

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

DIPLOMOVÁ PRÁCE

**Neurotropní a antioxidační aktivita vybraných druhů jednoděložných
alkaloidních rostlin III**

**Neurotropic and antioxidative activity of some selected species
of monocotyledonous alkaloidal plants III**

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

Vedoucí diplomové práce: Ing. Lucie Cahlíková, Ph.D.

Hradec Králové, 2013

Eduard Kantor

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že tato 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, 2013

.....

podpis

Děkuji grantům SVV UK 265 002, FRVŠ 664/2011 a FRVŠ 190/2012 za finanční podporu, bez které by tato práce nemohla vzniknout.

Rád bych velmi poděkoval Ing. Lucii Cahlíkové, Ph.D. za vedení diplomové práce, za cenné rady a připomínky, Ing. Kateřině Macákové, Ph.D. za změřeni biologických aktivit a katedře farmaceutické botaniky a ekologie za příjemné pracovní prostředí.

OBSAH

1. ÚVOD	6
2. CÍL PRÁCE	9
3. TEORETICKÁ ČÁST	11
3.1 Demence.....	12
3.2 Alzheimerova choroba.....	12
3.2.1 Rizikové faktory.....	12
3.2.3 Klinický obraz.....	15
3.2.4 Léčba Alzheimerovy choroby.....	16
3.2.4.1 Inhibitory mozkových acetylcholinesteráz.....	17
3.2.4.2 Inhibitory NMDA receptorů glutamatergního systému.....	18
3.2.4.3 Léky ovlivňující pozitivně metabolismus CNS.....	19
3.2.4.4 Léky omezující volné radikály.....	20
3.2.4.5 Léky účinné cestou nervových růstových faktorů.....	20
3.2.4.6 Nové léčebné strategie u Alzheimerovy choroby.....	20
3.2.5 Nefarmakologická léčba.....	21
3.3.1 Rod <i>Fritillaria</i>	22
3.3.1.1 Taxonomické zařazení.....	22
3.3.1.2 Chemotaxonomické znaky.....	23
3.3.1.3 Klasifikace alkaloidů rodu <i>Fritillaria</i>	24
3.3.1.4 Biologická aktivita alkaloidů izolovaných z rodu <i>Fritillaria</i>	25
3.3.1.4.1 Antihypertenzní aktivita.....	25
3.3.1.4.2 Antitumorová aktivita.....	26
3.3.1.4.3 Antiastmatická a antitusická aktivita.....	27
3.3.1.4.4 Anticholinergní aktivita.....	27
3.3.1.5 <i>Fritillaria imperialis</i>	28
3.3.1.6 <i>Fritillaria ussuriensis</i> Maxim.....	30
3.3.1.8 Další druhy rodu <i>Fritillaria</i>	32
3.3.2 Rod <i>Eucomis</i>	33
3.3.2.1 Taxonomické zařazení.....	34
3.3.2.2 Biologická aktivita a obsahové látky.....	34
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	37
4.1 Všeobecné postupy.....	38
4.1.1 Destilace a odpařování.....	38
4.2 Materiál a vybavení.....	38
4.2.1 Rozpouštědla.....	38
4.2.2 Chemikálie.....	38
4.3 Příprava sumárních extraktů.....	38
4.3.1 Biologický materiál.....	38
4.3.2 Příprava ethanolového a alkaloidního extraktu.....	39
4.4 Stanovení inhibiční aktivity alkaloidů a alkaloidních extraktů vůči erythrocytární AChE a sérové BuChE.....	39
4.4.1 Chemikálie a materiál použité pro stanovení cholinesterázové inhibiční aktivity..	39
4.4.2 Přístroj použitý pro stanovení cholinesterázové inhibiční aktivity.....	39
4.4.3 Podmínky měření.....	40
4.4.4 Příprava erythrocytárních pouzder.....	40
4.4.5 Stanovení cholinesterázové inhibiční aktivity (hodnoty IC50).....	40
4.5 Stanovení antioxidační aktivity alkaloidních extraktů.....	41

4.5.1 Chemikálie a materiál použité pro stanovení antioxidační aktivity	41
4.5.2 Přístroje použité pro stanovení antioxidační aktivity	41
4.5.3 Stanovení antioxidační aktivity (EC50)	41
5. VÝSLEDKY	42
5.1 Výsledky inhibičních aktivit vůči AChE/BuChE ethanolových a alkaloidních extraktů rostlin.....	43
5.1.1 Inhibiční křivky ethanolových a alkaloidních extraktů.....	44
5.2 Antioxidační aktivita	46
5.2.1 Inhibiční křivka <i>Bessera Elegans</i> a <i>Brodiaea californica</i>	47
6. ZÁVĚR A DISKUZE	48
7. LITERATURA	51
8. SEZNAM ZKRATEK.....	62

1. ÚVOD

Současné terapeutické možnosti medicíny umožňují dožívat se stále vyššího a vyššího věku. To s sebou nese mimo jiné zvýšení nákladů na léčbu, kdy možnosti jsou v nadsázce téměř neomezené, nicméně finanční náročnost použití nových léků stojí leckdy proti jejich častějšímu využití. Stárnutím populace dochází k nárůstu onemocnění souvisejících s vyšším věkem. Jedná se především o neurodegenerativní onemocnění jako Alzheimerova choroba (AD) či Parkinsonova choroba. U těchto onemocnění dochází v posledních desetiletí k velkému nárůstu pacientů právě v důsledku vyššího věku populace a schopnostem efektivně léčit ostatní choroby týkající se kupříkladu soustavy srdeční, pohybové a dalších.

Přes všechny poznatky moderní terapie je třeba si uvědomit, že ve většině rozvojových zemí není „západní“ medicína a komplexní lékařská péče jako taková příliš dostupná.¹ Podle odhadů světové zdravotnické organizace (WHO) více než 80% světové populace využívá rostliny jako primární zdroj k léčení nemocí.² Přitom např. 60 - 90% obyvatel Afriky je částečně či úplně odkázáno na léčbu léčivými rostlinami a až 60% obyvatel Jihoafrické republiky se nechává léčit tradičními lidovými léčiteli, kterých je přes 200 000 a především ve venkovských oblastech jsou dostupnější než běžní lékaři.³⁻⁷ V souvislosti s dnešní medicínou můžeme zmínit, že lidové léčitelství se stalo velkou zásobárnou zdrojů léčivých látek a zejména ve 20. století, po zdokonalení izolačních, fyzikálně-chemických a syntetických metod, byly mnohé z jeho poznatků objasněny, vědecky zdůvodněny a využity. V současné době, kdy jsou k dispozici dokonalé chromatografické izolační techniky a skvělý servis fyzikálních metod pro určení struktury a čistoty izolovaných látek, není problém získat z rostlin látky ve velmi čistém stavu a podrobit je základním screeningovým metodám na biologickou aktivitu. Protože jsou rostliny obrovským zdrojem už hotových, přírodou připravených potenciálně léčivých látek, je žádoucí jich využít.⁸

Poprvé se o AD zmínil německý lékař Alois Alzheimer v roce 1907 jako o nejčastější formě demence charakterizované úmrtím buněk v mozkové kůře. V roce 2000 AD postihovala celosvětově 25 milionu lidí s tím, že se předpokládá, že v roce 2050 vzroste toto číslo na 114 milionů.⁹ Jedná se o velmi zatěžující chorobu, devastující kvalitu života jak samotných nositelů, tak i jejich blízkých rodinných příslušníků, kteří o ně pečují. V současnosti zatím nedovedeme AD léčit kauzálně, můžeme však příznivě ovlivnit její průběh a oddálit těžká stadia.¹⁰

V terapii AD mají velký význam přírodní látky, popřípadě jejich deriváty. Jednou z nich je galantamin – alkaloid izolovaný z rostliny *Galanthus spp.* z čeledi Amaryllidaceae v polovině 20. století.¹¹ Spolu s rivastigminem a donepezilem patří do skupiny inhibitorů acetylcholinesterázy (AChE) užívaných při lehkých a středně těžkých stadiích AD.¹²

Rivastigmin vznikl při syntéze sloučenin podobných fysostigminu, který je prototypem inhibitorů acetylcholinesterázy. Fysostigmin, látka izolovaná ze semen rostliny *Physostigma venenosum*, se používal při rituálních obřadech jako ordální jed v jihovýchodní Nigérii. Na základě farmakologických studií prokázal schopnost inhibovat periferně AChE. Roku 1935 následovalo přesné určení jeho struktury. Odtud už vedl jen krok k obměně jeho chemické struktury a nalezení sloučeniny schopné překonat hematoencefalickou bariéru.^{13,14,15}

Předmětem této práce byla příprava sumárních ethanolových a alkaloidních extraktů zástupců jednoděložných rostlin (především z čeledi Liliaceae) a stanovení jejich biologické aktivity (inhibice cholinesteráz, antioxidační aktivita) za účelem vytipování rostlin pro případné podrobné fytochemické studie.

2. CÍL PRÁCE

Cíle diplomové práce:

- 1) Příprava sumárních ethanolových a alkaloidních extraktů vybraných zástupců jednoděložných rostlin.
- 2) Příprava vzorků na biologické testování.
- 3) Stanovení inhibiční aktivity obou typů extraktů vůči lidské erytrocytární acetylcholinesteráze a sérové butyrylcholinesteráze.
- 4) Stanovení antioxidační aktivity pomocí DPPH testu u obou typů extraktů.

3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Demence

Demence je syndrom, který vzniká následkem onemocnění mozku, obvykle chronického nebo progresivního charakteru. Dochází k narušení vyšších korových funkcí, včetně paměti, myšlení, orientace, schopnosti řeči, učení a úsudku, kdy zároveň vědomí není zastřené. Zhoršení uvedených funkcí je doprovázeno (někdy dokonce předcházeno) zhoršením kontroly emocí, sociálního chování nebo motivace. Diagnózu demence lze tudíž stanovit na základě klinického obrazu – psychiatrického (neuropsychiatrického) a psychologického vyšetření. K jejímu určení nestačí pouze patologický nález zobrazovacích technik (CT, MR, PET, SPECT), neboť míra atrofie či funkčního postižení nemusí zákonitě korespondovat se stupněm demence. CT a MR může odhalit atrofické změny, v některých případech i v časných stádiích.¹⁶

3.2 Alzheimerova choroba

AD je chronicko-progresivní onemocnění nervové soustavy na podkladě degenerativního zániku neuronů s tvorbou charakteristických histopatologických změn. Je nejčastější příčinou demence ve středním a vyšším věku (odtud původní názvy presenilní demence, senilní demence, demence Alzheimerova typu). V souvislosti s celosvětovým trendem prodlužování lidského věku a vzrůstajícím počtem starých osob v populaci se Alzheimerova nemoc stává jedním z nejzávažnějších zdravotních a socioekonomických problémů současnosti.¹⁷

3.2.1 Rizikové faktory

Ověřenými rizikovými faktory pro vznik AD jsou věk a familiární agregace včetně genetických vlivů, k nimž se přiřazuje Downův syndrom. Diskutovanými rizikovými vlivy jsou ženské pohlaví, poranění hlavy, nižší vzdělání, hypertenze, kouření a hliník, nově se uvádí i vyšší hladina sérového homocysteinu.¹⁶

Riziko věku lze vyjádřit tak, že ve věku nad 65 let dochází každých 5 let ke zdvojnásobení případů demence. Rodinná anamnéza demence zvyšuje riziko vzniku třikrát až čtyřikrát, zejména ve věku nad 80 let.¹⁸

Mezi ochranné vlivy snižující výskyt choroby se řadí užívání nesteroidních antirevmatik, postmenopauzální estrogenová terapie i užívání statinů.¹⁹

3.2.2 Patofyziologie

AD jako progresivní primárně degenerativní onemocnění CNS se projevuje kortiko-subkortikální atrofií. Rozsah této atrofie nemusí korelovat s tíží demence. Makroskopicky nalézáme ztenčené mozkové kůry, rozšířené sulky, rozšířené jsou i komory mozkové. Atrofie bývá významná i v oblasti hipokampů, dále nalézáme rozšíření temporálních rohů postranních komor.¹⁶

Mikroskopicky nalézáme extracelulární a intracelulární změny.

Základní a nejdůležitější extracelulární patologickou změnou je ukládání beta-amyloidu. Takto uložená depozita beta-amyloidu tvoří shluky, kolem kterých vzniká komplex dalších neurodegenerativních procesů. Tímto způsobem vznikají útvary, které se nazývají Alzheimerovské plaky. Platí přímá úměra mezi počtem plaků s funkčním postižením, tedy tíží demence. Beta-amyloid je tvořen z fragmentů amyloidového prekurzorového proteinu (APP). Ve zdravém mozku je APP štěpen alfa-sekretázou na fragmenty, které jsou rozpustné (nazývají se beta-peptid). U mozku postiženého AD dochází k patologickému štěpení APP. Podílejí se na něm beta- a gama-sekretázy. APP je tak štěpena na jiném místě, než je tomu při štěpení alfa-sekretázou. Vznikají tak fragmenty, které nejsou rozpustné a které koagulují. Tak vzniká beta-amyloid, který je základem plaků. V okolí dochází následně k dalším degenerativním procesům – apoptóze neuronů.¹⁶

Nejzávažnější intracelulární (intraneurální) změnou je degenerace tau-proteinu. Jde o bílkovinu, která je spojena s neuronálními vlákny. Mikrotubuly tau-proteinu jsou patologicky fosforizovány, vlákna jsou zkracována, tím dochází ke ztrátě jejich funkce a tvorbě neuronálních klubek – tangles. To vede k zániku postižených neuronů, k jejich apoptóze. Těmito dvěma základními procesy se spouští kaskáda dalších degenerativních projevů. V oblasti plaků dochází k projevu sterilního zánětu. Dochází k aktivaci gliových elementů, buňky mikroglie se transformují do podoby mikrofégu. Uvolňují se cytokininy, zásadní význam má zřejmě uvolnění interleukinu 1. Dochází k aktivaci zánětlivého enzymu cytooxygenázy a k syntéze prostaglandinu. Zvýšeně se uvolňují excitační aminokyseliny (glutamát, aspartát). Ty se vážou na receptory, které otvírají iontové kanály, a to především cestou receptorů NMDA (N-methyl-D-aspartát). Tímto mechanismem dochází ke zvýšenému vstupu kalciových iontů do neuronů, čímž se aktivuje další řada enzymů, což vede k destabilizaci vnitřního prostředí neuronů. Důsledkem je aktivace apoptických mechanismů a smrt neuronů.¹⁶

Významným patogenetickým činitelem u AD je i zvýšené množství volných kyslíkových radikálů. Do určité míry mají tyto kyslíkové radikály své fyziologické funkce. Za patologických podmínek jsou však uvolňovány nadměrně a CNS není schopna toto množství odbourat. Volné kyslíkové radikály pak vyvolají řadu nežádoucích reakcí. Pod jejich vlivem dochází např. k peroxidaci lipidů neuronální membrány, ale také k inaktivaci řady enzymů. Neurony, u nichž došlo k peroxidaci, se stávají rovněž apoptickými.¹⁶

Během procesu degenerace dochází také ke snížení metabolismu v neuronech, což lze dokázat např. pozitronovou emisní tomografií (PET) nebo jednofotonovou emisní počítačovou tomografií (SPECT).¹⁶

Topograficky nejvíce postiženou oblastí je nucleus basalis Meynerta, toto postižení ovlivňuje přímo kortex. Velmi významně je poškozena také oblast hipokampů.¹⁶

Z neuromediátorových systémů je nejvíce postižen systém cholinergní. Je narušena jak syntéza acetylcholinu, tak jeho uvolňování, zároveň schopnost zpětného vstupu cholinu do neuronu. U Alzheimerovy demence nalézáme navíc deficit enzymu cholinacetyltransferázy. Jde o enzym, který syntetizuje acetylcholin z acetylkoenzymu A a z cholinu. Pokud jde o cílové orgány působení acetylcholinu – postsynaptické i presynaptické, acetylcholinergní, muskarinové a nikotinové receptoty – ty zůstávají relativně dlouho zachovány. K jejich degeneraci dochází až v pokročilejších stádiích nemoci.¹⁶

Acetylcholin je v synoptické štěrbině odbouráván za fyziologických podmínek acetylcholinesterázou. U AD, zvláště v pokročilejších stádiích, se kromě acetylcholinesterázy uplatňuje i butyrylcholinesteráza.¹⁶

