

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

RIGORÓZNÍ P R Á C E

Biologická aktivita obsahových látek rostlin XVII.

Vliv alkaloidů z různých rostlinných taxonů na acetylcholinesterázu

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

Školitel: Doc. RNDr. Lubomír Opletal, CSc.

Hradec Králové, 2008

Mgr. Jana Nováková

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

R I G O R O U S T H E S I S

Biological activity of plant metabolites XVII.

Influence of alkaloids from several taxons of plants on acetylcholinesterase

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

Supervisor: Doc. RNDr. Lubomír Opletal, CSc.

Hradec Králové, 2008

Mgr. Jana Nováková

Na tom to místě bych velmi ráda poděkovala všem, kteří mi s vypracováním rigorózní práce pomohli. Velké díky patří spolupracovníci Mgr. Lucii Řepové. Dále je třeba zmínit odbornou pomoc Mgr. Daniela Juna, PhD. Ovšem největší poděkování patří vedoucímu mé rigorózní práce panu **Doc. RNDr. Lubomíru Opletalovi, CSc.**, bez jehož odborný znalostí, cenných rad, zkušeností a vstřícnosti by tato práce vůbec nevznikla.

Obsah

1. ÚVOD	6
2. CÍL PRÁCE.....	9
3. TEORETICKÁ ČÁST	11
3.1 DEMENCE	12
3.2 ALZHEIMEROVA DEMENCE	13
3.2.1 Terapie.....	15
3.3 SLEDOVANÉ TAXONY	21
3.3.1 Laurus nobilis L.....	21
3.3.2 Buxus sempervirens L.	23
3.3.3 Lycopodium clavatum L.	26
3.3.3.1 Systematika	26
3.3.3.2 Botanický popis.....	26
3.3.3.3 Obsahové látky	27
3.3.3.4 Využití rostliny v praxi.....	28
3.3.3.5 Farmakologické účinky	28
3.3.4 Nelumbo nucifera Gaertn.	28
3.3.4.1 Systematika	29
3.3.4.2 Botanický popis.....	29
3.3.4.3 Obsahové látky	29
3.3.4.4 Využití rostliny v praxi.....	30
3.3.4.5 Farmakologické účinky	30
3.3.5 Fritillaria cirrhosa L., Fritillaria thunbergii L.....	31
3.3.5.1 Systematika	31
3.3.5.2 Botanický popis.....	31
3.3.5.3 Obsahové látky	32
3.3.5.4 Využití rostliny v praxi.....	33
3.3.5.5 Farmakologické účinky	33
3.3.6 Stemona ssp.	34
3.3.6.1 Systematika	34
3.3.6.2 Botanický popis.....	34
3.3.6.3 Obsahové látky	34
3.3.6.4 Využití rostliny v praxi	36
3.3.6.5 Farmakologické účinky	36
3.3.7 Stephania tetrandra S. Moore	36
3.3.7.1 Systematika	36
3.3.7.2 Botanický popis.....	37
3.3.7.3 Obsahové látky	37
3.3.7.4 Využití rostliny v praxi.....	38
3.3.7.5 Farmakologické účinky	38
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	39
4.1 Všeobecné postupy	40
4.1.1 Úprava rostlinného materiálu	40
4.1.2 Úprava rozpouštědel destilací	40
4.1.3 Digesce	40
4.1.4 Odpařování	40
4.1.5 Tenkovrstvá chromatografie (TLC)	40
4.2 Potřeby.....	41

4.2.1	Rozpouštědla	41
4.2.2	Chemikálie.....	41
4.2.3	Detekční činidla.....	41
4.2.4	Vyvíjecí soustavy	42
4.2.5	Chromatografické adsorbenty	42
4.3	Příprava sumárních extraktů.....	42
4.3.1	Materiál	42
4.3.2	Extrakce drogy a zpracování extraktu	43
4.3.3	Bioautografická metoda [92].....	43
5.	VÝSLEDKY	45
5.1	Detekce alkaloidů Dragendorffovým činidlem (D1) v neutrální vyvíjecí soustavě (S1)	46
5.2	Detekce alkaloidů bioautografickou metodou v neutrální vyvíjecí soustavě (S1)	47
6.	DISKUSE	48
7.	ABSTRAKT	56
8.	ABSTRACT	58
9.	LITERATURA	61

1. ÚVOD

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

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

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

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

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

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

Nejpostiženějším neuromediátorovým systémem je u Alzheimerovy choroby acetylcholinergní systém. Tato skutečnost vedla k hledání látek působících v této oblasti, které by v budoucnu mohly být použity pro farmakoterapii této choroby. Velmi důležitými zdroji účinných látek jsou zdroje přírodní. Potenciálními inhibitory acetylcholinesterázy (AChE) mohou být některé alkaloidy rostlin používaných v klasické čínské medicíně. Moje rigorózní práce je příspěvkem k řešení tohoto problému [2].

