; O'BRIEN, W. T.; KLEIN, PETER S. Targeting glycogen synthase kinase-3 in Alzheimer's disease. *Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies*. Amsterdam: Elsevier, 2006, **3** (4), 613-17. ISSN 1740-6773.
23. AVILA, J.; LEÓN-ESPINOSA, G.; GARCÍA, E.; GARCÍA-ESCUADERO, V.; HERNÁNDEZ, F.; DEFELIPE, J. Tau Phosphorylation by GSK3 in Different Conditions. *International Journal of Alzheimer's Disease*. Cairo: Hindawi Publishing Corporation, 2012, č. 2012, s. 1-7. ISSN 1875-8908.
24. WYSS-CORAY, T.; ROGERS, J. Inflammation in Alzheimer Disease—A Brief Review of the Basic Science and Clinical Literature. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012, **2** (1), 1-23. ISSN 2157-1422.
25. CHMÁTALOVÁ, Z.; SKOUMALOVÁ, A. Oxidační stres u Alzheimerovy choroby a jeho důsledky. *Klinická biochemie a metabolismus*. Praha: Česká lékařská společnost Jana Evangelisty Purkyně, 2014, **22** (43), 189-95. ISSN 1210-7921.
26. CIBIČKOVÁ, L.; PALIČKA, V. Alzheimerova choroba, cholesterol a apolipoprotein E -

- nové souvislosti. *Klinická biochemie a metabolismus*. Praha: Česká lékařská společnost Jana Evangelisty Purkyně, 2005, **13** (34), 127-30. ISSN 1210 - 7921.
27. SHEARDOVÁ, K.; HORT, J.; RUSINA, R.; BARTOŠ, A.; LÍNEK, V.; RESSNER, P.; REKTOROVÁ, I. Doporučené postupy pro terapii Alzheimerovy nemoci a ostatních demencí. *Neurologie pro praxi*. Olomouc: Solen, s.r.o. 2009, **10** (1), 28-31. ISSN 1803-5280.
28. LANE, R. M.; POTKIN, S. G.; ENZ, A. Targeting acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in dementia. *International Journal of Neuropsychopharmacology*. Oxford University Press, 2006, **9** (1), 101–24. ISSN 1461-1457.
29. GREIG, N. H.; UTSUKI, T.; INGRAM, D. K.; WANG, Y.; PEPEU, G.; SCALI, C. Selective butyrylcholinesterase inhibition elevates brain acetylcholine, augments learning and *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Washington: National Academy of Sciences of the United States of America, 22. listopadu 2005, **102** (47), 17213–18. ISSN 1091-6490.
30. CIBIČKOVÁ, Ľ.; PALIČKA, V. Galantamin v terapii Alzheimerovy demence. *Česká geriatrická revue*. Brno: Česká gerontologická a geriatrická společnost, 2005, **3** (2). ISRC 1801–8661.
31. BRUNOVSKÝ, M. Inhibitory cholinesteráz v léčbě alzheimerovy nemoci. *Neurologie pro praxi*. Olomouc: Solen, s.r.o. 2007, **2007** (2), 112-17. ISSN 1803-5280.
32. ZANGARA, A. The psychopharmacology of huperzine A: an alkaloid with cognitive enhancing and neuroprotective *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. Amsterdam: Elsevier, 2003, **75** (3), 675–86. ISSN 0091-3057.
33. SMITH, A. R. ITIS Standard Report Page: Huperzia serrata. *Integrated Taxonomic Information System (ITIS)* [online]. 2015, verze April 22, 2015 [cit. 2015-04-22]. Dostupné z: http://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=503086&print_version=PRT&source=to_print
34. YANG, G.; WANG, Y.; TIAN, J.; LIU, J. Huperzine A for Alzheimer's Disease: A

- Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Clinical In: *PLOS One* [online]. 23. 9. 2013, verze 23.9. 2013 [cit. 2015-04-22]. DOI 10.1371/journal.pone.0074916
35. ŠVESTKA, J. Memantin - necholinergní alternativa léčby Alzheimerovy a vaskulární demence. *Psychiatria pre prax.* SOLEN, s. r. o. 2004, **2004** (3), 154-59. ISSN 1335-9584.
 36. TAYEB, H. O.; YANG, H. D.; PRICE, B. H.; TARAZI, F. I. Pharmacotherapies for Alzheimer's disease: Beyond cholinesterase inhibitors. *Pharmacology & Therapeutics.* Amsterdam: Elsevier, 2012, **134** (1), 8-25. ISRC 1879-016X.
 37. ANAND, R.; GILL, KIRAN D.; MAHDI, A. A. Therapeutics of Alzheimer's disease: Past, present and future. *Neuropharmacology.* Amsterdam: Elsevier, 2014 roč. LXXVI, s. 27-50. ISSN 0028-3908.
 38. KURZ, A.; ROBERT, P. Novel insights for the treatment of Alzheimer's disease. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry.* Amsterdam: Elsevier, 2011, s. 373-79. ISSN 0278-5846.
 39. DROTT, J.; DESIRE, L.; DROUIN, D.; PANDO, M.; HAUN, F. Etazolate improves performance in a foraging and homing task in aged rats. *European Journal of Pharmacology.* Amsterdam: Elsevier, 2010 roč. DCXXXIV, s. 95-100. ISSN 0014-2999.
 40. MARTINEZ, A.; GIL, C.; PEREZ, D. I. Glycogen Synthase Kinase 3 Inhibitors in the Next Horizon for Alzheimer's Disease Treatment. *International Journal of Alzheimer's Disease.* Cairo: Hindawi Publishing Corporation, 2011, č. 2011, s. 1-7. ISSN 1875-8908.
 41. FÜLÖP, V.; BÖCSKEI, Z.; POLGÁR, L. Prolyl Oligopeptidase: An Unusual β -Propeller Domain Regulates Proteolysis. *Cell.* Amsterdam: Elsevier, 1998, **94** (2), 161-70. ISSN 0092-8674.
 42. MORAIN, P.; LESTAGE, P.; NANTEUIL, G. DE; JOCHEMSEN, R. S 17092: A Prolyl Endopeptidase Inhibitor. *CNS Drug Reviews.* Brandfort (Connecticut): Neva Press, 2002, **8** (1), 31-52. ISSN 1527-3458.

43. CAHLÍKOVÁ, L.; HULOVÁ, L.; HRABINOVÁ, M.; CHLEBEK, J.; HOŠŤÁLKOVÁ, A.; ADAMCOVÁ, M.; ŠAFRATOVÁ, M.; JUN, D.; OPLETAL, L.; LOČÁREK, M.; MACÁKOVÁ, K. Isoquinoline alkaloids as prolyl oligopeptidase inhibitors. *Fitoterapia*. Amsterdam: Elsevier, 2015 roč. CIII, s. 192-96. ISRC 0367-326X.
44. SEYUN, K. Cognitive rehabilitation for elderly people with early-stage Alzheimer's disease. *Journal of physical therapy science*. Japan: Society of Physical Therapy Science, 2015, **27** (2), 543-46. ISSN 2187-5626.
45. RESSNER, P. Alzheimerova choroba - diagnostika a léčba. *Neurologie pro praxi*. Solen, s.r.o. 2004, **2004** (1), 11-16. ISSN 1803-5280.
46. SHARMA, O. P. *Plant Taxonomy*. 2nd. New Delhi: Tata McGraw Publishing Company Limited. 978-0-07-01459-9.
47. SCHWARZBACH, A. E.; KADEREIT, J. W. Phylogeny of prickly poppies, Argemone (Papaveraceae), and the evolution of morphological and *Plant Systematics and Evolution*. Vienna: Springer, 1999, **218** (3-4), 257-27. ISSN 0378-2697.
48. LINDLEY, J. Argemone grandiflora. *Edward's Botanical Register*. London: James Ridgway, 1829 roč. XV.
49. Argemone grandiflora. In: *Hortipedia* [online]. 29. 7. 2010, 19:37, verze 13.8.2013 [cit. 2015-04-29]. Dostupné z: http://en.hortipedia.com/wiki/Argemone_grandiflora
50. JOSHI, N.; BHATT, S.; DHYANI, S.; NAIN, J. Phytochemical screening of secondary metabolites of Argemone mexicana Linn. flowers. *International Journal of Current Pharmaceutical Research*. Madhya Pradesh: Sanjeevani Medical Stores, 2013, **5** (2), 144-47. ISSN 0975-7066.
51. BENN, M. H.; MITCHELL, R.E. The alkaloids of Argemone grandiflora. *Phytochemistry*. Amsterdam: Elsevier, 1972, **11** (1), 461-64. ISSN 0031-9422.
52. CAHLÍKOVÁ, L.; KUČERA, R.; HOŠŤÁLKOVÁ, A.; KLIMEŠ, J.; OPLETAL, L. Identification of pavinane alkaloids in the genera Argemone and Eschscholzia by GC-MS. *Natural Product Communications*. Westerville (Ohio, USA): Natural Product