Role butyrylcholinesterázy je nejasná. Zatím nebyl nalezen žádný endogenní substrát, který by byl určený pro tento enzym. Nicméně se domníváme, že BuChE hraje jen velmi malou roli v cholinergním přenosu. Je známo, že hydrolyzuje toxické estery jako například kokain, tudíž je mu přisuzována detoxifikační funkce.²⁰

V průběhu zhoršování demence dochází k postižení dalších neuromediátorových systémů, jak vidíme v tabulce.¹⁶

Tabulka I Základní patologické mediátorové změny u AD¹⁶

- | |
|---|
| <ul style="list-style-type: none">• snížení aktivity acetylcholintransferáz• centrální úbytek aktivity<ul style="list-style-type: none">- acetylcholinu- serotoninu |
|---|

- noradrenalinu / dopaminu
- GABA
- somatostatinu
- vazopresinu
- nervového růstového faktoru
- substance P
- zvýšení množství a aktivity
 - excitačních aminokyselin (glutamát, aspartát)
 - MAO-B

3.2.3 Klinický obraz

Alzheimerova choroba je nemoc především vyššího věku. S prodlužujícím se věkem populace narůstá počet alzheimerovských pacientů. Hovoří se proto o jakési tiché epidemii.¹⁸

Manifestnímu rozvoji demence předchází v časných stádiích onemocnění bezpříznakové období, kdy aktivací latentní mozkové rezervy jsou ještě zajištěny normální kognitivní funkce. S postupem chorobného procesu však dochází k vyčerpání rezerv a objevují se první kognitivní poruchy a snížení funkční výkonnosti, které si již uvědomuje sám nemocný nebo jeho okolí. Toto počáteční stadium je pak následováno postupujícími projevy globálního kognitivního úbytku. Konečné stadium Alzheimerovy nemoci se vyznačuje úplnou ztrátou soběstačnosti a postupně i rozpadem základních sociálních vazeb a osobnostních rysů nemocného. Jednotlivá stadia onemocnění lze tedy charakterizovat postupnou ztrátou paměti a soběstačnosti nemocného.¹⁷

1) Demence mírného stupně v počátečním stadiu Alzheimerovy nemoci (obvykle 1-4 roky od začátku onemocnění) se projevuje především poruchou schopnosti učení novým informacím s relativně zachovaným vybavováním starších údajů. Nemocný má obtíže s pozorováním, vštěpováním a vybavováním recentních událostí a běžných informací, hledá nedávno odložené předměty, zapomíná vykonávat běžné rutinní úkony. Může se objevit selektivní obtíž s vybavováním jmen osob a užíváním méně obvyklých slov. Pokles paměti a další poruchy jsou na překážku denním činnostem, ale neomezují ještě soběstačnost nemocného.¹⁷

2) Střední stadium onemocnění (2-10 let od začátku Alzheimerovy nemoci) se vyznačuje závažnou poruchou paměti, která uchovává pouze hluboce vštípenou nebo dobře známou látku. Nové informace lze vštípit jen výjimečně a na velmi krátkou dobu. Pacient si nevybavuje ani svou domácí adresu, ani základní informace o místě, kde se nachází, co nedávno dělal. Je dezorientovaný, ztrácí se i ve známém prostředí. Nevybavuje si jména známých osob. Soběstačnost nemocného je časem závažně narušena.¹⁷

3) V pozdním, těžkém stadiu onemocnění (7 až 14 let od začátku onemocnění) je téměř úplná ztráta paměti s neschopností vštípení nové informace, vybavují se pouze nesourodé útržky dříve získaných informací. Nemocný nepoznává ani blízké osoby, je zcela nesoběstačný, vegetativní funkce probíhají spontánně.¹⁷

4) Poruchy dalších kognitivních funkcí kromě paměti jsou značně interindividuálně rozdílné co do výskytu i rychlosti progresu. Postižení řečových funkcí (poruchy plynulosti řeči, pojmenování, porozumění) a poruchy zrakoprostorové orientace mohou být u některých nemocných dokonce počátečními příznaky onemocnění. Zvláště závažným způsobem snižuje soběstačnost nemocného postižení výkonných (exekutivních) funkcí zajišťujících cílenou činnost, řešení problémů a přizpůsobení se zevním požadavkům. Nemocný ztrácí schopnost pracovat, později není schopen samostatně cestovat, nakupovat, nakládat s penězi. Od počátku onemocnění dochází ke změnám osobnosti, objevují se emoční poruchy a změny chování (deprese, agitovanost, úzkost, agresivita). Psychotické projevy (halucinace a bludy, často paranoidní) mohou komplikovat pozdější průběh.¹⁷

U některých nemocných se mohou objevit i příznaky mimo psychickou sféru, například extrapyramidová rigidita, poruchy chůze, myoklonus nebo epileptické záchvaty zvláště v pozdních stádiích onemocnění. Jsou-li vyloučeny jiné choroby, je nutno tyto projevy přičíst variabilitě mozkového postižení u Alzheimerovy nemoci.¹⁷

AD trvá průměrně od objevení se prvních příznaků do exitu 7-10 let. Někdy postižení přežívají i déle než 15 let, jindy umírají časně – i do tří let po objevení se prvních příznaků (především u geneticky podmíněných forem s časným začátkem).¹⁸

Alzheimerovští pacienti umírají v důsledku neurodegenerace jako základní příčiny smrti na bronchopneumonie, úrazy a další bezprostřední příčiny, v důsledku kterých by stejně starý člověk bez této choroby nezemřel. Hypoteticky dochází k selhání neurohumorálního řízení homeostázy, k selhání adaptace organismu a imunitní odpovědi. Pacienti někdy umírají na úrazy, které by neutrpěl stejně starý člověk bez přítomnosti Alzheimerovy choroby.¹⁸

3.2.4 Léčba Alzheimerovy choroby

Léčba Alzheimerovy choroby i dalších demencí neurodegenerativního původu vychází ze znalosti jednotlivých patogenetických článků, nikoli ze znalostí základní příčiny. Současná terapie nám tedy umožňuje chorobu modulovat, především prodlužovat lehká stadia demence, která jsou spojena s nesoběstačností a silnou zátěží jak pacientů, tak jejich pečovateli.

U Alzheimerovy choroby jsou 2 farmakoterapeutické postupy, které jsou založeny na důkazech (evidence – based) – t.j. výsledcích více rozsáhlých, multicentrických, multietnických, randomizovaných, dvojité slepých studií. Jsou to inhibitory cholinesteráz a inhibitory NMDA receptorů.^{10, 19}

3.2.4.1 Inhibitory mozkových acetylcholinesteráz

Inhibitory cholinesteráz jsou donepezil (Aricept), galantamin (Reminyl) a rivastigmin (Exelon). Na českém trhu byl první donepezil, následoval rivastigmin a poté galantamin. Takrin k nám nebyl nikdy oficiálně dovážen.²⁰ Tato léčiva příznivě ovlivňují centrální acetylcholinergní přenos, náleží do skupiny tzv. kognitiv. Stala se základní pro léčbu lehkých až středních stadií AD, i když některé studie prokázaly pozitivní efekt i u těžkých stadií. Zablokováním enzymů odbourávajících acetylcholin – esteráz se zvyšuje počet molekul acetylcholinu, schopných vazby na své nikotinové i muskarinové receptory. Za normálních podmínek jsou v mozku přítomny především acetylcholinesterázy, a to ve dvou formách, označovaných jako G1 a G4. Forma G4 je majoritní, i když jsou rozdíly v jednotlivých korových oblastech; u Alzheimerovy choroby však výrazně stoupá G1. Navíc u Alzheimerovy nemoci se podílejí na odbourávání acetylcholinu enzymy butyrylcholinesterázy, které vznikají především v mobilizovaných gliových elementech v oblasti plak. Od inhibitorů cholinesteráz se tedy očekává, že budou dobře procházet hematoencefalickou bariérou, budou ovlivňovat periferní formy cholinesteráz, aby nepůsobily nežádoucí vedlejší efekty. Některé z inhibitorů inhibují i mozkové butyrylcholinesterázy. Způsob inhibice je reverzibilní (inhibice trvá tak dlouho, jak dlouho je přítomna látka nebo její aktivní metabolit v plazmě) nebo pseudoireverzibilní (inhibice trvá déle, než je přítomnost účinné látky v plazmě, farmakon je odbouráváno přímo molekulami cholinesteráz).^{10, 19}

Takrin byl prvním inhibitorem cholinesteráz, který byl klinicky užit při léčbě Alzheimerovy nemoci. Byl používán v první polovině 90. let minulého století. Takrin byl výraznějším inhibitorem BuChE než AChE. Na jeho historii si můžeme ukázat, za jak závažnou poruchu je Alzheimerova nemoc považována. Až v 1/3 případů způsoboval takrin závažné hepatopatie, a přesto byl široce používán i v tak na bezpečnost přísných zemích, jako

např. USA či Japonsko. To ukazuje mj. nepřímo na význam problému demence a do jisté míry i na některé z priorit, které musí medicína řešit. I hladina ostatních vedlejších účinků byla vyšší, než je tomu u dnešních inhibitorů.²¹

Donepezil je reverzibilní a selektivní inhibitor acetylcholinesterázy. Je prvním a nejvíce prostudovaným zástupcem druhé generace inhibitorů acetylcholinesterázy. Má dobrou biologickou dostupnost a metabolizuje se na cytochromu P450 2D6 a 3A4, což je spojeno s rizikem lékových interakcí. Donepezil má dlouhý poločas, více než 70 hod., což umožňuje podávání jednou denně. Doporučená dávka je 10 mg denně a nejnižší efektivní dávka je 5 mg denně.^{10,19}

Rivastigmin pseudoireverzibilně inhibuje acetylcholinesterázu a butyrylcholinesterázu, ale klinický význam tohoto duálního účinku zůstává nejasný. Látka má nižší interakční potenciál, protože je metabolizována esterázami a vylučována močí. Kvůli krátkému poločasu musí být podáván dvakrát denně, nicméně od roku 2007 je dostupný ve formě denní náplasti.^{10,19}

Galantamin je terciární alkaloid izolovaný původně z cibulí sněženky *Galanthus woronowi* a později z dalších rostlin čeledi Amaryllidaceae.²² Již od 60. let 20. století se tato látka používala převážně ve východní Evropě pro svůj antikurarový efekt k antagonizování neuromuskulární blokády vyvolané pachykurarovými látkami a pro terapii neurologických poruch, např. paralytické myelitidy nebo myastenien gravis.²³

Galantamin je poměrně čistý inhibitor acetylcholinesteráz a kromě toho i alosterický modulátor nikotinových receptorů. Má kratší poločas, podává se 1x denně v retardované formě nebo 2x denně v neretardované formě.¹⁰

Zatímco v západním světě jsou součástí lékopisu a klinické praxe rivastigmin a galantamin, součástí tradiční čínské medicíny se stal jiný v přírodě se vyskytující inhibitor cholinesteráz – huperzin A. Huperzin A je jeden z alkaloidů izolovaných z rostliny *Huperzia serrata* (Lycopodiaceae). Používá se v různých formách podání při problémech spojených s poruchami paměti, ke zvýšení krevní cirkulace a při horečce a zánětu.²⁴ Reverzibilně inhibuje AChE *in vitro* a *in vivo*.^{25,26}

3.2.4.2 Inhibitory NMDA receptorů glutamatergního systému

Z této oblasti léčiv je zatím používán jediný přípravek – memantin (Ebixa). Zkušenosti s memantinem jsou podstatně kratší, než je tomu u IChE. V Evropské unii je totiž k dispozici v této indikaci od roku 2002, v České republice od roku 2003. Tento přípravek je parciální

inhibitor NMDA receptorů. Tyto receptory jsou spojeny s otevřením iontových kanálů pro Ca^{2+} a Na^+ ionty. U AD dochází k exototoxicitě – k nadměrnému uvolňování excitačních aminokyselin (glutamát, aspartát), které pak vedou k hyperexcitaci svých receptorů včetně NMDA typu. Tato aktivita je navíc zvýšena tím, že v některých oblastech mozku (hipokampus) dochází k snížení zpětného vychytávání glutamátu. Tím dochází k nadměrnému vstupu kalciových iontů do neuronů, k aktivaci některých enzymů, měnících strukturu proteinů (proteinkináz), ke zvýšené expresi některých genů, v důsledku čehož nastává zvýšená apoptóza neuronů (aktivace programované buněčné smrti neuronu). Excitotoxicitou je také rušen jeden ze základních mechanismů učení – dlouhodobé potenciace (long-term potentiation), který probíhá na receptorech NMDA typu. Memantin výrazně snižuje excitotoxické působení na neurony.^{10, 19, 21}

Memantin (Ebixa) je podáván perorálně v dávce 2x denně 10 mg. Je to látka obecně dobře snášená, s minimem nežádoucích efektů. Pokud se vyskytnou, projevují se nejčastěji jako nežádoucí excitace nebo přechodný výskyt halucinací či jiných psychotických symptomů.¹⁰

3.2.4.3 Léky ovlivňující pozitivně metabolismus CNS

Léčba těmito léky není vždy založena na rigorózních důkazech, je často spíše empirická. Do této skupiny náleží především tzv. nootropní farmaka.

Extractum Ginkgo biloba (Tanakan, Tebokan, z dalších přípravků Gingium a další) obsahuje směs množství farmakologicky aktivních látek. Jsou to látky zlepšující neuronální metabolismus, scavengery volných kyslíkových radikálů, látky inhibující faktor aktivující krevní destičky, látky s velmi slabým inhibičním účinkem na NMDA receptory. Kontrolované klinické studie ukázaly do jisté míry pozitivní působení demencí, ale efekt je rozhodně slabší, než je tomu při použití IChE či memantinu. Rizikem extraktu ginkga díky účinku na trombocyty je i vznik krvácení CNS či CMP. Přesto je *Extractum Ginkgo biloba* někdy používáno v léčbě demencí různých typů, ale spíše v kombinaci s inhibitory cholinesterázy a s memantinem než v monoterapii. Piracetam (Nootropil, Geratam, Piracetam AL a další) zlepšuje neuronální oxidativní metabolismus a plasticitu erytrocytů. Kontrolované klinické studie u demencí však nevyzněly jednoznačně pozitivně. Je zkoušen u mírných kognitivních poruch, postintoxikačních i postkomočních stavů a u stavů s akutní hypoxií. Pyritinol (Encephabol, Enerbol) má kromě pozitivního efektu na neuronální oxidativní metabolismus ještě slabší protizánětlivý efekt a scavenger-efekt na vychytávání volných kyslíkových

radikálů. Nicergolin (Ergotop, Sermion) je derivát námelových alkaloidů. Podílí se na zlepšení mozkové krevní perfuze a na zlepšení neuronálního metabolismu. Vazodilatancia typu pentoxifyllinu (Agapurin) nebo naftidrofurylu (Enelbin) zlepšují reologické (průtokové) vlastnosti krve, jsou proto indikovány u vaskulárních demencí a jiných stavů spojených s cerebrovaskulárním onemocněním.^{16,20}

3.2.4.4 Léky omezující volné radikály

Volné kyslíkové radikály jsou u demencí nebo lehkých poruch kognitivních funkcí vytvářeny a uvolňovány v nadbytku, a podílejí se na neurodegenerativních procesech. Proto má smysl pokusit se jejich tvorbu omezit a vytvořené likvidovat. Tato skupina léků se nazývá scavengery volných kyslíkových radikálů. Opět jde o možnou podpůrnou terapii, nikoli krok základní. Patří sem například vitamin E, a to ve velkých dávkách 2000 IU denně. Podobný efekt poskytuje teoreticky i vitamin C, melatonin, retinol, beta-karoten, selen, také *Extractum Ginkgo biloba*. Rovněž inhibitory monoaminoxidázy typu B snižují tvorbu volných kyslíkových radikálů. Jde o selegilin (Junec a další). Jeho užití v této indikaci je empirické, nikoli založené na studiích.^{16,20}

3.2.4.5 Léky účinné cestou nervových růstových faktorů

U kognitivních poruch je prokazován nedostatek nervových růstových faktorů, snížená citlivost a hustota receptorů, na které tyto faktory působí. Jsou používány různé látky. Patří sem cerebrolizin, který je směsí aminokyselin, jež slouží jako prekurzory tvorby nervových růstových faktorů, dále již zmíněný selegilin, který má *in vitro* vlastnosti nervového růstového faktoru, tento efekt však nebyl s jistotou prokázán.^{16,20}

Estrogeny způsobují rovněž uvolnění nervových růstových hormonů a také zlepšují krevní průtok CNS. Terapeutický efekt při léčbě demence u postklimakterických žen prokázán nebyl. Zdá se, že mohou mít vliv při prevenci rozvoje demence u této skupiny pacientek.^{16,20}