Při studiu látek, které by mohly být využity jako potenciální léčiva především Alzheimerovy choroby, jsou sledovány také přírodní látky, hlavně sekundární metabolity rostlin a z nich přicházejí v úvahu alkaloidy. Z etnofarmakologických zkušeností řady geografických oblastí (především neevropských) mohou být zdrojem tohoto studia některé taxony, které však mohou vykazat určitou toxicitu, a proto je potřebné věnovat jim pozornost nejen z hlediska terapeutického, ale i primárně toxikologického. Látky, které jsou v *in vitro* pokusech zajímavé z hlediska inhibice acetyl- a butyrylcholinesterázy (BuChE), ovlivňují však negativním způsobem jiné enzymové systémy nebo tkáně, jsou z hlediska praktického použití bezvýznamné [2].

Studium alkaloidních drog především z asijských oblastí, které jsou v této práci uvedeny, tvoří první část zájmu o uvedený typ látek; pokud bude některá z látek aktivní, bude jí věnována především toxikologická pozornost [2].

2. CÍL PRÁCE

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

1. snažit se propracovat metodu pro hodnocení inhibice acetylcholinesterázy alkaloidních extraktů z různých rostlin, využívaných především v tradiční čínské medicíně, pomocí tenkovrstvé chromatografie,
2. porovnat je z hlediska biologického účinku se standardy (fysostigminem a galanthaminem),
3. provést tento základní screening u 9 morfologických částí rostlin: list *Laurus nobilis* L., větvičky a list *Buxus sempervirens* L., nať *Lycopodium clavatum* L., tyčinky a oddenek *Nelumbo nucifera* Gaertn., hlíza *Fritillaria thunbergii* L., hlíza *Fritillaria cirrhosa* L., kořen *Stemona* ssp. a kořen *Stephania tetrandra* S. Moore.

3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1 DEMENCE

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

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

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

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

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

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

3.2 ALZHEIMEROVA DEMENCE

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

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

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

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

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

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

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

Mechanismem poškozujícím mozkovou tkáň v průběhu vývoje ACH je i zánětlivá odpověď. V průběhu onemocnění se prokazuje abnormální ukládání složek komplementu, reaktantů akutní fáze, různých cytokinů a vyšší aktivita cyklooxygenázy [3].

3.2.1 Terapie

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

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

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

3.2.1.1 Terapie kognitivních poruch

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

receptory bývají u ACH zachovány. Po uvolnění z vazby na receptory je acetylcholin odbouráván enzymy acetylcholinesterázami a u Alzheimerovy choroby i butyrylcholinesterázami. Acetylcholinesterázy mají několik forem. V mozku zdravého člověka převládá tetramerní forma G4 a pouze minoritní je monomerní forma G1. U ACH roste výrazně podíl formy G1 a klesá podíl G4. Navíc u ACH se uplatňuje další enzym, který je za normálních podmínek zcela minoritní – butyrylcholinesteráza. Ta je novotvořena aktivovanými gliovými elementy v oblasti alzheimerovských plaků a podílí se na odbourávání acetylcholinu [3, 5].

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

K látkám ovlivňujícím cholinergní systém patří:

- *prekurzory tvorby acetylcholinu* - acetylcholin má velmi krátký poločas, a proto je nepoužitelný. Cholin velmi špatně prochází hematoencefalickou bariérou, lecitin pomalu uvolňuje cholin (výsledky klinických studií byly neuspokojivé). Lepší výsledky byly získány při použití cholin-alfoscerátu (Gliatilin). Zkoušeny jsou také fosfatidylserin a fosfatidylinositol [3];
- *inhibitory cholinesteráz* - užití inhibitorů mozkových cholinesteráz je nejužívanější postup v terapii ACH, především lehkých až středních forem. U této choroby je porušena především presynaptická část acetylcholinergního neuronu, je sníženo uvolňování acetylcholinu z presynaptického zakončení [6].
Inhibitory cholinesteráz zablokují nadměrné odbourávání acetylcholinu, udržují molekuly acetylcholinu ve stavu, kdy jsou schopné navázat se na své pre- i postsynaptické receptory. Některé inhibitory inhibují pouze

acetylcholinesterázy, jiné odbourávají kromě toho i butyrylcholinesterázu. Od centrálních inhibitorů esteráz je očekáváno, že budou dobře procházet přes hematoencefalickou bariéru, že budou specificky inhibovat mozkové, nikoliv periferní formy acetylcholinesteráz, a že budou dobře tolerovány. Mezi další požadavky na inhibitory AChE patří i přítomnost aminu v molekule, který díky pH prostředí získává kladný náboj, dále by měla molekula obsahovat část schopnou tvořit vodíkové vazby s asparaginovou doménou receptoru a malou skupinu, která se váže k hydrofobní části receptoru [6, 7].