- Communications, 2012, **7** (10), 1279 - 1281. ISSN 1555-9475.
53. GAFNER, S.; DIETZ, B. M.; MCPHAIL, K. L.; SCOTT, I. M.; GLINSKI, J. A.; RUSSELL, F. E. Alkaloids from *Eschscholzia californica* and Their Capacity to Inhibit Binding of *Journal of Natural Products*. Washington: American Chemical Society, 2006, **69** (3), 432–35. ISSN 1520-6025.
54. LEYVA-PERALTA, M. A.; ROBLES-ZEPEDA, R. E.; GARIBAY-ESCOBAR, A.; RUIZ-BUSTOS, E.; ALVAREZ-BERBER, L. P.; GÁLVEZ-RUIZ, J. C. In vitro anti-proliferative activity of *Argemone gracilentia* and identification of some active *Complementary and Alternative Medicine*. Miami: International Research Congress on Integrative Medicine and Health, 2015, **15** (13), 1-7. ISSN 1472-6882.
55. ZHOU, M.; LI, X.; GENG, L.; QU, C.; PENG, S. Effect of rotundine on gastric acid and pepsin activity in rats. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*. Beijing: Zhongguo yao xue hui, 1998, **23** (5), 301-03. ISSN 1001-5302.
56. Pharmacological effects of rotundine and research progress of its clinical application. *Xibeiyaoxue Zazhi*. Xian: Gai Kan Bianjibu, 2012, **27** (1), 91-94. ISSN 1004-2407.
57. CORDELL, G. A. *The Alkaloids: Chemistry and Biology*. Amsterdam: Elsevier, 2005, 266 s.. ISBN 0-12-469526-0.
58. VACEK, J.; WALTEROVÁ, D.; VRUBLOVÁ, E.; ŠIMÁNEK, V. The Chemical and Biological Properties of Protopine and Allocryptopine. *Heterocycles*. Tokyo: The Japan Institute of Heterocyclic Chemistry, 2010, **81** (8), 1773-89. ISSN 1881-0942.
59. CSID:89017. *ChemSpider* [online]. 2015 [cit. 2015-04-27]. Dostupné z: <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.89017.html>
60. CHULIÁ, S.; IVORRA, M. D.; LUGNIER, C.; VILA, E.; NOGUERA, M. A.; D'OCÓN, P. Mechanism of the cardiovascular activity of laudanosine: comparison with papaverine and other *British Journal of Pharmacology*. London: Nature Publishing Group, 1994 roč. CXIII, s. 1377-85. ISSN 1476-5381.
61. KANOKMEDHAKUL, S.; KANOKMEDHAKUL, K.; LEKPHROM, R. Bioactive

- constituents of the roots of *Polyalthia cerasoides*. *Journal of Natural Products*. Washington: American Chemical Society, 2007, **70** (9), 1536–38. ISSN 0163-3864.
62. MORAIS, L. C. S. L.; BARBOSA-FILHO, J. M.; ALMEIDA, R. N. Central depressant effects of reticuline extracted from *Ocotea duckei* in rats and mice. *Journal of Ethnopharmacology*. Amsterdam: Elsevier, 1998, **62** (1), 57-61. ISSN 0378-8741.
63. SCHIFF, P. L. The Thalictrum Alkaloids: Chemistry and Pharmacology (1985-1995), kap. 1. In: PELLETIER, S. W. *Alkaloids: Chemical and Biological Perspectives, Volume 11: Chemical and Biological Perspectives*. Amsterdam: Elsevier, 1996, s. 1-236. ISBN 0-08-0427979.
64. LEE, S. S.; KAI, M.; LEE, M. K. Inhibitory effects of sanguinarine on monoamine oxidase activity in mouse brain. *Phytotherapy Research*. Hoboken: John Wiley & Sons, 2001, **15** (2), 167-69. ISSN 1099-1573.
65. YANG, X.; MIAO, F.; YAO, Y.; CAO, F.; YANG, R.; MA, Y.; QIN, B.; ZHOU, L. In Vitro Antifungal Activity of Sanguinarine and Chelerythrine Derivatives against Phytopathogenic *Molecules*. Basel: MDPI AG, 2012, **17** (11), 13026-35. ISSN 1420-3049.
66. HAMOUD, R.; REICHLING, J.; WINK, M. Synergistic antibacterial activity of the combination of the alkaloid sanguinarine with EDTA and *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. Hoboken: John Wiley & Sons, 2015, **67** (2). ISSN 2042-7158.
67. VRBA, J.; DOLEŽEL, P.; VIČAR, J.; ULRICHOVÁ, J. Cytotoxic activity of sanguinarine and dihydrosanguinarine in human promyelocytic leukemia HL-60 *Toxicology in Vitro*. Amsterdam: Elsevier, 2009, **23** (4), 580-88. ISSN 0887-2333.
68. WAN, K. F.; CHAN, S.; SUKUMARAN, S. K.; LEE, M.; YU, V. C. Chelerythrine Induces Apoptosis through a Bax/Bak-independent Mitochondrial Mechanism. *The Journal of Biological Chemistry*. Rockville: American Society of Biochemistry and Molecular Biology, 2008, **283** (13), 8423-33. ISRC 1083-351X.
69. Chelerythrine chloride ab120600. In: *abcam* [online]. 1998-2015 [cit. 2015-04-28]. Dostupné z: <http://www.abcam.com/Chelerythrine-chloride-ab120600.pdf>