3.2.4.6 Nové léčebné strategie u Alzheimerovy choroby

Vzhledem k pouze symptomatickému efektu současných kognitiv se hledají nová léčiva, která by zasáhla do patogenetického mechanismu AD a měla chorobu-modifikující

efekt. Úsilí je směřováno k β -amyloidu, který je u AD hlavním spouštěčem neurodegenerativních změn. Antiamyloidní farmakoterapie u AD v současnosti zahrnuje zabránění tvorby β -amyloidu ovlivněním enzymů, které jej odštěpují z amyloidového prekurzorového proteinu. Jde o inhibitory β -sekretáz a inhibitory či modulátory γ -sekretáz. Slibných výsledků bylo dosaženo s nesteroidním antiflogistikem tarenflurbilem, *R*-enantiomerem flurbiprofenu modulujícím γ -sekretázu. Jeho podávání vede ke snížení produkce toxického β -amyloidu a vedlo v klinických studiích ke zlepšení kognitivního výkonu léčených pacientů. Z dalších mechanismů se uplatňují látky zabraňující agregaci nebo látky zvyšující rozpustnost β -amyloidu (např. glykosamintramiprosát) a v poslední době i antiamyloidní imunoterapie s využitím monoklonálních protilátek.^{16,20}

3.2.5 Nefarmakologická léčba

Terapie Alzheimerovy choroby má být komplexní. Stejně tak jako má význam farmakoterapie, je nezbytná psychosocioterapie. Základní je správný psychologický přístup k pacientovi trpícímu demencí. Tento přístup vyžaduje od zdravotnického personálu velkou trpělivost. Výsledky bývají často zklamáním, nelze očekávat výrazné úspěchy za krátký čas. Psychoterapie má být spíše zaměřena na problém než na snahu o restrukturalizaci osobnosti. Čím je demence těžší, a úměrně tomu i výraznější degradace pacientovi osobnosti, tím méně je možné použít strukturovanější, sofistikovanější psychoterapii. Psychoterapie má být spíše zaměřena na uchování běžných denních aktivit a návyků. Je třeba udržovat a rozvíjet ty funkce, které ještě pacientovi zůstaly, které jsou intaktní nebo jen relativně málo postižené.¹⁸

Na gerontopsychiatrických odděleních či v ústavech sociální péče, kde jsou pacienti s AD, bývají organizovány terapeutické skupiny pacientů. Zde je třeba, aby byli zařazováni pacienti bez výraznějších sensorických defektů či poruch fatických funkcí, aby byli schopni komunikace. Není možné zařazovat lidi trpící těžším stupněm demence, inkontinencí či výraznějšími poruchami chování bránícími udržet delší dobu pozornost. Obsahem skupinové terapie bývá většinou nácvik paměti a orientace či nácvik základních úkonů denní rutiny. Procvičují se různé dovednosti, které postižení v důsledku demence zapomínají.

Velmi důležitá je terapie pomocí kontroly realitou. Postižení mají mít dobře čitelné kalendáře, označení místností (např. WC), v nemocničních odděleních a v ústavech sociální péče mají mít označeny postele.¹⁸

3.3 Obecná charakteristika čeledi Liliaceae

Jedná se o vytrvalé byliny s cibulemi nebo stonkovými hlízkami. Listy jsou střídavé nebo v přeslenech, přisedlé, někdy řapíkaté, čárkovité až vejčité, s žilnatinou většinou souběžnou. Květy jsou různé velikosti, někdy tvoří květenství nebo jsou jednotlivé. Plodem jsou tobolky nebo bobule. Charakteristickými metabolity jsou steroidní saponiny a steroidní alkaloidy. Rostliny jsou blízké ocúnovitým.²⁷

3.3.1 Rod *Fritillaria*

Fritillaria je jeden z nejrozsáhlejších rodů z čeledi Liliaceae. Dosud bylo popsáno okolo 130ti druhů na celém světě.²⁸ Mnoho druhů *Fritillaria* je v tradiční čínské medicíně již 2000 let používáno jako antitusika a expektorantia pod názvem „Beimu“. Oficiálně je „Beimu“ získávan z cibulí 9ti druhů *Fritillaria* obsažených v Čínském Lékopise (2000). Mezi tyto druhy patří *F. thungergii* Miq., *F. cirhossa* D.Don., *F. unibracteata* Hsiao et Hsia, *F. przewalskii* Maxim ex Batal, *F. delavayi* Franch, *F. ussuriensis* Maxim., *F. walujewii*, *F. pallidiflora* Schrenk a *F. hupehensis* Hsiao et K.C. Cibule některých ostatních druhů rodu *Fritillaria* jsou v čínském vnitrozemí užívány v čínském lidovém léčení.²⁹ Doposud bylo izolováno 140 sloučenin z asi 35 druhů *Fritillaria*. Mezi prozatím nalezenými sloučeninami převládají isosteroidní alkaloidy (72,7%), dále ostatní steroidní alkaloidy (11,5%) a nealkaloidní látky (15,8%). Farmakologické studie na různých „Beimu“ extraktech a čistých sloučeninách izolovaných z druhů *Fritillaria* demonstrovaly, že většina isosteroidních alkaloidů jsou primárně aktivní látky zodpovědné za antitusickou aktivitu.³⁰

3.3.1.1 Taxonomické zařazení

Říše: *Plantae*

Podříše: *Magnoliophyta*

Oddělení: *Magnoliopsida*

Třída: *Liliopsida*

Řád: *Liliales*

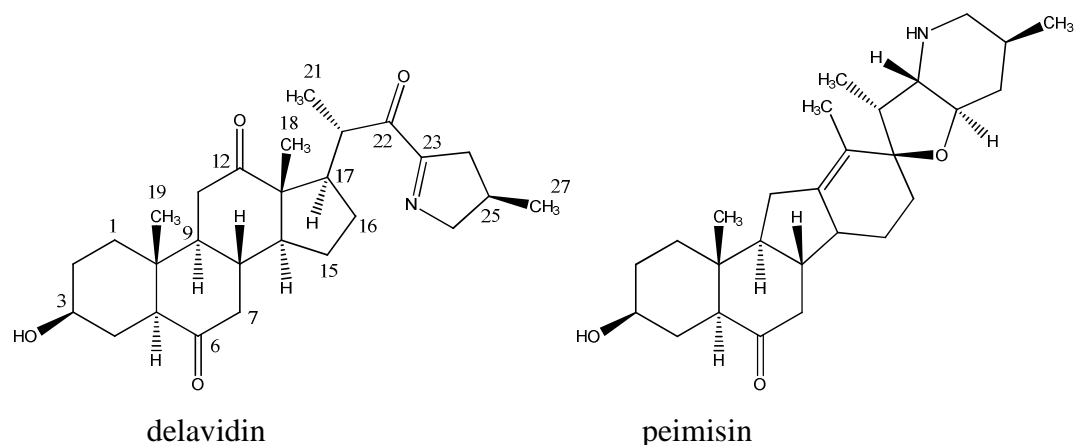
Čeleď: *Liliaceae*

Rod: *Fritillaria*

3.3.1.2 Chemotaxonomické znaky

Rod *Fritillaria* patří do čeledi Liliaceae, která je důležitá hlavně obsahem steroidních alkaloidů. Steroidní alkaloidy z čeledi Liliaceae se vyznačují 27 uhlíkovým cholestanovým skeletem s pěti či šesti karbocyklickými nebo heterocyklickými kruhy. Podle základního skeletu je můžeme rozdělit na isosteroidní a steroidní alkaloidy.³¹ Předchozí fytochemický výzkum na 34 druzích rodu *Fritillaria* ukázal, že isosteroidní alkaloidy jsou hlavní složky v rodu *Fritillaria*. Zároveň také isosteroidní alkaloidy odvozené od 5- α cevaninu jako například peimin, peiminin a imperialin jsou považovány za charakteristickou chemickou složku rodu *Fritillaria*.³²

Cao a kolektiv se zaměřili na izolaci nových steroidních alkaloidů a zkoumání šesti již známých isosteroidních alkaloidů z cibulí *Fritillaria delavayi*. Jedním z nich je i delavidin (Obr. 1), nový verazinový typ steroidního alkaloidu s pyrrolidinovým řetězcem a neobvyklou 12-oxo substitucí a sloučeniny peimin, peimisin (Obr. 1) a peiminin byly získány z *Fritillaria delavayi* poprvé. Všechny sloučeniny jsou v souladu se sloučeninami běžně získávanými z *Fritillaria*, což naznačuje, že tyto sloučeniny mají chemotaxonomický význam na úrovni rodu.³¹ Na druhou stranu steroidní alkaloidy s pyrrolidinovým postranním řetězcem se jen zřídka vyskytují v rodu *Fritillaria*. Je velice důležité zmínit, že delavidin je dosud první příklad steroidního alkaloidu verazinového typu s pyrrolidinovým postranním řetězcem a neobvyklou 12-oxo substitucí izolovaného z druhů *Fritillaria*, což může sloužit jako specifický marker k rozlišení *F. delavayi* od ostatních druhů *Fritillaria*.³³



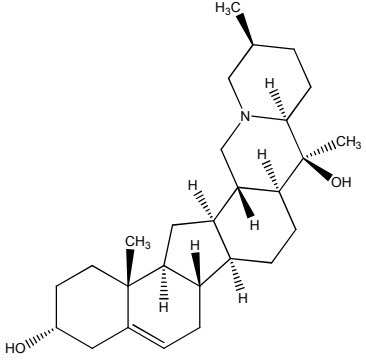
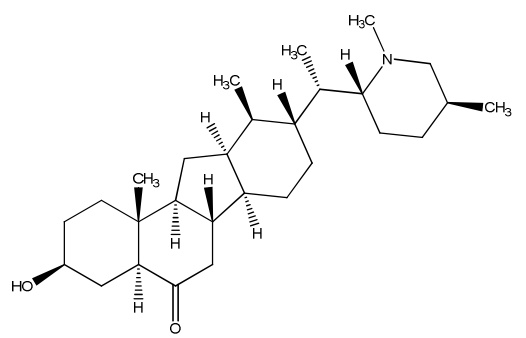
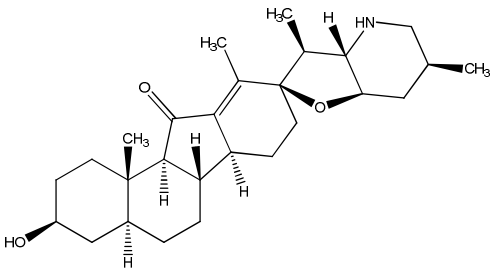
Obr. 1 Příklady strukturních vzorců alkaloidů izolovaných z *F. delavayi*.

3.3.1.3 Klasifikace alkaloidů rodu *Fritillaria*

Alkaloidy rodu *Fritillaria* jsou podle své chemické struktury zařazeny do 5 základních typů: cevaninový, veratraminový, jervininový, solanidinový a verazinový.³¹

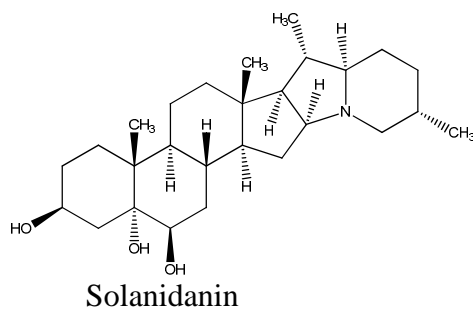
V následující tabulce jsou zobrazeny jednotlivé strukturální typy společně s nejvýznamnějším alkaloidem a příkladem rostliny ze které byl izolován (Tabulka II).

Tabulka II Strukturální typy alkaloidů rodu *Fritillaria*, jejich příklady a druhy je obsahující

Strukturální typ	příklad alkaloidu	rostlinný druh
Cevaninový typ	 <p>Fritillarizine</p>	<i>Fritillaria Verticulata</i> ³⁴
Veratraminový typ	 <p>Ningpeisin</p>	<i>Fritillaria ningguoensis</i> ³⁵
Jervininový typ	 <p>Songbeisin</p>	<i>Fritillaria unibracteata</i> ³⁶

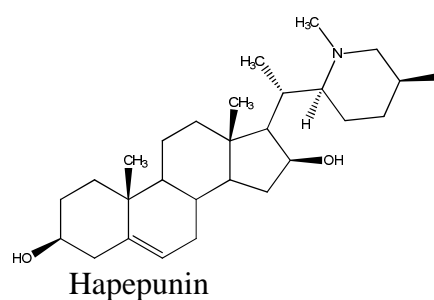
Solanidinový typ

*Fritillaria delavayi*³⁷



Verazinový typ

*Fritillaria camtschatcensis*³⁸

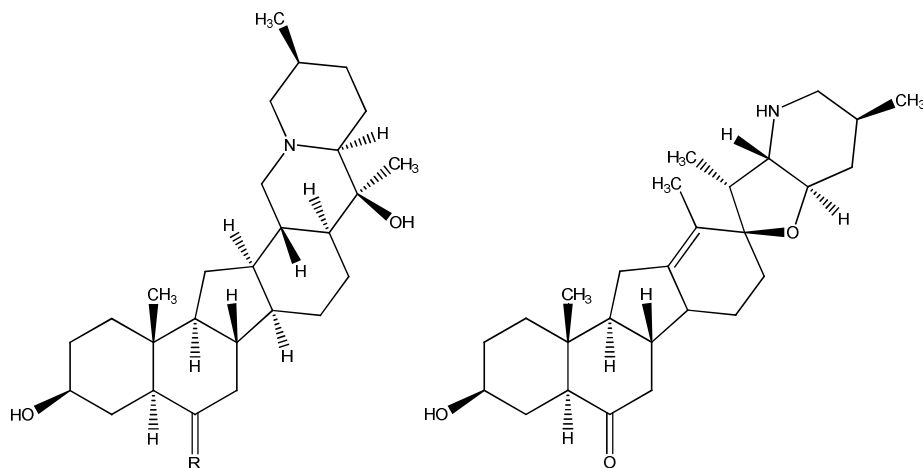


3.3.1.4 Biologická aktivita alkaloidů izolovaných z rodu *Fritillaria*

3.3.1.4.1 Antihypertenzní aktivita

Chuanbeinon, alkaloid izolovaný z rostliny *Fritillaria delavayi*, prokázal vazorelaxační aktivitu jako koronární vazodilatátor o MIC 2.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ v srdci morčete *in vitro*.³⁹

Biotestem vedená frakcionace BuOH-rozpustného extraktu *Fritillaria ussuriensis* vedla k izolaci verticinonu, verticinu a peimisinu (Obr. 2). Tyto alkaloidy inhibovaly aktivitu angiotensin konvertujícího enzymu v závislosti na dávce, přičemž hodnoty 50% inhibiční koncentrace (IC_{50}) byly 165,0 μM , 312,8 μM a 526,5 μM . Jako pozitivní kontrola byl použit captopril, jehož IC_{50} bylo 20 nM. Přítomnost těchto aktivních látek může být alespoň z části zodpovědná za antihypertenzní aktivitu cibulí *Fritillaria ussuriensis*.⁴⁰



verticinon R = O

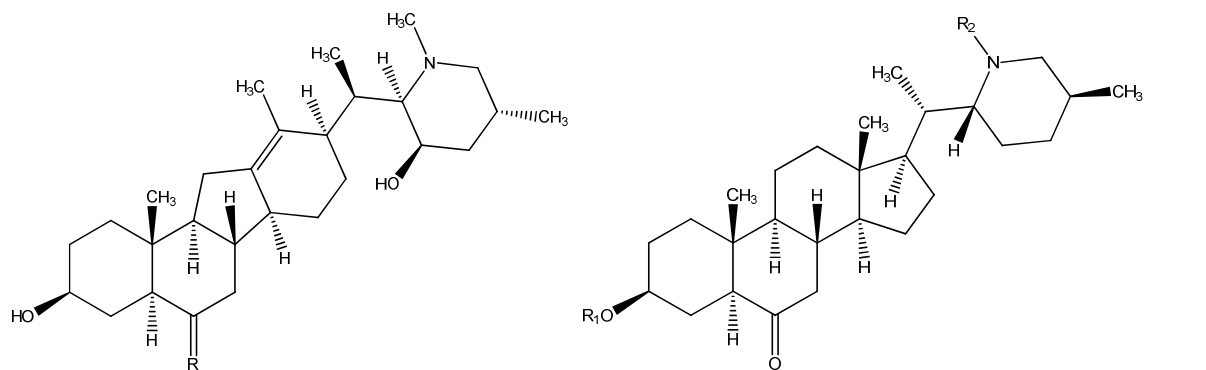
peimisin

verticin R =

Obr. 2 Strukturní vzorce verticinu, verticinonu, peimisinu.