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

Inhibitory acetylcholinesteráz představují nejednotnou chemickou skupinu. Patří sem:

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

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

- terpeny a další sekundární metabolity – etanolové extrakty a silice některých druhů taxonů *Salvia* (*S. officinalis* L., *S. lavandulaefolia* Vahl.) byly zkoušeny na antiacetylcholinesterázovou aktivitu. Tato aktivita byla dokázána již v poměrně nízkých koncentracích. Za tento účinek jsou zodpovědné především cyklické terpeny 1,8–cineol a α -pinen, účinnější je však silice než jednotlivé izolované látky. Farmakologicky aktivní při léčbě mozkových cévních onemocnění či při dysfunkci neuropeptidů, významných u neurodegenerativních chorob, jsou

přírodní látky kořene *S. miltiorrhiza* Bung. Inhibiční účinek na AChE je zprostředkován diterpeny. Další rostliny, které zlepšují poznávací funkce jsou *Melissa officinalis* L. (silice získané z listu) a *Origanum majorana* L. (účinnou složkou je triterpenová kyselina ursolová).

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

- *přímí muskarinová a nikotinová antagonisté* - tato léčebná strategie je fázi klinického zkoušení. Účinek se očekává např. u lobelinu z *Lobelia inflata* L. [3, 7];
- *látky ovlivňující acetylcholinergní systém pomocí jiných transmitterových systémů* - jsou hledány látky působící parciálně antagonisticky ke GABA-systému tak, aby byla odstraněn inhibiční účinek na acetylcholinergní systém [3];
- *látky působící proti volným kyslíkovým radikálům nebo tlumící jejich nadměrnou tvorbu* - používají se tzv. scavengery volných radikálů, např. α -tokoferol (vit. E), extractum *Gingko bilobae*;
- *nootropní látky* - tyto látky neprokázaly dostatečný účinek u ACh. Řadí sem např. piracetam, pyritinol, nicergolin [3, 6];
- *látky stimulující uvolnění nervových růstových faktorů* - zde se používá především cerebrolysin, výsledky studií však nebyly jednoznačné [6];

- *nekompetitivní inhibitory NMDA receptorů excitačních aminokyselin* - zatím klinicky užívaná pouze jedna látka – memantin (Exiba). NMDA (N-methyl-D-aspartátové) receptory otvírají iontové kanály pro Ca^{2+} . U ACH a dalších poruch CNS dochází k nadměrnému uvolnění excitačních aminokyselin a nadměrné excitaci NMDA receptorů. Řadou mechanismů dojde k odkrytí genu pro apoptózu a k nadměrnému zániku neuronů [6].

3.2.1.2 Terapie nekognitivních poruch

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

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

Při poruchách spánku mají dobrý efekt hypnotika zopiklon a zolpidem, ovšem i ta mají svá úskalí a mohou přispět k neklidu pacientů (zolpidem) [3].

3.2.1.3 Nefarmakologické přístupy v terapii Alzheimerovi demence

K nefarmakologickým přístupům patří především:

- *kognitivní rehabilitace* - jedná se o různé, zpravidla zjednodušené a nesoutěživé slovní hry;
- *reminiscenční terapie* - tato metoda využívá vzpomínek a jejich vybavování prostřednictvím různých podnětů (vyprávění starých příběhů, zpívání, tanec...)
- *adaptace prostředí pro pacienty s demencí* - úprava prostředí, aby bylo pochopitelné, přehledné, předvídatelné;
- *vedení k soběstačnosti*;

- *lifestyle approach* - jedná se o „návod k pacientovi“, o vzájemném sdělení mezi pečujícími, co je schopen učinit sám, v čem potřebuje pomoc [5].

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

3.3 SLEDOVANÉ TAXONY

3.3.1 Laurus nobilis L.



3.3.1.1 Systematika

Laurus nobilis L. (Vavřín obecný) je rostlinný druh z čeledi *Lauraceae* (Vavřínovité).