70. CORTIJO, J.; VILLAGRASA, V.; PONS, R.; BERTO, L.; MARTÍ-CABRERA, M.; MARTINEZ-LOSA, M.; DOMENECH, T.; BELETA, J.; MORCILLO, E. J. Bronchodilator and anti-inflammatory activities of glaucine: In vitro studies in human airway *British Journal of Pharmacology*. London: Nature Publishing Group, 1999, **127** (7), 1641–51. ISSN 1476-5381.
71. NECHPURENKO, I. V.; SALAKHUTDINOV, N. F.; TOLSTIKOV, G. A. Berberine: Chemistry and Biological Activity. *Chemistry for Sustainable Development*. Novosibirsk: Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, 2010 roč. XVIII, s. 1-23. ISSN 1023-8603.
72. HE, Z.; WANG, D.; LI, G.; WU, J. Alkaloids from *Corydalis saxicola* and their anti-oxidative activities. *Zhongcaoyao*. Tianjin: Shaoyang, 2014, **45** (11), 1526-31. ISSN 0253-2670.
73. WANGCHUK, P.; BREMNER, J. B.; SAMTEN; RATTANAJAK, R.; KAMCHONWONGPAISAN, S. Antiplasmodial agents from the Bhutanese medicinal plant *Corydalis calliantha*. *Phytotherapy Research*. Hoboken: John Wiley & Sons, 2010, **24** (4), 481-85. ISSN 1099-1573.
74. CHLEBEK, J.; MACÁKOVÁ, K.; CAHLÍKOVÁ, L.; KURFÜRST, M.; KUNEŠ, J.; OPLETAL, L. Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase Inhibitory Compounds from *Corydalis cava* *Natural Product Communications*. Westerville (Ohio, USA): Natural Product Communications, 2011, **6** (5), 607-10. ISRC 1934-578X.
75. ELLMAN, G. L.; COURTNEY, K. D.; ANDRES, V.; FEATHERSTONE, R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*. Oxford: Pergamon Press Ltd. 1961, č. 7, s. 88-95. ISSN 0006-2952.
76. SUCHÁNKOVÁ, P. *Biologická aktivita obsahových látek rostlin II.: Screening alkaloidních rostlin na inhibici ...*. Hradec Králové: 2012. Rigorózní práce. Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra farmaceutické botaniky a ekologie.
77. CURTIS, W.; SIMS, J. Argemone grandiflora. *Curtis's Botanical Magazine*. London: Couchman and Fry, 1831, č. 6, s. 156-58. ISSN 1355-4905.

78. BROSSI, A. *The Alkaloids*, vol. XXIX. Orlando (Florida): Academic Press, Inc. 1986.
ISBN 978-0-12-469549-8.
79. KROMBHOLZ, R. Nejčastější demence a jejich léčba. *Neurologie pro praxi*.
Olomouc: Solen, s.r.o. 2011, **12** (3). ISSN 1803-5280.