3.3.1.4.2 Antitumorová aktivita

Z *Fritillaria puziensis* byly izolovány alkaloidy puqienin A, puqienin B, puqietinon, N-dementylpuqietinon a puqietinosid (Obr 3). Tyto sloučeniny byly testovány na antitumorózní aktivitu za použití linie rakovinných plicních buněk A549, linie lidských jaterních rakovinných buněk BGC-823 a linie lidských promyelotických leukemických buněk HL60. Pouze N-dementylpuqietinon v koncentraci 10 μ M prokázal slabou aktivitu proti buňkám řady HL-60 (51% inhibice).⁴¹



puqienin A R = β -OH, H

puqienin B R = O

puqietinon

N-dementylpuqietinon

puqietinosid

R₁ = H, R₂ = CH₃

R₁ = R₂ = H

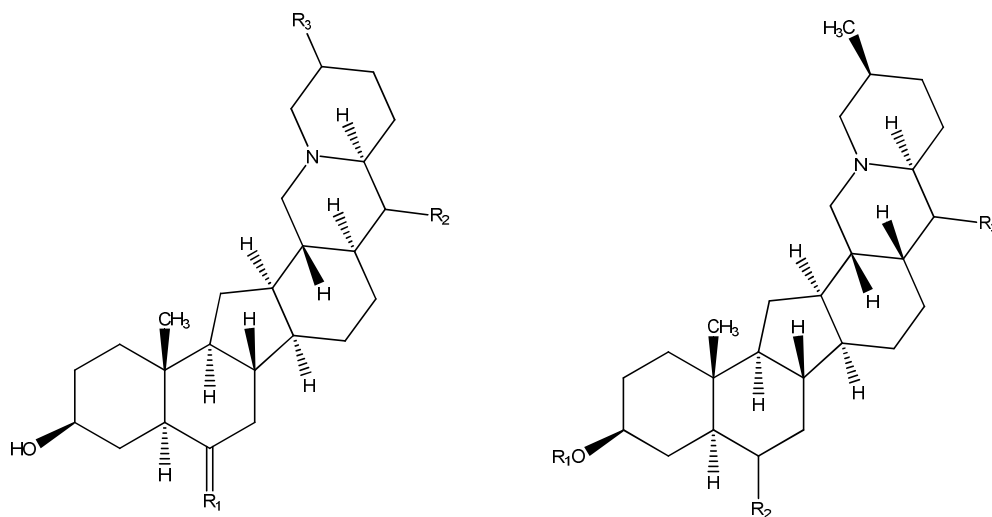
R₁ = β -D-Glc, R₂ = CH₃

Obr. 3 Strukturní vzorce alkaloidů izolovaných z *Fritillaria puziensis*.

3.3.1.4.3 Antiastmatická a antitusická aktivita

Z rostliny *Fritillaria hupehensis* byly izolovány steroidní alkaloidy, u nichž byla testována antiastmatická a antitusická aktivita. Jedná se o verticin, verticinon, ebeidin, ebeidinon, hupehenin, hupeheninosid (Obr. 4) a ebeiensin. Z výsledků vyplynulo, že ebeinsin vykázal významnou antiastmatickou aktivitu na amoniak-alkoholem indukovaný kašel u myši v dávce 3,3 mg kg⁻¹. Zatímco ebeiedin a hupeheninosid prokázaly antitusickou aktivitu na acetylcholin chlorid-histamin indukované astma morčat v dávce 3 mg kg⁻¹.⁴²

Sloučeniny puqienin A, puqienin B, puqietinon, *N*-demethylpuqitinin a puqietinonosid projevovaly *in vivo* antitusickou aktivitu na amoniak-alkoholem indukovaný kašel u myši. Tyto sloučeniny prodloužily latentní stadium a významně redukovaly dobu trvání kašle v dávkách 5 a 10 mg kg⁻¹. Právě přítomnost těchto sloučenin ve *Fritillaria Puqiensis* je zodpovědná za léčivý účinek.⁴¹



ebeiedin R₁= β-OH, R₂= α-CH₃, R₃= β-CH₃ hupehenin R₁= H, R₂= β-OH, R₃= α-CH₃
ebeiedinon R₁= O, R₂= α-CH₃, R₃= β-CH₃ hupeheninosid R₁= β-D-Glc, R₂= β-OH, R₃= α-CH₃

Obr. 4 Strukturní vzorce alkaloidů izolovaných z *Fritillaria hupehensis*.

3.3.1.4.4 Anticholinergní aktivita

Z *Fritillaria imperialis* byly izolovány steroidní alkaloidy – ebeinon, eduardin, edpetilidin, verticinon a isoverticin, které byly následně testovány na jejich inhibiční aktivitu vůči acetylcholinu. Bylo zjištěno, že ebeinon (1 μg mL⁻¹) vykazoval inhibiční aktivitu vůči acetylcholinu izolovaného ze střev a atrie morčete, zatímco ostatní sloučeniny byly inaktivní (až do 30 μg mL⁻¹).⁴³ Na alkaloidech ze stejné rostliny byl proveden screening na jejich

inhibiční aktivitu na acetylcholinesterázu a butyrylcholinesterázu také impericin, forticin, delavin, persicanidin A a imperialin. Tyto sloučeniny se zdají být spíše selektivními inhibitory butyrylcholinesterázy.⁴⁴

Ebeinone, alkaloid izolovaný rovněž z *Fritillaria imperialis*, byl testován pro svoji schopnost působit na M_2 a M_3 receptorech acetylcholinu. Tento alkaloid projevil větší afinitu na muskarinových M_2 receptorech než na M_3 receptorech u morčete, a také u krys allostericky interagoval na atriálních M_2 receptorech.⁴⁵

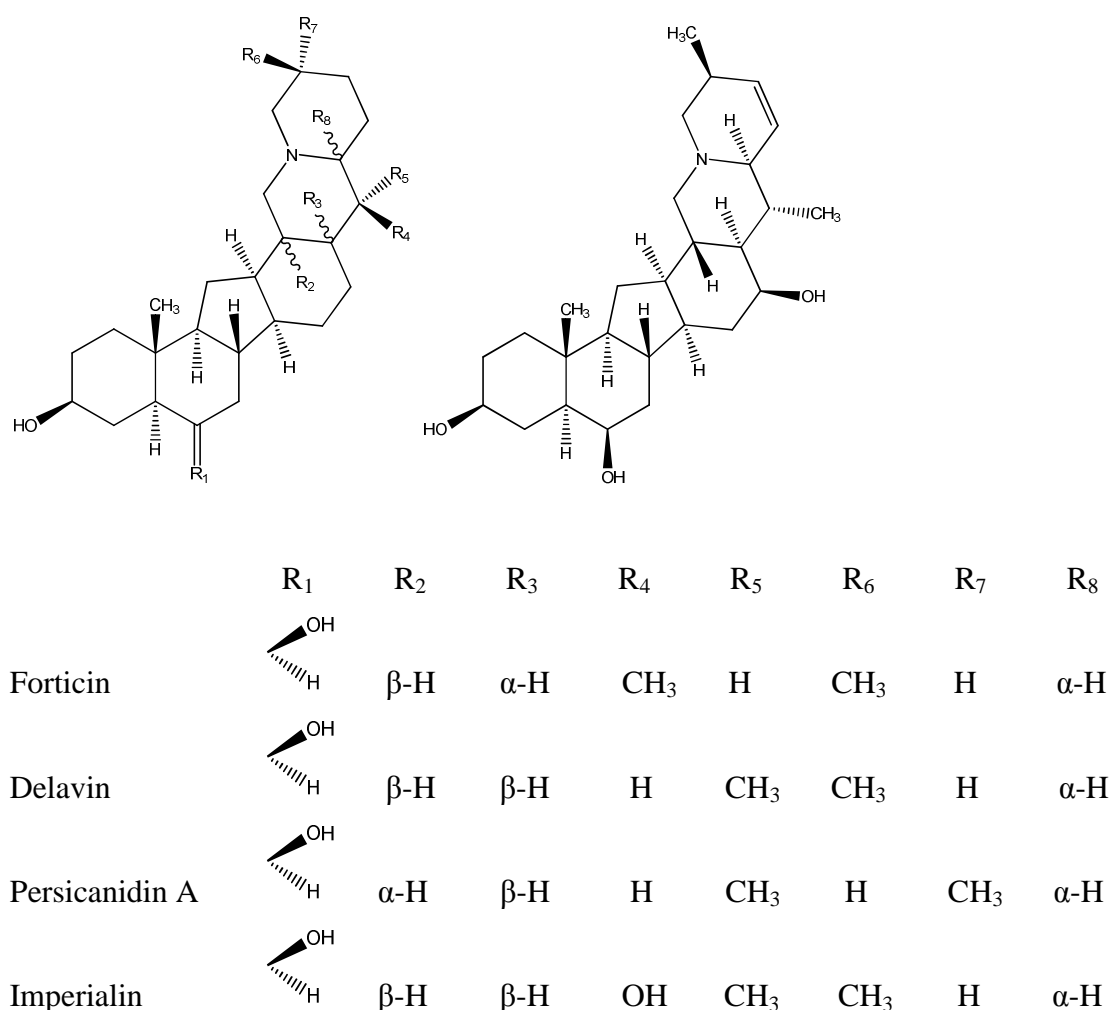
3.3.1.5 *Fritillaria imperialis*

Fritillaria imperialis (Obr. 5) je lidově používána k léčení různých neduhů jako třeba bolesti v krku, kašle, astmatu, bronchitidy, nádorů, dysurie a hemoptýzy.^{46,47} Fytochemické studie u této rostliny vyústily v nalezení několika steroidních alkaloidů s anticholinergním a cholinesterázu inhibujícím účinkem.^{43,44,48} Jedná se o impericin, forticin, delavin, persicanidin a imperialin.



Obr. 5 *Fritillaria imperialis*⁴⁹

Tyto alkaloidy byly podrobeny screeningu na jejich inhibiční cholinesterázovou aktivitu. Jak jsem již uvedl výše, v lidském těle existují dvě formy cholinesterázy, a to acetylcholinesteráza (AChE) a butyrylcholinesteráza (BuChE). Inhibice mozkové AChE může zmírnit kognitivní příznaky spojené s projevy Alzheimerovy choroby. Několik alkaloidů izolovaných z této rostliny ukázalo anticholinergní aktivitu. Tato studie popisuje inhibiční efekt alkaloidů na acetylcholinesterázu a butyrylcholinesterázu. Koncentrace sloučenin inhibujících enzym z 50% jsou uvedeny v tabulce III. Eserin [(-)-physostigmin] byl použit jako standardní inhibitor. Závěry této studie jsou takové hodnot v tabulce III vplynulo, že tyto sloučeniny jsou spíše selektivní inhibitory BuChE.⁴⁴



Obr. 6 Strukturní vzorce alkaloidů izolovaných z *Fritillaria imperialis*.

Tabulka III Kvantitativní inhibice alkalodů *in vitro*⁴⁴

Sloučeniny	AChE IC ₅₀ (μM)	BuChE IC ₅₀ (μM)
Impericin	67,97 ± 2,46	1,607 ± 0,12
Forticin	>500	100,5 ± 0,455
Delavin	105,5 ± 1,452	1,706 ± 0,11
Persicanidin	352,2 ± 4,036	4,245 ± 0,079
Imperialin	>500	121,5 ± 6,612
Eserin (standard)	0,41 ± 0,001	0,857 ± 0,008

3.3.1.6 *Fritillaria ussuriensis* Maxim

F. ussuriensis, *F. puqiensis*, *F. hupehensis*, *F. cirrhosa* a *F. ebeiensis* jsou používanými bylinami v čínském tradičním léčitelství pro svůj antitusický a expektorační účinek již více než 2000 let.⁵⁰ *F. ussuriensis* Maxim je navíc obsažena v čínském lékopise z roku 2005. Jejími hlavními obsahovými látkami jsou, stejně jako u ostatních druhů *Fritillaria*, steroidní alkaloidy. Je známo, že pomáhají tišit kašel, odstraňovat hlen a zmírňovat astma. Jsou to pingbeimunon A, ussuriedin, benzo[7,8]flureno[2,1]quinolizin cevan-3,6,16,20-tetrol, ebeiedinon, pingbeimin C a verticin.⁵¹⁻⁵⁵

V jedné ze studií na rostlině *Fritillaria ussuriensis* Maxim byly tyto alkaloidy testovány *in vitro* na inhibiční aktivitu vůči AChE za použití Ellmanovy metody. Jako pozitivní kontrola byl použit Huperzin A. Bohužel žádný z výše uvedených alkaloidů nevykazoval při koncentraci 100 μg/ml dostatečný účinek. Konkrétní hodnoty jsou shrnuty v tabulce (Tabulka IV).⁵⁶

Tabulka IV Inhibiční aktivita sloučenin obsažených v *F. ussuriensis* Maxim na AChE⁵⁶

Sloučenina	AChE inhibiční aktivita (%) ^a
Pingbeimunon A	40
Ussuriedin	21
Benzo[7,8]fluoreno[2,1-b]quinolizine cevane-3,6,16,20-tetrol	12
Ebeiedinon	46
Pingbeimin C	19
Verticin	25
Huperzin A ^b	100

^a Koncentrace vzorků je 100 μg/mL.

^b Positivní kontrola (IC₅₀ 41 μM).

3.3.1.7 *Fritillaria wabuensis*

Bulbus Fritillaria cirrhosae (BFC) může být odvozen od šesti rostlin – *Fritillaria cirrhosa*, *Fritillaria wabuensis*, *Fritillaria unibracteata*, *Fritillaria przewalski*, *Fritillaria delavayi* a *Fritillaria taipaiensis*. Cibule *Fritillaria wabuensis* S. Y. Yang a S. C. Yueh (BFW) jsou tak jedním ze zdrojů BFC. V tradiční medicíně se používá práškovaná droga k léčení kašle, a to v dávce 3-10 g za den. Použití BFW při léčbě kašle a astmatu je po staletí v Číně velice rozšířené. Pro svůj dobrý terapeutický účinek a málo nežádoucích účinků byl zařazen do Čínského Lékopisu 2010. Farmakologické studie demonstrovaly značný antitusický, expektorační a antiastmatický účinek surového alkaloidního extraktu BFC/BFW.^{57,58,59}

Navíc předchozí *in vitro* studie naznačily, že alkaloidy verticin, imperialin, imperialin-3- β -glukosid, 3 β -acetylimperialin a sinpeinin A by mohly mít antiastmatický účinek.^{60,61,62}



Obr. 9 *Fritillaria wabuensis*⁶³

Vědci v Číně testovali antitusický účinek výše zmíněných alkaloidů při hydroxidem amonným indukovaném kašli. Testování probíhalo při vysokých (4,5 mg/kg), středních (3,0

mg/kg) a nízkých dávkách (1,5 mg/kg). Při vysokých a středních dávkách testované sloučeniny výrazně prodlužovaly období bez kašle. Při nízkých dávkách pouze isoverticin a isoverticin- β -oxid prodloužovaly klidové období v porovnání se standartem (kodein fosfát). Ve všech dávkách všechny alkaloidy značně snižovaly frekvenci kašle, zejména pak při středních dávkách měly některé alkaloidy téměř stejnou antitusickou aktivitu jako desetinasobná dávka kodein fosfátu. Navíc imperialin a isoverticin snižovali frekvenci kašle v závislosti na dávce.⁶⁴

3.3.1.8 Další druhy rodu *Fritillaria*

V následujícím přehledu jsou shrnuty další vybrané druhy rodu *Fritillaria*, kterým byla věnována pozornost po fytochemické stránce. U každého druhu jsou uvedeny alkaloidy, jež byly v dané rostlině identifikovány (Tabulka V).