Původně pochází z Malé Asie a jihu Balkánského poloostrova , nyní je rozšířený v celé střeozemní oblasti [8].

3.3.1.2 Botanický popis

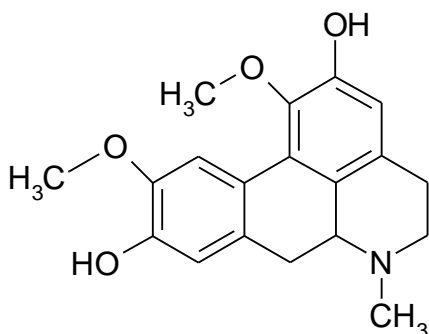
Stálezelený, 1 – 8 m vysoký keř či menší strom. Kůra je temně šedá, matná, hladká ve stáří popraskaná. Větve jsou šikmo vystoupavé s jednoduchými, řapíkatými listy. Ty jsou na líci temně zelené, lesklé,

rub je světle zelený, po rozemnutí silně voní. Květy jsou jednopohlavné, drobné, zelenožluté. Plodem je bobule, která je zpočátku zelená, později modročerná, lesklá. Rozmnožuje se nejen semenem, ale i kořenovými výběžky [8,9].

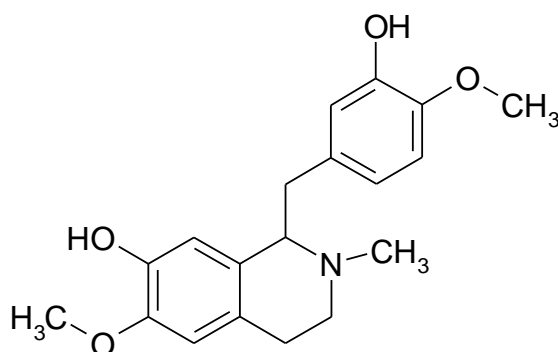
3.3.1.3 Obsahové látky

Obsahuje až 3% silice s velkým obsahem laurinu, cineolu a geraniolu. Svě zastoupení zde mají i hořčiny, škrob, cukry ale i alkaloidy. Ty se izolují převážně z listů. Je to např. retikulin, boldin, isodomeesticin, launobin, kryptodorin, xylopin, dicertrin, berberin, chinin a další [10,11].

- Boldin



- Retikulin



3.3.1.4 Využití rostliny v praxi

Vavřínové listy se cení především jako koření, tzv. bobkový list. Sbírají se v letním období. Používají se čerstvé, ale hlavně sušené listy. V čerstvém stavu chutnají poměrně hořce, ale během sušení se hořkost ztrácí, ale aroma zůstává zachované. Z bobulí se lisuje či destiluje hustá nazelenalá silice, která slouží zejména v Itálii a Řecku jako příměs do likérů a mýdel.

V lidovém léčitelství se vavřínový nálev používá při kašli a katarrech, při poruchách krevního oběhu a kožních chorobách. Využití má také při léčbě cukrovky II. typu. Silice se využívá v podobě mastí tišící bolesti (revma apod.).

Droga není vhodná pro dlouhodobé podávání a nedoporučuje se těhotným a kojícím ženám. Při předávkování může dojít k podráždění žaludku, později přichází stavy zmatenosti a silného rozrušení [8,11].

3.3.2.5 Farmakologické účinky

Bohužel veškerá dostupná literatura neuvádí žádné prokazatelné farmakologické účinky, které by mohly být využitelné ve farmaceutické praxi.

3.3.2 Buxus sempervirens L.



3.3.2.1 Systematika

Buxus sempervirens L. (Zimostráz obecný) řadíme do čeledi *Buxaceae* (Zimostrázovité).

Tento rostlinný druh je rozšířen na jihu a středě Evropy. Vyhledává smíšené listnaté lesy, skalnaté suti a je hojně vysazován v zahradách a parcích [8].