8. ABSTRAKT

Michal, Vojtěch: STUDIUM BIOLOGICKÉ AKTIVITY ALKALOIDŮ IZOLOVANÝCH Z *ARGEMONE GRANDIFLORA* (PAPAVERACEAE) II. Diplomová práce 2015. Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra farmaceutické botaniky a ekologie.

Vedoucí práce: PharmDr. Jakub Chlebek, PhD.

Klíčová slova: *Argemone grandiflora* Sweet, *Papaveraceae*, alkaloidy, izolace, acetylcholinesterasa, butyrylcholinesterasa, prolyloligopeptidasa, Alzheimerova choroba, *in vitro* assay.

Diethyletherový alkaloidní extrakt získaný z natě a kořenů *Argemone grandiflora* Sweet byl chromatograficky zpracován. Za použití běžných chromatografických metod byly získány tři alkaloidy v čisté podobě. Tyto látky byly určeny jako allokryptopin, (-)-munitagin a (-)-norargemonin pomocí strukturálních analytických metod (MS, NMR). U těchto získaných alkaloidů byla měřena jejich schopnost inhibice acetylcholinesterasy (AChE) a butylcholinestrasy (BuChE), získaných z lidských červených krvinek a plazmy, pomocí Ellmanovy metody. Naměřené hodnoty byly vyjádřeny jako IC₅₀ (allokryptopin: IC_{50 AChE} = 250,0 ± 2,52 μM, IC_{50 BuChE} = 530 ± 28,2 μM; (-)-munitagin: IC_{50 AChE} = 62,29 ± 5,81 μM, IC_{50 BuChE} = 837,4 ± 23,03 μM; (-)-norargemonin: IC_{50 AChE} = 205,17 ± 11,6 μM, IC_{50 BuChE} = 4158,20 ± 495,78 μM). Dále byla měřena inhibice prolyloligopeptidasy pro allokryptopin a (-)-munitagin. IC₅₀ byla > 1000 μM pro allokryptopin, (-)-munitagin je v čase publikování práce stále ve stadiu měření.

Žádný z izolovaných alkaloidů neprokázal lepší schopnost inhibice AChE and BuChE v porovnání se standardy galanthaminem, huperzinem A a fysostigminem. Podobné výsledky byly nalezeny v inhibici POP. Na základě těchto skutečností, žádný z těchto alkaloidů není z hlediska inhibic AChE a BuChE a POP perspektivní pro potenciální léčbu AD.

9. ABSTRACT

Michal, Vojtěch: STUDY OF BIOLOGICAL ACTIVITY OF ISOLATED ALKALOIDS FROM *ARGEMONE GRANDIFLORA* (PAPAVERACEAE) II. Diploma thesis 2015. Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Department of Pharmaceutical Botany and Ecology. Supervisor: PharmDr. Jakub Chlebek, PhD.

Key words: *Argemone grandiflora* Sweet, *Papaveraceae*, alkaloids, isolation, acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase, prolyloligopeptidase, Alzheimer's disease, *in vitro* assay.

Diethylether alkaloid extract obtained from stem and roots of *Argemone grandiflora* Sweet was chromatographically analyzed. Using common chromatographic methods, three alkaloids were isolated in clean form. These substances were identified as allocryptopine, (–)-munitagine and (–)-norargemonine by structural analysis (MS, NMR). These obtained alkaloids were tested for their inhibitory activity against human erythrocyte acetylcholinesterase (AChE) and human plasma butyrylcholinestrace (BuChE) by Ellman's method. The results were represented as IC₅₀ values (allocryptopine: IC₅₀ AChE = 250,0 ± 2,52 μM, IC₅₀ BuChE = 530 ± 28,2 μM; (–)-munitagine: IC₅₀ AChE = 62,29 ± 5,81 μM, IC₅₀ BuChE = 837,4 ± 23,03 μM; (–)-norargemonine: IC₅₀ AChE = 205,17 ± 11,6 μM, IC₅₀ BuChE = 4158,20 ± 495,78 μM).

Inhibition against prolyloligopeptidase was tested for allocryptopine and (–)-munitagenine. IC₅₀ was > 1000 μM for allocryptopine, (–)-munitagine is still measured in the time of publication of this thesis.

None of the isolated alkaloids showed better inhibition activity against AChE and BuChE in comparison with the standard galanthamine, huperzine A and physostigmine. Similar results were found in inhibition against POP. On the base of obtained results, the isolated alkaloids can't be perspective for treatment Alzheimer's disease as cholinesterase and POP inhibitors.