Tabulka V Další druhy rodu *Fritillaria* a jejich alkaloidy

Druh	Izolované alkaloidy
<i>Fritillaria cirrhosa</i>	(22R, 22S) – Solanidin, Thymidin, Adenosin ^{65,66}
<i>Fritillaria delavayi</i>	Delavin, Delavinon, Chuanbeinon, Delafrinon, Delafrin ^{67,68,69}
<i>Fritillaria eduardi</i> (<i>Petilium eduardi</i>)	Edpetisidin, Petilin, imperialin-N-oxid, Edpetisinin, Peimisin, Edpetilidin, Edwardinin, Edpetisin, Edpetilin, Eduardin, Edpetinosin ^{70,71,72,73,74}
<i>Fritillaria imperialis</i>	Isobaimonidin, Imprlin, Verticinon, Ebainon, Eduardin, Edpetilidin, Isoverticin, Imperonin, Imperolin, Imperialin, Impranin, Isobaiminidin, Dihydroimpranin, Korsevin, Forticin, Impericin, Ningpeisin, Sipeimin (imperialin) ^{43,75,76,77,78}
<i>Fritillaria monatha</i>	Pengbeimin A, Pengbeimin B, Pengbeimin C, Pengbeimin D ^{79,80}
<i>Fritillaria thunbergi</i>	Zhebeinon, Zhebeinin, Dongbeirin, Dongbeinin, Peimin, Peiminin, Isoverticin, Verticin, Reticinon, Solanidin; alkaloidní

	glykosidy jako Zhebeinosid, Picopodophylotoxin ⁸¹⁻⁹⁴
<i>Fritillaria ussuriensis</i> (Pin Bei Mu)	Pingeimin A, Pingepeimin B, Peimisin, Sipeimin, Pingbeinon, Heilonin, Ussurienin, Ussurienon, Ussuriedin, Ussuridinon; glykosidy jako Sipeimin-3-D-glykosid a Pingbeininosid ⁹⁵⁻¹⁰⁶
<i>Fritillaria wabuensis</i>	Imperialin- β -N-oxid, Imperialin, Peimisin, Ebeinone, Isoverticine ^{107,108,109,110}

3.3.2 Rod *Eucomis*

Rod *Eucomis* L 'Herit je malý rod domorodých cibulovitých rostlin široce rozšířených v Jihoafrické republice.^{111,112,113} Rod *Eucomis* patří do čeledi *Hyacinthaceae*, která zahrnuje geofyty s cibulí jako zásobním orgánem. Listy jsou v přízemní růžici a květenství je hroznovité.¹¹⁴ Hroty květů připomínají ananas.¹¹² Zásobním orgánem je velká, opláštěná cibule vejcovitého či kulovitého tvaru.^{115,116} Stonek s květy dorůstá do výšky od 30 cm do více jak 100 cm podle druhu.¹¹⁶

Rod *Eucomis* se skládá z asi 13ti druhů přirozeně se vyskytujících v Jihoafrické republice. Přirozené prostředí jsou vlhké louky od pobřeží až po oblast Drakensbergu.^{113,116,117} Tyto populace jsou zranitelné, jelikož jsou v současné době dostupné pouze ve vzdálených oblastech ve vysokých nadmořských výškách.¹¹⁸ *E. bicolor* hojně nalezneme na úpatí vlhkých skal v okolí Drakensbergu a ve vlhkých oblastech od 1800 m do 2600 m, zatímco *E. humilis* se vyskytuje nejčastěji mezi 2400 a 2900 m.¹¹⁹ Druhy rodu *Eucomis* jsou v létě rostoucí geofyty kromě *E. regia*, který roste v zimě a hyne zkraje léta.¹²⁰

Cibule rodu *Eucomis* jsou součástí medicíny kmenů Zulu, Tswana, Sotho a Xhosa. Používá se odvar z oloupaných cibulí a kořenů připravených ve vodě nebo mléku. Používá se jako jedna z ingrediencí nálevu. Primárně jsou užívány v léčení bolesti a horečky, nicméně cibule *E. autumnalis* jsou považovány za toxické.¹²¹ Dále se používají k léčení onemocnění močového měchýře, ledvin, nauzey a kašle.^{117,122}

3.3.2.1 Taxonomické zařazení

Říše: *Plantae*

Podříše: *Trachebionta*

Oddělení: *Magnoliophyta*

Třída: *Liliopsida*

Řád: *Asparagales*

Čeleď: *Hyacinthaceae*

Rod: *Eucomis*



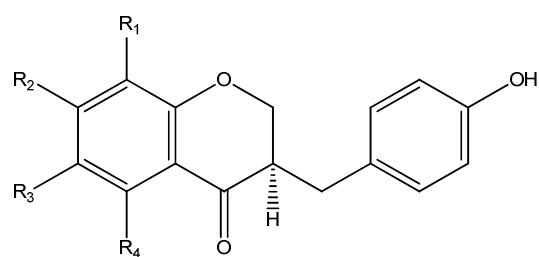
Obr. 10 *Eucomis bicolor*¹²³

3.3.2.2 Biologická aktivita a obsahové látky

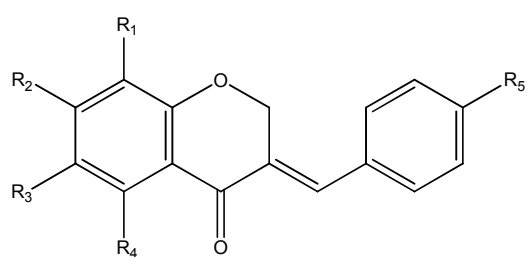
Z fytochemického hlediska obsahují druhy rodu *Eucomis* následující látky: *E. comosa* a *E. bicolor* široké spektrum homoisoflavonoidů^{124,125}, *E. comosa* chromanon, 5,7,8-

trihydroxy-4-chromanon¹²⁶, dále *E. autumnalis* kromě homoisoflavonoidů také spirocyklické nortriterpenoidy, benzopyranony, autumnariol a autumnariniol (Obr. 11).^{127,128,129}

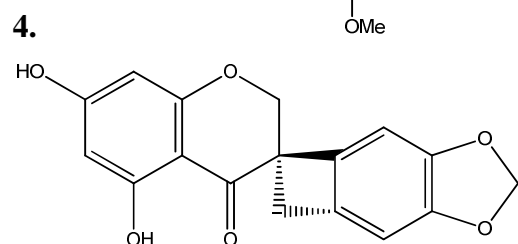
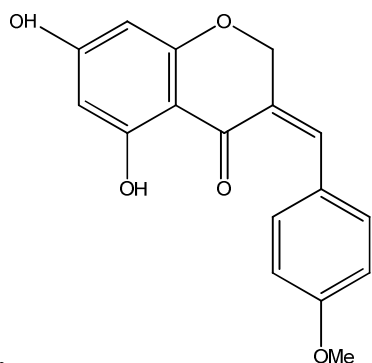
Homoisoflavonoidy náleží do malé homogenní skupiny heterocyklů, ve kterých se přirozeně vyskytuje kyslík a jsou většinou, ale ne vždy omezeny na podčeleď Hyacinthoidae. Studie o biologické aktivitě homoisoflavonoidů popisují jejich účinky jako protizánětlivý, antibakteriální, antihistaminový, antimutagenní, angioprotektivní a schopné inhibovat fosfodiesterázu.^{130,131,132}



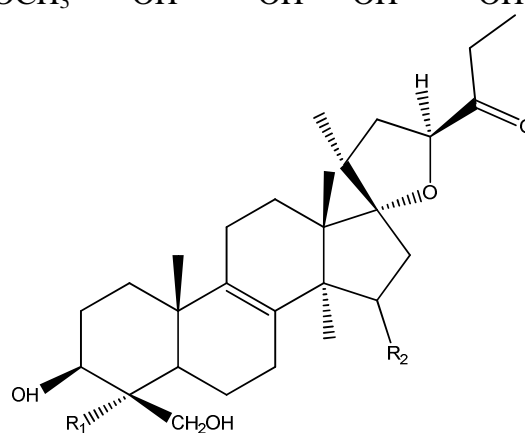
	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
1.	H	OH	H	OCH ₃
2.	OCH ₃	OH	H	OH



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
3.	OCH ₃	OH	H	OH	OH
5.	H	OH	H	OH	OCH ₃
7.	OCH ₃	OH	OH	OH	OH



8.



	R ₁	R ₂
6.	CH ₃	= O
9.	CH ₂ OH	H

1. 7-hydroxy-5-methoxy-3-(4'-hydroxybenzyl)-4-chromanon
2. 3,9-dihydropunctatin
3. punctatin
4. (Z)-eucomin
5. (E)-eucomin
6. eucoesterol
7. pole-evansin
8. scillascillin
9. (23S)-17 α ,23-epoxy-3 β ,28,29-trihydroxy-27-norlanost-8-en-24-on

Obr. 11 Struktury látek izolovaných z *Eucomis comosa*, *Eucomis schijffii* a *Eucomis pallidiflora* subsp. *pole evansii*.

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Všeobecné postupy

4.1.1 Destilace a odpařování

Rozpouštědla byla před použitím destilována; nejprve byl zachycen předeček (asi 5%; většinou s vodným azeotropem), poté bylo vydestilováno zbylých cca 90 % rozpouštědla.

Rozpouštědla byla uchovávána v hnědých nádobách.

Odpařování chromatografických frakcí bylo prováděno na vakuové odparce Büchi Rotavapor R 114 vybavené vodní lázní Büchi Waterpath B-480 při 40 °C za sníženého tlaku.

4.2 Materiál a vybavení

4.2.1 Rozpouštědla

Diethylether, p.a. (Penta)

Ethanol 95%, denaturovaný metanolem, p.a. (Penta)

Ethylacetát, p.a. (Penta)

Methanol LC-MS CHROMASOLV® (Sigma-Aldrich)

4.2.2 Chemikálie

Amoniak, 25% vodný roztok, p.a. (Lachema)

Kyselina chlorovodíková 35%, p.a. (Lachema)

4.3 Příprava sumárních extraktů

4.3.1 Biologický materiál

Čerstvé cibule rostlin *Fritillaria meleagris*, *F. assyriaca*, *F. imperialis* var. *Lutea*, *F. thunbergii*, *F. davisii*, *F. acmopetalla*, *Eucomis bicolor*, *E. autumnalis*, *E. comosa*, *Bulbocodium verum*, *Brodiaea californica*, *Bessera elegans*, *Ornithogalum thyrsoides* byly zakoupeny od komerčních prodejců Lukon glads s.r.o. (Sadská, ČR), Pragon s.r.o a OBI. Verifikace byla provedena prof. RNDr. L. Opletalem, CSc. a dokladové rostliny jsou uloženy v herbáři na FaF UK HK.

4.3.2 Příprava ethanolového a alkaloidního extraktu

Rozmleté čerstvé cibule (3×15 g) byly 3× extrahovány ethanolem (50 ml) při varu pod zpětným chladičem na vodní lázni po dobu 15 minut. Směs se poté zfiltrovala a rozpouštědlo se pod sníženým tlakem odpařilo. Bylo odebráno 2×10 mg pro biologické testy (cholinesterázová, antioxidační aktivita). Zbývající odparek byl rozpuštěn v 10 ml 2% HCl a za účelem odstranění neutrálních sloučenin vytřepán diethyletherem (3×15 ml). Poté byl k vodné fázi přidán 25% amoniak a pH bylo upraveno na 10. Vodná fáze byla vytřepána ethylacetátem (3×15 ml). Organická fáze byla odpařena do sucha, vysušena v exsikátoru a z každého odparku bylo odebráno 2×10 mg na biologické testy.

4.4 Stanovení inhibiční aktivity alkaloidů a alkaloidních extraktů vůči erytrocytární AChE a sérové BuChE

4.4.1 Chemikálie a materiál použité pro stanovení cholinesterázové inhibiční aktivity

Chemikálie:

10mM acetylthiocholin jodid, (Sigma-Adrich)

10mM butyrylthiocholin jodid, (Sigma-Adrich)

0,1 M fosfátový pufr, pH 7,4 (chemikálie pro přípravu pufru: dihydrát dihydrogenfosforečnanu sodného, p.a. (Lachema); dodekahydrát hydrogenfosforečnanu disodného, p.a. (Lachema)

5 mM 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina, $\geq 98\%$ (Sigma-Aldrich)

Huperzin A, (TAZHONGHUI – Tai'an zhonghui Plant Biochemical Co., Ltd., China)

Galanthamin hydrobromid, (Changsha Organic Haerb Inc., China)

Dimethylsulfoxid, (Sigma-Adrich)

Materiál:

Jako zdroj acetylcholinesterázy byla použita pouzdra lidských erytrocytů. Zdrojem butyrylcholinesterázy byla lidská plazma.

Měření bylo prováděno v mikrotitračních destičkách.

4.4.2 Přístroj použitý pro stanovení cholinesterázové inhibiční aktivity

Reader Synergy™ HT Multi-Detection Microplate Reader (BioTek, USA)

4.4.3 Podmínky měření

Experimenty byly prováděny za těchto podmínek:

- při teplotě 37 °C
- v prostředí fosfátového pufru (pH 7,4)
- při vlnové délce spektrofotometru 436 nm
- v mikrotitračních destičkách

4.4.4 Příprava erytrocytárních pouzder

Erytrocytární pouzdra byla připravena z čerstvě odebrané krve, ke které byl přidán 1 ml citrátu sodného na 10 ml krve podle lehce upravené metody Stecka a Kanta¹³⁴. Plazma (HuBuChE) byla oddělena z krve pomocí centrifugace při rychlosti 4000 ot./min za použití centrifugy Boeco U-32R s rotorem Hettich 1611. Erytrocyty byly přemístěny do 50ml zkumavek a třikrát promyty 5mM fosfátovým pufrům (pH 7,4) obsahujícím 150 mM chloridu sodného (12 000 ot./min., Avanti J-301, rotor JA-30.50). Promyté erytrocyty byly míchány s 5mM fosfátovým pufrům (pH 7,4) po dobu 10 minut, čímž došlo k jejich lýze. Následně byly centrifugovány rychlostí 20 000 ot./min a vzniklá pouzdra (HuAChE) byla třikrát promyta fosfátovým pufrům.

4.4.5 Stanovení cholinesterázové inhibiční aktivity (hodnoty IC₅₀)

Pro stanovení hodnoty IC₅₀ byla použita Ellmanova spektrofotometrická metoda s použitím 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoové kyseliny (DTNB)¹³⁵. Jako substráty se používají estery thiocholinu, které jsou cholinesterázami štěpeny na thiocholin a příslušnou kyselinu. Stanovuje se SH- skupina thiocholinu, která se naváže na DTNB za vzniku žlutě zbarveného produktu, který se stanovuje spektrofotometricky při vlnové délce 436 nm. Sleduje se nárůst absorbance za 1 minutu. Hodnoty IC₅₀ byly vypočítány z naměřených hodnot poklesu aktivity acetylcholinesterázy nebo butyrylcholinesterázy nelineární regresí v programu GraphPaD Prism (verze 3.02 pro Windows; výrobce Graph PaD Software, San Diego, CA, USA). Výsledky byly porovnány s hodnotami IC₅₀ známých inhibitorů cholinesteráz: galataminem (IC₅₀ HuAChE = 1,710 ± 0,065 μM, HuBuChE = 42,30 ± 1,30 μM), huperzinem A (IC₅₀ HuAChE = 0,033 ± 0,001 μM, HuBuChE >1000 μM). % I (inhibice) byla počítána dle 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.

4.5 Stanovení antioxidační aktivity alkaloidních extraktů

4.5.1 Chemikálie a materiál použité pro stanovení antioxidační aktivity

2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl radikál, (Sigma-Adrich)

Kvercetin, (Sigma-Adrich)

Kyselina askorbová, (Sigma-Aldrich)

Trolox, (Sigma-Adrich)

4.5.2 Přístroje použité pro stanovení antioxidační aktivity

Reader Synergy™ HT Multi-Detection Microplate Reader (BioTek, USA)

4.5.3 Stanovení antioxidační aktivity (EC₅₀)

Antioxidační aktivita byla testována *in vitro* DPPH testem. Metoda je založena na reakci stabilního 2,2'-difeny-1-pikrylhydrazylu (DPPH) se vzorkem. Snížení absorbance DPPH měřené při 525 nm je závislé na koncentraci antioxidantu ve sledovaném vzorku. Antiradikálová aktivita vzorků byla vyjádřena jako 50% účinná koncentrace (EC₅₀), která byla vypočítána pomocí programu GraphPad Prism 3.02, a byla porovnána se známými antioxidanty: kvercetinem EC₅₀ = 11,11 ± 0,25 μM, kys. askorbovou EC₅₀ = 51,61 ± 3,21 μM a troloxem EC₅₀ = 20,45 ± 1,31 μM.

5. VÝSLEDKY

5.1 Výsledky inhibičních aktivit vůči AChE/BuChE ethanolových a alkaloidních extraktů rostlin

Ethanolové a alkaloidní extrakty byly testovány na inhibiční aktivitu vůči erytrocytární acetylcholinesteráze a sérové butyrylcholinesteráze. Výsledky měření jsou shrnuty v následujících tabulkách (Tabulka VI a VII) a grafech (graf č. 1-15).