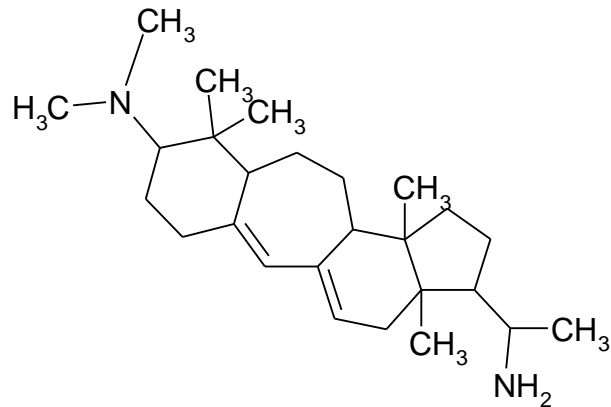
3.3.2.2 Botanický popis

Je to hustý vždyzelený keř s mohutně vyvinutým kořenovým systémem. Větve jsou krátké, tlusté, olivově zelené. Listy jsou jednoduché, vstřícné, vejčité až podlouhle elipčité, kožovité, na okraji ohrnuté. Květy jsou v úžlabních svazečkách, velmi drobné, jednopohlavné. V každém svazečku je jeden samičí květ obklopen 5-6 samčími květy. Semeník je tvořen ze tří plodolistů. Plodem je trojpouzdrá tobolka [8,12].

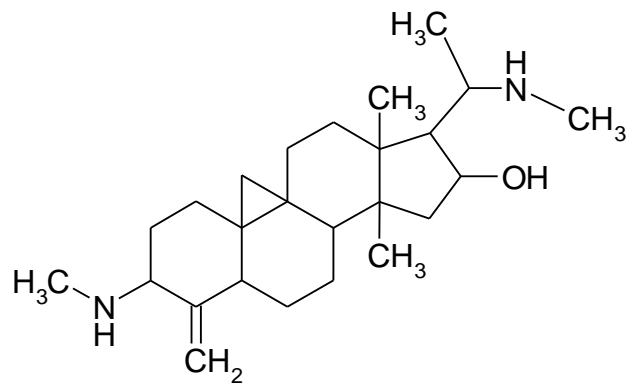
3.3.2.3 Obsahové látky

V celé rostlině jsou přítomny steroidní alkaloidy pregnanového typu. Jejich množství se mění během vegetačního období a je různý v jednotlivých rostlinných částech (nejvíce v listech). Hlavní alkaloid, který je nositelem toxického účinku je cyklobuxin D. Dále zde nalezneme alkaloidy cyklobuxin B, cykloprotobuxin, cyklovirobuxin, buxamin, buxaminol, sempervirin, semperviraminol, buxatin a další [12-18].

- Buxamin



- Cyklobuxin D



3.3.2.4 Využití rostliny v praxi

Dříve se používaly v terapii listy jako laxativum a antirevmatikum. Čerstvé výhonky se užívaly v homeopatii.

Velmi hustě a stejnoměrně stavěné dřevo se používá k výrobě dřevěných hudebních nástrojů [8,12].

3.3.2.5 Farmakologické účinky

- *Antibakteriální účinek* – za tento účinek je zodpovědný především alkaloid buxaquamarin [19];
- *presorické* – po podání vyvolává krátkodobé zvýšení tlaku, které je následováno výraznou hypotenzí. Účinek je vysvětlován působením alkaloidu buxaminolu E na

centrální i periferní muskarinové receptory a inhibicí AChE [20,21];

- *protizánětlivé* – účinek byl sledován u myší. Perorálně jim byl podáván cyklobuxin D [20];
- *anticholinergní* – extrakt z čerstvého rostlinného materiálu vykazoval silný inhibiční efekt na sérovou cholinesterázu v lidské a koňské krvi [22,23].

3.3.3 *Lycopodium clavatum* L.



3.3.3.1 Systematika

Lycopodium clavatum L. (Plavuň vidlačka) patří do čeledi *Lycopodiaceae* (Plavuňovité).

Rozšířená hojně v mírném a chladném pásmu Eurasie i Severní Ameriky, též v subtropických a tropických oblastech, v horách jen místy. Vyskytuje se na kyselých půdách, vřesovištích, v světlých jehličnatých lesích [24].

3.3.3.2 Botanický popis

Vytrvalá vždyzelená bylina. Hlavní lodyha je dlouze plazivá, kořenující, postranní větve jsou vystoupavé až přímé. Listy jsou čárkovitě kopinaté, 3 – 5 mm dlouhé, celokrajné nebo jemně zoubkaté,

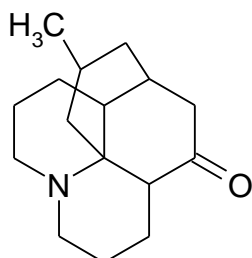
zakončené dlouhým bílým chlupem. Jen fertilní lodyhy jsou vzpřímené, až 25 cm vysoké, na koncích s 2 – 3 výtrusnicovými klasy na řídkéolistých, žlutozelených stopkách. Sporofyly jsou okrouhlé, rovněž prodloužené v bezbarvou štětinu, asi dvakrát delší než výtrusnice [24,25].

3.3.3.3 Obsahové látky

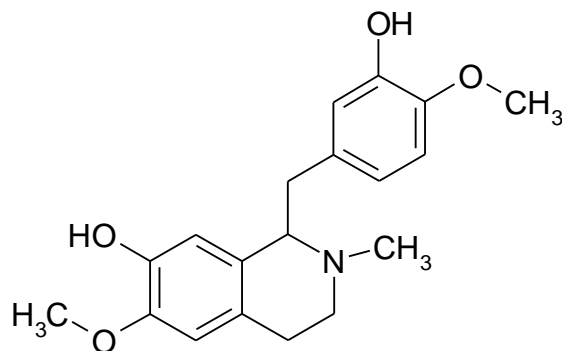
Rostlina obsahuje celou řadu látek, z nichž jsou z farmaceutického hlediska nejdůležitější alkaloidy. Jejich obsah činí cca 0,12 % a mění se během vegetačního období, maxima dosahuje v měsíci srpnu a září.

Hlavním alkaloidem je lykopodin, z celkového množství alkaloidů zaujímá 84,5 %. Dalšími rostlinnými alkaloidy jsou klavatin, klavatoxin, lykoklavin, lykodin, lykodolin, klavolonin, lykoflexin, nikotin atd [26,27,28].

- Lykopodin



- Klavatin



3.3.3.4 Využití rostliny v praxi

V lidovém léčitelství se používá čaj při dně, revmatismu, hemeroidech a ledvinových kolikách. Velmi oblíbená je tato rostlina v terapii jaterních onemocnění jako je hepatitida, fibróza či rakovina jater. Výtrusy se dříve používaly jako pilulkové konspergens [24,25].

3.3.3.5 Farmakologické účinky

- *Antibakteriální účinek* – byl dokazován na celé řadě mikroorganismů. Nejvyšší efekt vykazovaly rostlinné extrakty na kmeny *Staphylococcus aureus* [29];
- *antivirotický účinek* – inhibiční efekt byl pozorován na virus *Herpes simplex* [30];
- *antipyretický účinek* – při testech na myších se jevil velmi silně. Je za něj zodpovědný především alkaloid lykopolin, dále též klavatin a klavatoxin [31];
- *protizánětlivý účinek* – za tento efekt je zodpovědný opět alkaloid lykopolin [29].

3.3.4 *Nelumbo nucifera* Gaertn.



3.3.4.1 Systematika

Nelumbo nucifera Gaertn. (Lotos indický též ořechonosný) patří do čeledi *Nelumbonaceae* (Lotosovité).

Tato nádherná tropická rostlina je původní v Indii, jižní Asii a severní Austrálii. Má celou řadu variet, které se liší nejčastěji barvou květů. Lotosový květ byl a je v řadě náboženství posvátnou květinou a důležitým symbolem. Uctívali ho staří Egypťané, dodnes ho ctí Indové a buddhisté [32,33,34].

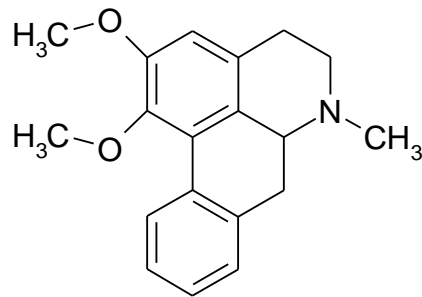
3.3.4.2 Botanický popis

Tropická vodní rostlina. Listy jsou dlouze řapíkaté, jednoduché, okrouhlé, zdvižené nad vodní hladinou nebo plavou pod ní (aerohydrofyty), velké až 60 cm. Jsou pokryty tenkou voskovou vrstvou, která jim dodává modrozelenou barvu. Květy jsou oboupohlavné, pravidelné růžové, příjemně vonící. Mohou dosahovat v průměru až 20 cm. Mají mnoho korunních lístků a tyčinek, přes den jsou otevřené, na noc se zavírají. Doba kvetení je 3 dny a vyžaduje optimální teplotu a vlhkost. Plodem je dužnatá bobule, která je jedlá [32,33,34].

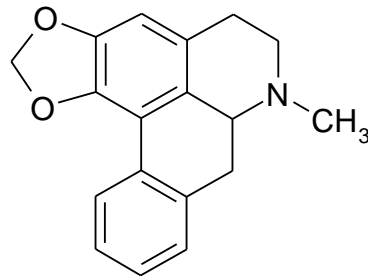
3.3.4.3 Obsahové látky

Vedle flavonoidů, tříslovin, saponinů, sterolů a jiných látek, obsahuje tento rostlinný druh alkaloidy, a to především isochinolinové. Jsou to např. nuciferin, nornuciferin, remerin, neferin, lotusinliriodenin, armepavin a další [35-41].