Tabulka VI Inhibiční aktivita ethanolových extraktů vůči HuAChE a HuBuChE

Ethanolový extrakt	HuAChE IC ₅₀ [μM]	HuBuChE IC ₅₀ [μM]
<i>Fritillaria meleagris</i>	> 500	53,14 ± 2,51
<i>Fritillaria assyriaca</i>	> 500	224,1 ± 4,9
<i>Fritillaria imperialis var. lutea</i>	>500	43,35 ± 2,63
<i>Fritillaria thunbergii</i>	135,0 ± 4,8	79,56 ± 3,11
<i>Fritillaria davisii</i>	>500	396,0 ± 5,1
<i>Fritillaria acmopetalla</i>	>500	344,5 ± 5,2
<i>Eucomis bicolor</i>	>500	>500
<i>Eucomis autumnalis</i>	>500	>500
<i>Eucomis comosa</i>	>500	>500
<i>Bulbocodium vernum</i>	>500	>500
<i>Brodiaea californica</i>	>500	>500
<i>Bessera elegans</i>	325,0 ± 5,1	79,65 ± 3,06
<i>Ornithogalum thyrsoides</i>	>500	>500
<i>Bellevalia romana</i>	>500	>500
<i>Gloriosa rothschildiana</i>	>500	>500
Galanthamin ^a	1,710 ± 0,065	42,30 ± 1,30
Huperzin ^a	0,033 ± 0,001	> 1000
Eserin ^a	0,063 ± 0,001	0,130 ± 0,004

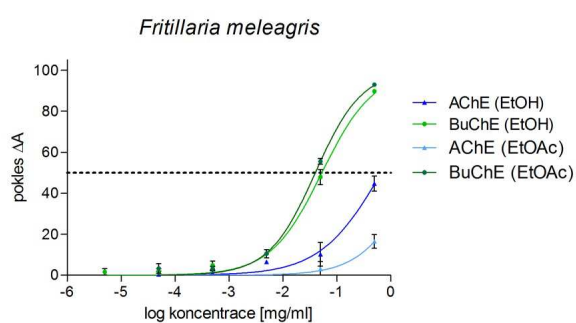
^a Referenční látky

Tabulka VII Inhibiční aktivita alkaloidních extraktů rostlin rodu *Fritillaria* vůči AChE a BuChE

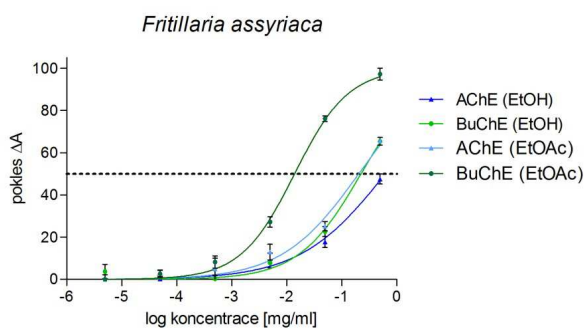
Alkaloidní extrakt	HuAChE IC ₅₀ [μM]	HuBuChE IC ₅₀ [μM]
<i>Fritillaria meleagris</i>	> 500	40,1 ± 2,5
<i>Fritillaria assyriaca</i>	203,8 ± 4,9	13,92 ± 0,88
<i>Fritillaria imperialis</i> var. <i>lutea</i>	41,54 ± 1,58	5,12 ± 0,37
<i>Fritillaria thunbergii</i>	253,9 ± 4,8	6,38 ± 0,45
<i>Fritillaria davisii</i>	372,6 ± 6,4	17,66 ± 1,02
Galanthamin ^a	1,710 ± 0,065	42,30 ± 1,30
Huperzin A ^a	0,033 ± 0,001	>500
Eserin ^a	0,063 ± 0,001	0,130 ± 0,004

^a Referenční látky

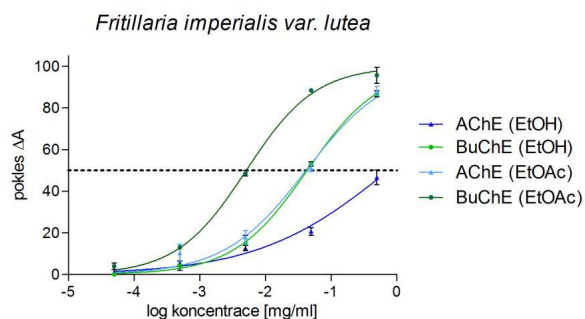
5.1.1 Inhibiční křivky ethanolových a alkaloidních extraktů



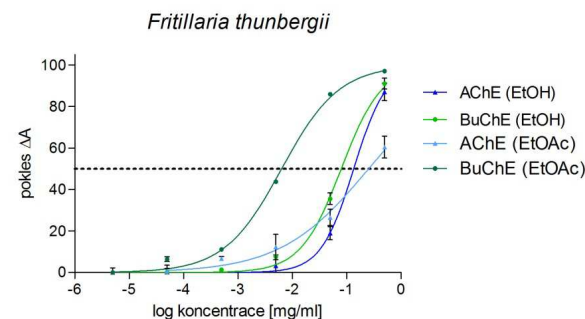
Graf č. 1: inhibiční křivky *Fritillaria meleagris*



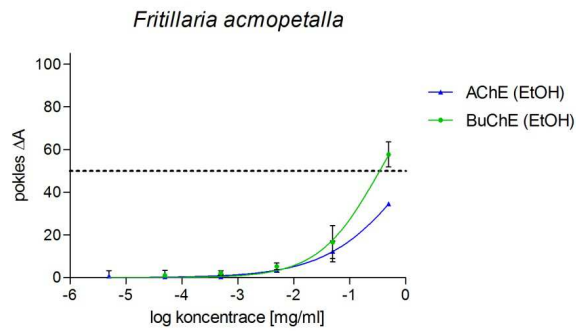
Graf č. 2: inhibiční křivky *Fritillaria assyriaca*



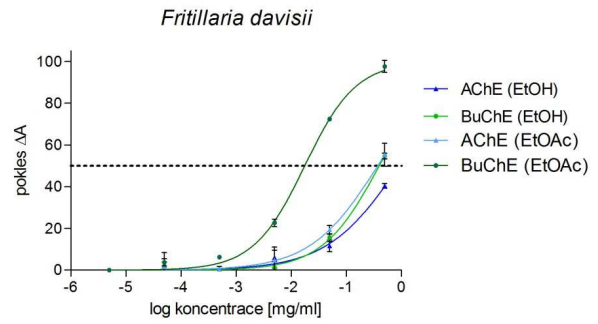
Graf č. 3: inhibiční křivky *Fritillaria imperialis* var. *lutea*



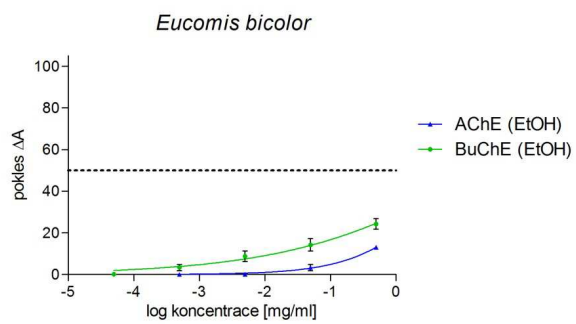
Graf č. 4: inhibiční křivky *Fritillaria thunbergii*



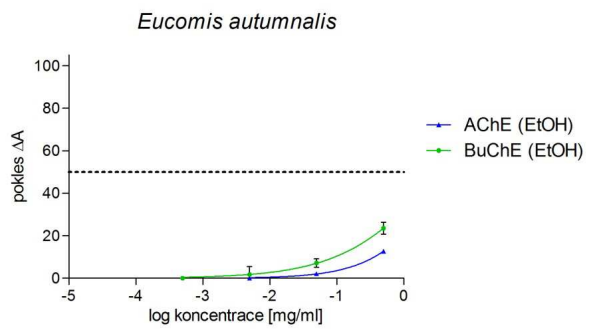
Graf č. 5: inhibiční křivky *Fritillaria acmopetala*



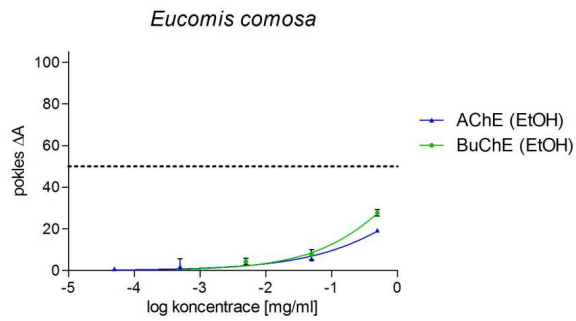
Graf č. 6: inhibiční křivky *Fritillaria davisii*



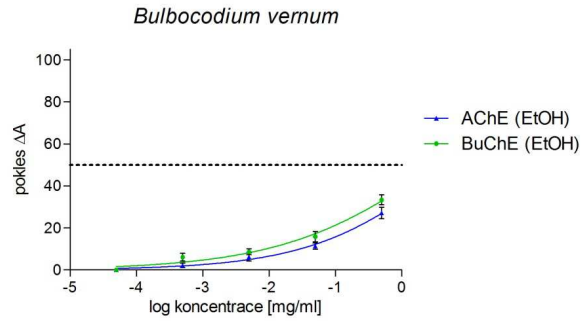
Graf č. 7: inhibiční křivky *Eucomis bicolor*



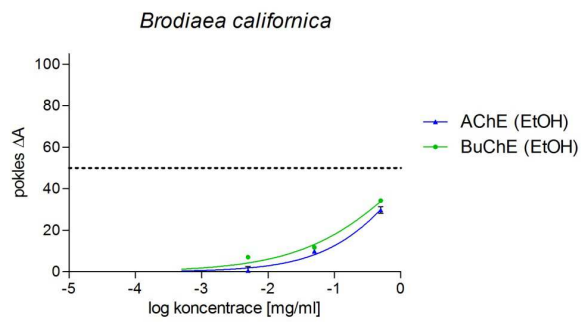
Graf č. 8: inhibiční křivky *Eucomis autumnalis*



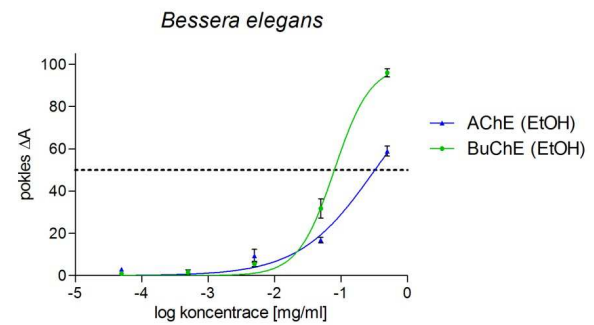
Graf č. 9: inhibiční křivky *Eucomis comosa*



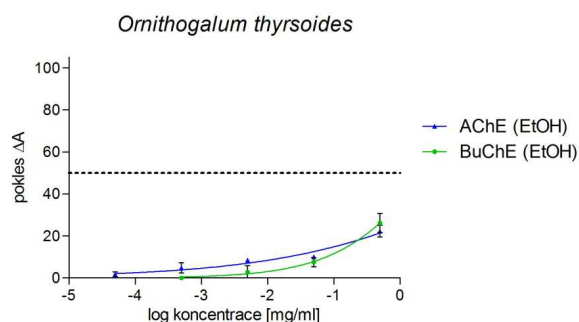
Graf č. 10: inhibiční křivky *Bulbocodium vernum*



Graf č. 11: inhibiční křivky *Brodiera californica*



Graf č. 12: inhibiční křivky *Bessera elegans*



Graf č. 13: inhibiční křivky *Ornithogalum thyrsoides*

5.2 Antioxidační aktivita

Extrakty byly podrobeny testování jejich antioxidační aktivity. Jejich výsledky jsou uvedeny v tabulce (Tab VIII) a grafech (Graf č. 14 a 15).

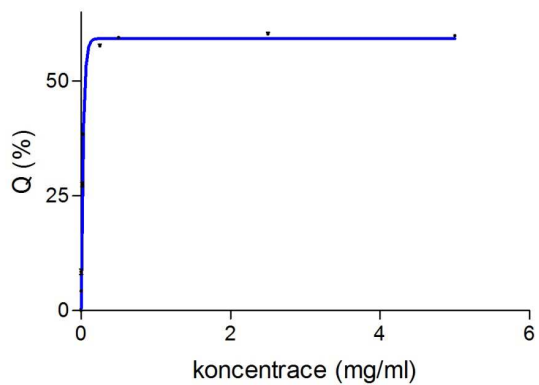
Tabulka VIII Antioxidační aktivity ethanolových extraktů (DPPH test)

Ethanolový extrakt	EC ₅₀ [μM]
<i>Fritillaria meleagris</i>	> 1000
<i>Fritillaria assyriaca</i>	> 1000
<i>Fritillaria imperialis var. lutea</i>	> 1000
<i>Fritillaria thunbergii</i>	> 1000
<i>Fritillaria davisii</i>	> 1000
<i>Fritillaria acmopetala</i>	> 1000
<i>Eucomis bicolor</i>	> 1000
<i>Eucomis comosa</i>	610,06 ± 9,1
<i>Eucomis autumnalis</i>	814,2 ± 10,5
<i>Bulbocodium vernum</i>	> 1000
<i>Brodiaea californica</i>	146,13 ± 3,5
<i>Bessera elegans</i>	56,54 ± 2,3
<i>Ornithogalum thyrsoides</i>	> 1000
<i>Bellevallia romana</i>	> 1000
<i>Gloriosa rothschildiana</i>	> 1000
Kvercetin ^a	11,11 ± 0,25
Trolox ^a	20,45 ± 1,31

^a Referenční látka

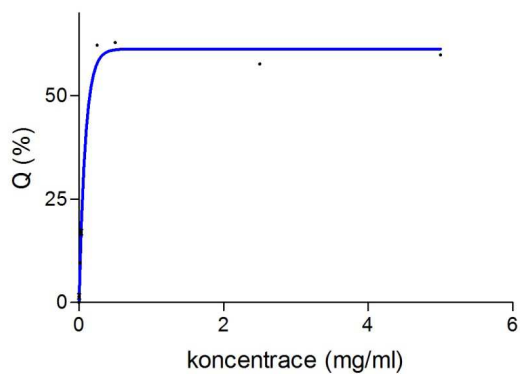
5.2.1 Inhibiční křivka *Bessera Elegans* a *Brodiaea californica*

Bessera elegans



Graf č. 14: antioxodační aktivita – *Bessera elegans*

Brodiaea californica



Graf č. 15: antioxodační aktivita – *Brodiaea californica*

6. ZÁVĚR A DISKUZE

V rámci této diplomové práce byl proveden screening 15 vybraných jednoděložných rostlin na jejich inhibiční aktivitu vůči lidským cholinesterázám (HuAChE a HuBuChE) a na jejich antioxidační aktivitu za účelem vytipování rostliny pro případnou fytochemickou studii. Hodnoty inhibiční aktivity (IC_{50}) vůči lidské erytrocytární acetylcholinesteráze a sérové butyrylcholinesteráze byly stanoveny spektrofotometricky pomocí Ellmanovy metody¹³⁵.

Získané hodnoty pro jednotlivé extrakty jsme porovnávali s těmito standardy – galantaminem, huperzinem A a eserinem (galantamin: $IC_{50, HuAChE} = 1,710 \pm 0,065 \mu M$; $IC_{50, HuBuChE} = 42,30 \pm 1,30 \mu M$, huperzin A: $IC_{50, HuAChE} = 0,033 \pm 0,001$; $IC_{50, HuBuChE} = >1000 \mu M$, eserin: $IC_{50, HuAChE} = 0,063 \pm 0,001 \mu M$; $IC_{50, HuBuChE} = 0,130 \pm 0,004 \mu M$). Všechny alkaloidní extrakty vykázaly nižší inhibiční aktivitu vůči HuAChE než zvolené standardy.

U všech rostlin byly testovány jejich sumární ethanolové extrakty a u rostlin rodu *Fritillaria* jsme dále testovaly i jejich alkaloidní extrakty. Z literatury je známo, že právě rod *Fritillaria* obsahuje steroidní alkaloidy jako hlavní obsahovou látku.

Jak již bylo zmíněno v teoretické části, cibule rodu *Fritillaria* mají v tradiční čínské medicíně spíše antitusické, antiastmatické a expektorační účinky, nicméně především studie na druhu *Fritillaria imperialis* ukázaly také jistý anticholinergní potenciál. Z naměřených alkaloidních extraktů rostlin rodu *Fritillaria* vykázal nejzajímavější inhibiční aktivitu vůči acetylcholinesteráze extrakt z cibulí rostliny *F. imperialis* var. *lutea* ($IC_{50, HuAChE} = 41,54 \pm 1,58 \mu M$; $IC_{50, HuBuChE} = 5,12 \pm 0,37 \mu M$).