- Nuciferin



- Remerin



3.3.4.4 Využití rostliny v praxi

Celá rostlina je jedlá. V Indii, Číně a Japonsku se používá jak syrová tak vařená (např. do polévek). Je zdrojem řady vitamínů, aminokyselin a stopových prvků. Dále se využívá pro dekorační účely nebo jako přísada do čajů. V tradiční čínské medicíně našla své místo díky sedativním (sušená semena) a hemostatickým účinkům [32,33,34].

3.3.4.5 Farmakologické účinky

- *Protizánětlivý, analgetický, antitusický, antiserotoninový, antiadrenergní, antibakteriální, hypolipidemický, antioxidační* – za tyto účinky je zodpovědný především alkaloid nuciferin, zpracovává se do perorálních lékových forem např. tobolek, tablet, sirupů [42, 43];

- *antivirový* – předmětem studií je antiHIV efekt [44];
- *antiarytmický* – účinek byl sledován na srdcích psů, byla pozorována inhibice fosfodiesterázy a tím zpomalení převodního systému srdečního [45];
- *sedativní, hypnotický* – po podání thiopentalu myším způsobuje prodloužení spánku [46].

3.3.5 *Fritillaria cirrhosa* L., *Fritillaria thunbergii* L.



3.3.5.1 Systematika

Rod *Fritillaria* (Řebčík) patří do čeledi *Liliaceae* (Liliovité). Jedná se o velmi variabilní druh, druh *Fritillaria cirrhosa* L. a *Fritillaria thunbergii* L. tvoří jen malý zlomek celkového množství druhů (100 – 130). Oba tyto druhy jsou původní v Číně. U nás se setkáme pouze s druhy *Fritillaria meleagris* L. a *Fritillaria imperialis* L., které jsou pěstované jako okrasné [12,47].

3.3.5.2 Botanický popis

Jedná o vytrvalé pozemní byliny, 60 – 100 cm vysoké, s cibulemi. Někdy jsou přítomny i vedlejší cibulky. Lodyha je silná, přímá, ve střední části bohatě listnatá, na bázi a pod květenstvím bezlistá. Listy jsou střídavé, někdy vytvářejí přeslen, jsou jednoduché, přisedlé, s

listovými pochvami. Čepele listů jsou celokrajné, většinou čárkovité, kopinaté až vejčité, žilnatina je souběžná, u nekvetoucích rostlin je list jen jeden. Květy jsou oboupohlavné, jsou v květenstvích, zpravidla řídkých hroznech, někdy je přítomen pouze jeden květ. Květy jsou nápadné, ve tvaru zvonku či čísky, různých barev, okvěť se skládá z 6 okvětních lístků ve 2 přeslenech (3+3), které volné. Tyčinek je 6 (3+3). Gyneceum je složeno ze 3 plodolistů, je synkarpní, semeník je svrchní. Plodem je tobolka [47].

3.3.5.3 Obsahové látky

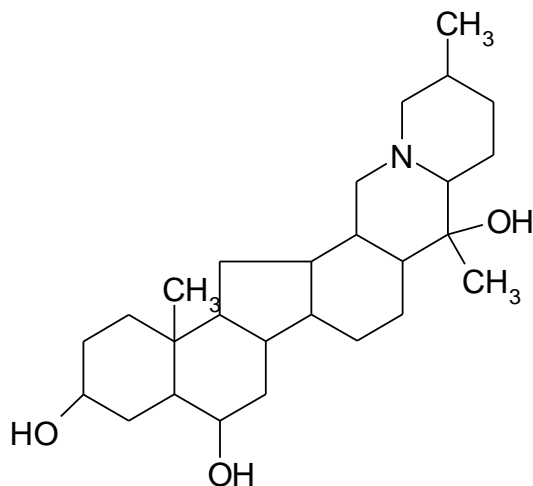
Fritillaria cirrhosa L.

Alkaloidy jsou lokalizované především v cibuli. V čerstvém stavu činí jejich obsah až 0,12%. Jedná se nejčastěji o steroidní alkaloidy s chinolizidinovým systémem. Pro rod *Fritillaria* jsou typické alkaloidy peimin a peiminin. Dále zde najdeme imperialin, verticin, isovercin, verticinon, peimisin, ebejedin a dihydrojervin [48-50].