Zatímco studie Atta-Ur-Rahmana a kol.⁴³ se zabývala inhibiční aktivitou konkrétních alkaloidů obsažených ve *F. imperialis* vůči AChE a BuChE (jednalo se o impericin, forticin, delavin, persicanidin a imperialin, jejichž podrobné výsledky jsou uvedeny v teoretické části v tabulce III), tato práce poskytuje výsledky obecnějšího charakteru. Cílem nebylo izolovat konkrétní alkaloidy, nýbrž najít vhodnou rostlinu pro další podrobné zkoumání. Obě studie nicméně potvrzují stejný závěr, a to sice že alkaloidy obsažené v druzích *Fritillaria* mají inhibiční účinek vůči AChE i BuChE. Stejně tak je zřejmý silnější inhibiční účinek vůči BuChE než vůči AChE. Tato skutečnost souvisí s faktem, že čím více poznatků věda získává o funkci BuChE, tím stoupá význam látek účinných vůči BuChE v léčbě AD.

Z ethanolových extraktů jsme nejlepší aktivitu vůči HuAChE naměřili u *Fritillaria thunbergii* ($IC_{50, HuAChE} = 135,0 \pm 5,1 \mu M$; $IC_{50, HuBuChE} = 79,56 \pm 3,1 \mu M$) a vůči HuBuChE u *Fritillaria imperialis* ($IC_{50, HuAChE} = >500$; $IC_{50, HuBuChE} = 43,35 \pm 2,63$), další zajímavé výsledky vykázaly především, *Fritillaria meleagris* ($IC_{50, HuAChE} = >500 \mu M$; $IC_{50, HuBuChE} = 53,14 \pm 2,5 \mu M$) a také *Bessera elegans* ($IC_{50, HuAChE} = 325,0 \pm 7,3$; $IC_{50, HuBuChE} = 79,56 \pm 3,0$).

Protože nezanedbatelnou roli v etiologii AD hraje oxidační stres, byly jednotlivé ethanolové extrakty podrobeny testování na antioxidační aktivitu pomocí DPPH testu. Naměřené hodnoty byly porovnány s hodnotami EC₅₀ známých antioxidantů (kvercetin EC₅₀ = 11,11 ± 0,25 μM a trolox EC₅₀ = 20,45 ± 1,31 μM). Velice dobrou antioxidační aktivitu vykazoval především extrakt rostliny *Bessera elegans* (EC₅₀ = 56,54 ± 2,35 μM) a také *Brodiaea californica* (EC₅₀ = 146,13 ± 3,51 μM). Slabou aktivitu pak vykazoval extrakt *Eucomis comosa* (EC₅₀ = 610,06 ± 9,12 μM) a *Eucomis autumnalis* (EC₅₀ = 814,2 ± 10,5 μM). Hodnoty EC₅₀ u ostatních extraktů přesahovaly 1000 μM a můžeme tedy konstatovat, že neprojevily žádné antioxidační schopnosti.

Pokud shrneme všechny výsledky, tak nejzajímavějšími rostlinami pro podrobný fytochemický výzkum jsou *Fritillaria imperialis* var. *lutea*, která vykázala nejlepší inhibiční aktivitu vůči HuAChE a *Fritillaria thunbergii* díky svému dobrému působení vůči oběma formám cholinesterázy.

7. LITERATURA

1. Cunningham AB. (1988) An investigation of herbal medicine trade in Natal / KwaZulu. *Investigational report*, **29**, Institute of of Natural Resources, South Africa
2. Cordell GA. (1995) Changing strategies in natural products chemistry. *Phytochemistry*, **40**, 1585-1612
3. Addae-Mensah I. (1992) Towards a rational scientific basis for herbal medicine – a phytochemists two-decade contribution. *Ghana Universities Press*, Accra
4. Govil JN, Singh VK, Hashmi S. (1993) Medicinal plants: new vistas of reserch (part 2). *Today & Tomorrow's Printers and Publishers*, New Delhi, 377-389
5. Sindiga I, Nyaigotti-Chacha C, Kanunah MP. (1995) Traditional medicine in Africa. *East African Educational*, Nairobi, 16-29
6. Van Wyk B-E, van Oudtshoorn B, Gericke N. (1997) Medicinal plants of South Africa. *Briza*, Pretoria, 8-22
7. Cunnigham AB. (1988) Overexploitation of medicinal plants in Natal/KwaZulu: root causes. *Veld and Flora*, **74**, 85-87
8. Opletal L, Opletalová V. (1999) *Lék a jeho vývoj v dějinách*. 1.vyd. Karolinum, Praha
9. Wimo A, Winblad B, Agüero-Torres H, von Strauss E. (2003) The magnitude of dementia occurence in the world. *Alzheimer Disease and Associated Disorders*, **17**, 63-67
10. Jiráč R. (2008) Diagnostika a terapie Alzheimerovy choroby. *Neurologie pro praxi*, **4**, 224-227.
11. Heinrich M, Teoh HL. (2004) Galanthamine from snowdrop – the development of a modern drug against Alzheimer's disease from local Caucasian knowledge. *Journal of Ethnopharmacology*, **92**, 147-162
12. Jiráč R, Koukolík F. (1998) *Alzheimerova nemoc a další demence*. Praha: Grada Publishing. ISBN: 80-7169-615-3.
13. Holmstedt B. (1972) In plants in the development of modern medicine. *Harvard University Press*, Cambridge, MA, USA, 303-360
14. Julian PL, Píkl J. (1935) Studies in the indole series. V. The complete synthesis of physostigmine (eserine). *Journal of the American Chemical Society*, **57**, 755-757
15. Ghosal S, Bhattacharya K, Mehta R. (1972) Naturally occurring and synthetic β -carbolines as cholinesterase inhibitors
16. Pidrman V. (2007) *Demence*. Praha: Grada Publishing. ISBN 978-80-247-1490-5.
17. Jedlička P, Keller O, et al. *Speciální neurologie*. Praha: Galén, 2005. ISBN 80-7262-312-5.

18. Jiráček R, Koukolík F. *Dementia: Neurobiologie, klinický obraz, terapie*. Praha: Galén, 2004. ISBN 80-7262-268-4.
19. Jiráček R. (2008) Farmakoterapie demencí. *Praktické lékařství*, **6**, 286-290.
20. Giacobini E. (2004) Cholinesterase inhibitors: new role and therapeutic alternatives. *Pharmacological Research*, **50**, 433-440.
21. Bouček J, Pidrman V. *Psychofarmaka v medicíně*. Praha: Grada Publishing, 2009. ISBN 80-247-1136-2.
22. Pokorna L, Revilla A, Havel J, et al. (1999) Capillary zone electrophoresis determination of galanthamine in biological fluids and pharmaceutical preparations: experimental design and artificial neural network optimization. *Electrophoresis*, **20**, 1993-1997.
23. Fulton B, Benfield P. (1996) Galanthamine. *Drugs Aging*, **9**, 60-65.
24. Skolnick AA. (1997) Old Chinese Herbal Medicine Used for Fever Yields Possible New Alzheimer Disease Therapy. *The Journal of American Medical Association*, **277**, 776.
25. Wang YE, Yue DX, Tang XC. (1986) Anti-cholinesterase activity of huperzine A. *Acta Pharmacologica Sinica*, **7**, 110-113.
26. Bai DL, Tang XC, He XC. (2000) Huperzine A, A Potential Therapeutic Agent for Treatment of Alzheimer's Disease. *Current Medicinal Chemistry*, **7**, 355-374.
27. Jahodář L. (2010) Farmakobotanika – semenné rostliny. Praha: Karolinum. ISBN 9788024617916.
28. Chen XQ. (1980) Flora of China. 14th ed. Chinese Scientific Press, Beijing
29. Shang Z, Liu X. (1995) Investigation on the various species of bulb of fritillary and its application. *Chinese Journal of Medical history*, **25**, 38-42.
30. Lin G, Li P, Li SL, Chan SW. (2001) Chromatographic analysis of *Fritillaria* isosteroidal alkaloids, the active ingredients of Beimu, the antitussive traditional Chinese medicinal herb. *Journal of Chromatography A*, **935**, 321-338.
31. Li HJ, Jiang Y, Li P. (2006) Chemistry, bioactivity and geographical diversity of steroidal alkaloids from the Liliaceae family. *Natural Products Report*, **23**, 735-752.
32. Zhou RH, Duan JA. (2005) Plant Chemotaxonomy. Shanghai Science and Technology Press, 1110-1129.
33. Ori K, Mimaki Y, Sashida Y, Nikaido T, Ohmoto T. (1992) Steroidal alkaloids from the bulbs of *Fritillaria persica*. *Phytochemistry*, **31**, 4337-4341.

34. Kaneko K, Tanaka M, Haruki K, Naruse N, Mitsuhashi M. (1980) Fritillarizine, a New *Fritillaria* Alkaloid isolated from the Aerial Part of Mature *Fritillaria verticillata*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, **28**, 3711-3713.
35. Li QH, Wu ZH, Zhang LL, Shao L. (1988) *Acta Pharmacologica Sinica*, **23**, 415.
36. Yu SC, Xiao PG. (1990) *Zhongcaoyao*, 1990, **21**, 2.
37. Kaneko K, Katsahura T, Kitamura Y, Nishizawa M, Chen YP, Hsu HY. (1988) New Steroidal Alkaloids from the Chinese Herb Drug, "Beimu". *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, **36**, 4700-4705.
38. Kaneko K, Nakaoka U, Tanaka M, Tanaka Ym Yoshida N, Mitsuhashi H. (1981) Two steroidal alkaloids, hapepunine and anrakorinine, from the mature *Fritillaria camtschatcensis*. *Phytochemistry*, **20**,
39. Kaneko K, Katsahura T, Mitsuhashi H. (1986) Chuanbeinone, a novel D/E *cis*-(22R,25S)-5 α -cevanine alkaloid from chinese herbal drug, chuan-bei-mu. *Tetrahedron Letters*, **27**, 2387-2390.
40. Oh H, Kang DG, Lee SY, Li YM, Lee HS. (2003) Angiotensin Converting Enzym (ACE) Inhibitory Alkaloids from *Fritillaria ussuriensis*. *Planta Medica*, **69**, 564-565.
41. Jiang Y, Li HJ, Li P, Cai ZH, Ye WC. (2005) Steroidal alkaloids from the bulbs of *Fritillaria pugiensis*. *Journal of Natural Products*, **68**, 264-267.
42. Zhang YH, Ruan HL, Pi HF, Cai JY, Zeng FB, Zhao W, Wu JZ. (2005) Non-alkaloids in *Fritillaria ebeiensis*. *Zhongcaoyao*, **36**, 1205. 2006:548654.
43. Atta-ur-Rahman, Farooq A, Choudhary MI, Gilani AH, Shaheen F, Ali RA, Noor-e-ain F, Sener B. (1994) A New Anticholinergic Alkaloid from *Fritillaria imperialis* of Turkish Origin. *Planta Medica*, **60**, 377-379.
44. Atta-ur.Rahman, Akhtar MN, Choudhary MI, Tsuda Y, Sener B, Khalid A, Parvez M. (2002) New Steroidal alkaloids from *Fritillaria imperialis* and Their Cholinesterase Inhibiting Activities. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, **50**, 1013-1016.
45. Gilani AH, Shaheen F, Christopoulos A, Mitchelson F. (1997) Interaction of ebeinone, an alkaloid from *Fritillaria imperialis*, at two muscarinic acetylcholine receptor subtype. *Life Science*, **60**, 535-544.
46. Bailey LH. (1966) Manual of Cultivated Plants. MacMillan Company, New York, 218-219.
47. Perry LM. (1980) Medicinal Plants of East and South East Asia. *MIT Press*, Cambridge, MA, 236-237.

48. Atta-ur-Rahman, Choudhary MI, Farooq A, Anjum S, Baumgold J, Sener B. (1998) Structure-activity relationships of imperialine derivatives and their anticholinergic activity. *Planta Medica*, **64**, 172-174.
49. http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Gc30_fritillaria_imperialis.jpg?uselang=cs.
Staženo dne 2. 4. 2013.
50. The Committee of Chinese Materia Medica. Chinese Materia Medica. Shanghai: *Shanghai Scintific and Technological Press*. (1999).
51. Kitamura Y, Nishizawa M, Kaneko K, Ikura M, Hikichi K, Shiro M, et al. (1989) New steroidal alkaloids having a novel seven ring skeleton from *Fritillaria ussuriensis* Maxim. *Tetrahedron*, **45**, 5755-5766.
52. Kitamura Y, Nishizawa M, Kaneko K. (1989) Novel steroidal alkaloids from *Fritillaria ussuriensis*. *Tennen Yuki Kagobutsu Toronkai Koen Yoshishu*, **31**, 562-569. Chemical Abstract Nr.1990:195195.
53. Xu DM, He CH, Wang SQ, Huang EX, Xu ML, Wen XG. (1990) Structure of pingbeimine C. *Acta Pharmaceutica Sinica*, **25**, 127-130.
54. Li SL, Li P, Lin G, Zhou GH, Ren YJ, Que NN. (1999) Existence of 5 α -cevenine isosteroidal alkaloids in bulbs of *Fritillaria L.* *Acta Pharmaceutica Sinica*, **34**, 842-847.
55. Lin BQ, Ji H, Li P, Fang W, Jiang Y. (2006) Inhibitors of acetylcholine esterase *in vitro* screening of steroidal alkaloids from *Fritillaria* species. *Planta Medica*, **72**, 814-818.
56. Yang ZD, Duan DZ. (2012) A new alkaloid from *Fritillarian ussuriensis* Maxim. *Fitoterapia*, **83**, 137-141.
57. Mo ZJ, Tang XY, Sun Z, Li W. (1998) Comparison of Pharmacological Effects Between Cultispecies Sichuan Fritillary Bulb (*F. wabueasis*, *F. mellea*) and Wild Sichuan Fritillary Bulb (*F. unibracteata*). *China Journal of Chinese Materia Medica*, **23**, 14-16.
58. Yan XY. (2005) Effects of Ethanol Extract of Three Kinds of Bulb *Fritillariae Cirrhosae* on Guinea Pigs with Allergic Asthma. *Sichuan University*, Chengdu.
59. Chen MH. (2008) Studies on *Fritillaria Cirrhosa* D. Don and its Effects of Antitussive and Antiasthma. *Qinghai Normal University*, Xining.
60. Zhang YH, Ruan HL, Zeng FB, Pi HF, Zhao W, Wu JZ. (2003) Effective part screening on antitussive, expectorant and antiasthmatic activities of *Fritillaria hupehensis*. *Zhongcaoyao*, **34**, 1016-1018. Chemical Abstract Nr. 2004:462311.

61. Zhou Y, Ji H, Li P, Jiang Y. (2003) Antimuscarinic function of five alkaloids from *Fritillaria* on guinea-pig tracheal strips. *Zhongguo Yaoke Daxue Xuebao*, **34**, 58-60. Chemical Abstract Nr.2004:151010.
62. Lin BQ, Ji H, Li P, Jiang Y, Fang W. (2006) Selective antagonism activity of alkaloids from bulbs *Fritillariae* at muscarinic receptors: functional studies. *Journal of Ethnopharmacology*, **551**, 125-130.
63. <http://www.pacificbulbsociety.org/pbswiki/index.php/MiscellaneousFritillaria>. Staženo dne 2. 4. 2013.
64. Wang D, Wang S, Chen X, Xu X, Zhu J, Nie L, Long X. (2012) Antitussive, expectorant and anti-inflammatory activities of four alkaloids isolated from Bulbus of *Fritillaria wabuensis*. *Journal of Ethnopharmacology*, **139**, 189-193.
65. Tianzhi W, Leilei D, Shu W. (2001) Advances in natural pharmaceutical products of *Fritillaria cirrhosa*. *Huaxi Yaoxue Zazhi*, **16**, 200-203. Chemical Abstract Nr. 2001:606919.
66. Zhonghong Y, Yang L, Weigong D, Zenai C. (1999) Studies on chemical constituents of *Fritillaria cirrhosa* D. Don. *Shanghai Dieer Yike Daxue Xuebao*, **19**, 487-489. Chemical Abstract Nr.1999:804637.
67. Ko K, Takao K, Hiroshi M, Yuh PC, Hong YH, Motoo S. (1985) Isolation and structure elucidation of new alkaloids from *Fritillaria delavayi*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, **33**, 2614-2717.
68. Ko K, Takao K, Hiroshi M, Yuh PC, Hong YH, Motoo S. (1986) Chuanbeinone, a novel D/E cis-(22R,22S)-5- α -cevanine alkaloid from the chinese herbal drug, Chuan-Bei-Mu. *Tetrahedron Letter*, **27**, 387-390.
69. Ko K, Takao K, Yukie K, Makoto N, Yuh PC, Hong YH. (1988) New steroidal alkaloids from the Chinese herb drug, „Bei-Mu“. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, **36**, 4700-4705.
70. Shakirov R, Nuriddinov RN, Yunusov SY. (1963) Study on alkaloids of *Petilium eduardi*. *Dolkady Akademii Nauk UzSSR*, **20**, 23-26. Chemical Abstract Nr. 1964:75519.
71. Shakirov R, Nabiev A, Yunusov SY. (1978) Structure of edpetisidine. *Khimiya Prirodnikh Soedinenii*, **3**, 416-417. Chemical Abstract Nr.1966:23341.
72. Shakirov R, Nuriddinov RN, Yunusov SY. (1965) Alkaloids of bulbs of *Petilium eduardi*. *Khimiya Prirodnikh Soedinenii*, **6**, 429. Chemical Abstract Nr.1966:68052.

73. Shakirov R, Nuriddinov RN, Yunusov SY. (1965) Alkaloids of *Petilium eduardi*. Structure of edpetiline. *Uzbekskii Khimicheskii Zhurnal*, **9**, 38-42. Chemical Abstract Nr.1965:416992.
74. Shakirova UT, Shakirov R. (1997) Edpetinosine a new alkaloid from *Petilium eduardi* bulbs. *Chemistry of Natural Compounds*, **33**, 476-478.
75. Paul L, Boit HG. (1958) *Fritillaria* alkaloids. III. Minor alkaloids of *Fritillaria imperialis*. *Chemische Berichte*, **91**, 1968-1970.
76. Liu CC, Lu JY, Ho FC, Chu TC, Huang WK, Chu TT, Hwang WK. (1961) *Fritillaria* alkaloids. XIII. The chemistry of sipemine (imperialin). *Huaxue Xuebao*, **27**, 97-105. Chemical Abstract Nr.1963:475486.
77. Masterova I, Kettmann V, Majer J, Tomako J. (1982) Isobaimonidine, a new alkaloid from *Fritillaria imperialis* L. *Archiv Der Pharmazie*, **315**, 157-164.
78. Kettmann V, Pavelcik F, Masterova I, Tomako J. (1985) Isobaimonidine, C₂₇H₄₅NO₃: a new alkaloid from *Fritillaria imperialis* L. *Acta Crystallographica Section C: Crystal Structure Communications*, **C41**, 392-394.
79. Liu HN, Li F, Luo YM, Zhu WF. (2006) Two new isosteroid alkaloids from *Fritillaria monatha* Migo (III). *Chinese Chemical Letters*, **17**, 631-634.
80. Liu HN, Li F, Luo YM, Zhu WF. (2007) Two novel isosteroidal alkaloids from *Fritillaria monatha*. *Journal of Asian Natural Products Reserch*, **9**, 563-567.
81. Hu S, Huang Y, Ma G, Zhang J. (1989) Crystal structure of a new steroidal alkaloid from *Fritillaria* C₂₇H₄₃NO₂. H₂O. *Jiegou Huaxue*, **8**, 119-123. 1990:459684.
82. Jiang Y, Li P. (2005) Determination of verticine and verticinone in Bulbus *Fritillariae Thunbergii* by HPLC-ELSD. *Zhongguo Yaoxue Zazhi*, **40**, 1257-1259. 2006:663212.
83. Jizhou W, Tang M, Wang R. (1991) Studies on chemical constituents of *Fritillaria* in Hubei. XIII. Isolation and structure elucidation of hupehemonoside. *Yaoxue Xuebao*, **26**, 829-835. 1992:588213.
84. Xue Y, Gu H. (2005) Determination of peimine and peiminine in *Fritillaria thunbergii* by HPLC-ELSD. *Yaoxue Xuebao*, **40**, 550-552. Chemical Abstract Nr. 2006:893469.
85. Yan M, Jin X, Xu D. (1994) Chemical constituents of the stems and leaves of Thunberg Fritillar (*Fritillaria thunbergii*). *Zhongcaoyao*, **25**, 344-346. Chemical Abstract Nr. 1995:120472.
86. Zhang J, Lao A, Chen Q, Xu R. (1993) Chemical constituents of dongbeimu (*Fritillaria thunbergii* var. *chekiangensis*). *Zhongcaoyao*, **24**, 341-342. Chemical Abstract Nr. 1993:645579.

87. Zhang J, Lao A, Xu R. (1993) Chemical constituents of fresh bulbs of *Fritillaria thunbergii* Miq. *Zhongguo Zhongyao Zazhi*, **18**, 354-355. Chemical Abstract Nr. 1993:599585.
88. Zhang J, Lao A, Xu R. (1993) Chemical constituents of *Fritillaria thunbergii* Miq. *Zhiwu Xuebao*. **35**, 238-241. Chemical Abstract Nr.1994:129485.
89. Zhang JX, Lao AN, Huang HZ, Ma GE, Xu RS. (1992) Chemical constituents of *Fritillaria thunbergii* Miq. III. Isolation and identification of zheibenone. *Yaoxue Xuebao*, **27**, 472-475. Chemical Abstract Nr.1993:45555.
90. Kitajima J, Komori T, Kawasaki T, Schulten HR. (1982) Basic steroid saponins from aerial parts of *Fritillaria thunbergii*. *Phytochemistry*, **21**, 187-192.
91. Kitajima J, Komori T, Kawasaki T. (1982) Studies on the constituents of the crude drug "*Fritillariae Bulbus*". III. On the diterpenoid constituents of the crude drug *Fritillariae thunbergii* Miq. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, **30**, 3912-3921.
92. Kitajima J, Komori T, Kawasaki T. (1982) Studies on the constituents of crude drug "*Fritillariae Bulbus*". New sterol glycosides from aerial parts of *Fritillaria thunbergii* Miq. *Yakugaku Zasshi*, **102**, 1009-1015. Chemical Abstract Nr.1983:122786.
93. Kitajima J, Noda N, Ida Y, Komori T, Kawasaki T. (1982) Studies on the constituents of the crude drug "*Fritillariae Bulbus*". IV. On the diterpenoid constituents of the crude drug "*Fritillariae Bulbus*". *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, **30**, 3922-3931.
94. Jin XQ, Xu DM, Xu YJ, Cui DB, Xiao YW, Tian ZY, Lu Y, Zheng QT. (1993) The structure identification of zhepiresionol. *Acta Pharmaceutica Sinica*, **28**, 212-215.
95. Cui D, Yan M, Wong S, Zhang X, Xu D. (1995) Chemical constituents of stems and leaves of *Fritillaria ussuriensis* Maxim. *China Journal of Chinese Materia Medica*, **20**, 298-320.
96. Kitamura Y, Nishizawa M, Kaneko K, Shiro M, Chen YP, Hsu HY. (1989) New steroidal alkaloid from *Fritillaria ussuriensis* Maxim. Pingbeinone and heilonine. *Tetrahedron*, **45**, 7281-7286.
97. Kitamura Y, Nishizawa M, Kaneko K, Shiro M, Chen YP, Hsu HY. (1989) Pingbeinone, a novel steroidal alkaloid having C-18 nor cevane skeleton from *Fritillaria ussuriensis* Maxim. *Tetrahedron Letters*, **30**, 4981-4982.
98. Kitamura Y, Nishizawa M, Kaneko K. (1989) Novel steroidal alkaloid in *Fritillaria ussuriensis*. *Tennen Yuki Kagobutsu Toronkai Koen Yoshishu*, **31**, 562-569. Chemical Abstract Nr.1990:195195.

99. Wang S, Huang E, Wen X, Wu X, Xu D. (1991) Steroid alkaloids from stems and leaves of *Fritillaria ussuriensis* Maxim. *Zhongguo Zhongyao Zazhi*, **16**, 554-555. Chemical Abstract Nr.1992:102687.
100. Xu DM. (1986) Alkaloid constituents in the leaves and stems of *Fritillaria ussuriensis*. *Zhong Yao Tong Bao*, **11**, 40-41. Chemical Abstract Nr.1987:187903.
101. Xu D, Zhang B, Hung W, Qi Y, Ma J. (1982) Isolation and identification of sipeimine-3-D-glucoside. *Zhongcaoyao*, **13**, 337-338. Chemical Abstract Nr. 1983:14329.
102. Xu D, Zhang B, Li H, Xu M. (1982) Isolation and identification of alkaloid from *Fritillaria ussuriensis* Maxim. *Yaoxue Xuebao*, **17**, 355-359. Chemical Abstract Nr.1982:507068.
103. Xu DM, Wang SQ, Huang EX, Xu ML, Wen XG. (1989) Structure of pingbeidinoside, an alkaloid isolated from the stems and leaves of *Fritillaria ussuriensis* Maxim. *Yaoxue Xuebao*, **24**, 668-672. Chemical Abstract Nr.1990:955007.
104. Xu DM, Wang SQ, Huang EX, Xu ML, Zhang YX, Wen XG. (1988) Isolation and identification of pingpeimine B. *Yaoxue Xuebao*, **23**, 902-905. Chemical Abstract Nr. 1989:474773.
105. Xu D, Xu M, Wang S, Hung E, Wen X, Shoji N. (1990) Two new steroidal alkaloids from *Fritillaria ussuriensis*. *Journal of Natural Products*, **53**, 549-552.
106. Xu DM, He CH, Wang SQ, Huang EX, Xu ML, Wen XG. (1990) Structure of pingbeimine C. *Acta Pharmaceutica Sinica*, **25**, 127-130.
107. Liu Z, Wang S. (2005) Determination of imperialine in cultivated *Fritillaria wabuensis* by HPLC-ELSD. *Huaxi Yaoxue Zazhi*, **20**, 257-258. Chemical Abstract Nr. 2006:639502.
108. Su F, Wang H. (1999) 2D NMR studies on an alkaloid from *Fritillaria wabuensis*. *Bopoxue Zazhi*, **16**, 353-358. Chemical Abstract Nr.1999:583899.
109. Wang H, Zhang A, Tang X, Zheng Y, Yi X, Yu K. (1996) Isolation and structure of alkaloids from *Bulbus Fritillaria wabuensis* S, Y Tang et S. C. Yueh. *Huaxi Yike Daxue Xuebao*, **27**, 100-105. Chemical Abstract Nr.1996:432825.
110. Zhang AJ, Wang HY, Tang XY, Zheng Y, Yi XH, Yu KB. (1998) Isolation and structure elucidation of alkaloids from the bulb of *Fritillaria wabuensis*. *Planta Medica*, **64**, 448-450.
111. Baker. (1897) *Eucomis L* Herit. *Flora Capensis VI*, 475-478.

112. Pienaar K. (1984) The South African what flower is that?. *Struik Publishers*, Cape Town
113. Compton J. (1990) *Eucomis* L. Heritier. *Plantsman*, **12**, 129-139.
114. Perry P. (1985) The restructuring of the family Liliaceae. *Veld and Flora*, **71**, 66-68.
115. Bryan JE. (1989) Bulbs, vol. I. A-H, *Timber Press*, Portland, OR, 172-173.
116. De Hertogh AA, Le Nard M. (1993) The physiology of flower bulbs. *Elsevier Science*, **24**, 57, 752-753.
117. Hutchings A, Scott AH, Lewis G, Cunningham AB. (1996) Zulu medicinal plants. An inventory. *University of Natal Press*, South Africa, 42-43.
118. Mander M, Mander J, Crouch N, McKean S, Nichols G. (1995) Catchment Action. Growing and knowing muti plants. ShareNet/Institute of Natural Resources, University of Natal, Pietermaritzburg, 11
119. Trauseld WR. (1969) Wildflowers of the Natal Drakesberg. Purnell, Cape Town, 23-25.
120. Du Plessis N, Duncan G. (1989) Bulbous Plants of Southern Africa: A Guide to their Cultivation and Propagation. *Tafelberg*, Cape Town, **75**, 192.
121. Hutchings A. (1989) A survey and analysis of traditional medicinal plants as used by Zulu, Xhosa and Sotho. *Bothalia*, **19**, 111-123.
122. Roberts M. (1990) Indigeneous Healing Plants. *Creda Press*, Cape Town, 251.
123. <http://awaytogarden.com/pineapple-lily-season-easy-eucomis-bicolor>. Staženo dne 2. 4. 2013
124. Adinolfi M, Barone G, Belardini M, Lanzetta R, Laonigro G, Parrilli M. (1985) The 3-benzyl-4-chromanones from *Muscari comosum*. *Phytochemistry*, **24**, 624-626.
125. Heller W, Andermatt P, Schaad WA, Tamm C. (1976) Homoisoflavonone. IV. Neue inhaltsstoffe der eucomin-reihe von *Eucomis bicolor*. *Helvetica Chimica Acta*, **59**, 2048-2058.
126. Heller W, Tamm C. (1978) 5,7-Dihydroxy-8-methoxy-chroman-4-on aus dem Zwiebelwachs von *Eucomis comosa*. *Helvetica Chimica Acta*, **61**, 1257-1261.
127. Koorbanally NA, Crouch NR, Harilal A, Pillay B, Mulholland DA. (2006) Coincident isolation of a novel homoisoflavonone from *Resnova humifusa* and *Eucomis montana* (Hyacinthaceae: Hyacinthoidae). *Biochemical Systematics and Ecology*, **34**, 114-118.
128. Ziegler R, Tamm C. (1976) Isolation and structure of eucosterol and 16 β -hydroxyeucosterol. Two novel spirocyclic nortriterpenes and a new 24-nor-5'-chola-

- 8,16-dien-23-oic acid from the bulbs of several *Eucomis* species. *Helvetica Chimica Acta*, **59**, 1997-2001.
129. Silayo A, Ngadjui BT, Abegaz BM. (1999) Homoisoflavonoids and stilbenes from the bulbs of *Scilla nervosa* subsp. *rigidifolia*. *Phytochemistry*, **52**, 947-955.
130. Sidwell WTL, Fritz H, Tamm C. (1971) Autumnariol and autumnariniol, zwei neue dibenzo- α -pyrone aus *Eucomis autumnalis* Graeb. Nachweis einer fernklopfung über sechs bindungen in den magnetischen protonresonanz-spektren. *Helvetica Chimica Acta*, **54**, 207-215.
131. Della Rogia R, Del Negro P, Tubaro A, Barone G, Parilli M. (1989) Homoisoflavonones as anti-inflammatory principles. *Planta Medica*, **55**, 587-588.
132. Amschler G, Frahm AW, Hatzelmann A, Kilian U, Muller-Doblies D, Muller-Doblies U. (1996) Spirocyclic nortriterpenes from the bulbs of *Velthemia viridifolia*. *Planta Medica*, **62**, 534-539
133. Heller W, Tamm C. (1981) Homoisoflavanones and biogenetically related compounds. *Fortschritte der Chemie Organischer Naturstoffe*, **40**, 106-152.
134. Steck TL, Kant JA. (1974) Preparation of impermeable ghost and inside-out vesicles from human erythrocyte membranes. *Methods of Enzymology*, **31**, 172.
135. Ellman GL, Courtney KD, Andres V Jr., Feather-Stone RM. (1961) A new and rapid colometric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, **7**, 88.

8. SEZNAM ZKRATEK

AD	Alzheimerova choroba
AChE	acetylcholinesteráza
APP	amyloidní prekurzorový protein
A-549	linie rakovinných plicních buněk
BFC	cibule <i>Fritillaria cirrhosae</i>
BFW	cibule <i>Fritillaria wabuensis</i>
BGC-823	linie rakovinných jaterních buněk
BuChE	butyrylcholinesteráza
CMP	cévní mozková příhoda
CNS	centrální nervová soustava
CT	počítačová tomografie
DPPH	2,2'-bifenyl-1-pikrylhydrazyl
EC	účinná koncentrace
GABA	kyselina γ -aminomáselná
HL-60	linie promyelotických leukemických buněk
HuAChE	lidská acetylcholinesteráza
HuBuChE	lidská butyrylcholinesteráza
IC	inhibiční koncentrace
ICHE	inhibitory cholinesterázy
IU	mezinárodní jednotky
MAO-B	monoaminoxidáza B
MR	magnetická rezonance
PET	pozitronová emisní tomografie
SPECT	jednofotonová emisní výpočetní tomografie
NMDA	N-methyl-D-aspartát