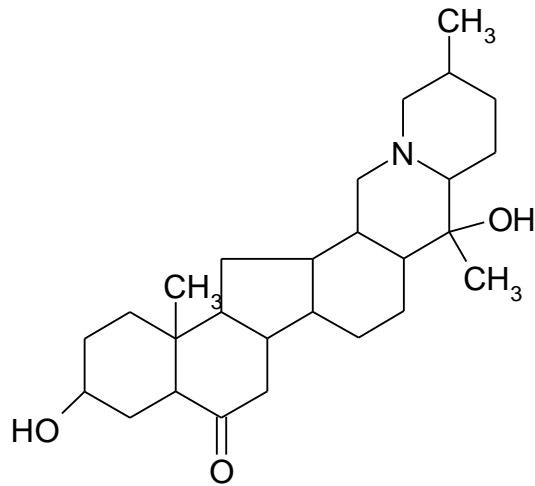
Fritillaria thunbergii L.

Vedle výše zmíněných zde najdeme alkaloidy yibeinosid A, sinpeimin, dongbeimin a další [49-54].

- Peimin



- Peiminin



3.3.5.4 Využití rostliny v praxi

V tradiční čínské medicíně se používají sušené cibule jako antitusikum. Jinak se tyto byliny využívají jako okrasné a medonosné [55].

3.3.5.5 Farmakologické účinky

- *Hypotenzní účinek* – vysokou schopnost snížit krevní tlak mají především alkaloidy peimin a peiminin, letální dávka je 0,9 mg/kg po i.v. podání [50,53];
- *antitusický a sedativní* – oba tyto účinky jsou předmětem četných studií, v medicíně zatím bez využití [55].

3.3.6 *Stemona* ssp.



3.3.6.1 Systematika

Rod *Stemona* řadíme do čeledi *Stemonaceae*. Tato čeleď zahrnuje asi 30 druhů, které nejdeme na území Asie (především Čína a Japonosko) ale i Austrálie. Jedná se o tropické druhy, hojně využívané v tradiční čínské a japonské medicíně. V rámci této práce byli zpracovány druhy *Stemona sessilifolia* Miq., *Stemona japonica* Miq. a *Stemona tuberosa* Lour. [56,57,58].

3.3.6.2 Botanický popis

Tyto rostlinné druhy jsou keře nebo popínavé byliny s masivními, hlízovitými, chomáčkovitými kořeny. Stonek je přímý nebo plazivý. Listy jsou střídavé, vejčité či kopinaté. Květenství vyrůstá nejčastěji z úžlabí listů, někdy je vrcholové. Tyčinky většinou volné, u některých druhů jsou na bázi srostlé. Plodem je tobolka. Semena jsou protáhlá, podélně žebrovaná [58].

3.3.6.3 Obsahové látky

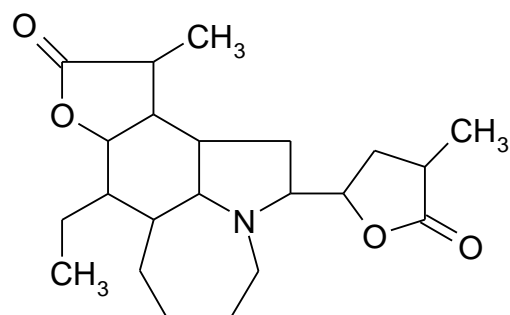
Pro tento rostlinný druh jsou charakteristické alkaloidy s pyrrolo[1,2]azepinovým popř. pyrido[1,2]azepinovým jádrem. Dále je můžeme členit podle struktury na stichoneurinové, protostemoninové a kroominové alkaloidy. Jejich celkový obsah se pohybuje mezi 0,26 – 3,1% [57,59-62].

Druh *Stemona sessilifolia* obsahuje např. tyto alkaloidy: stemonin, protostemonin, sessilistemonamid A-H, sessilifoliamid, stenin [60,63,64,65].

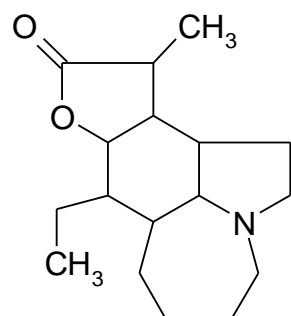
Druh *Stemona tuberosa* obsahuje např. tuberostemonin, neotuberostemonin, tuberospironin, kroomin, stemonin, protostemonin [64,66].

Druh *Stemona japonica* obsahuje např. alkaloidy japonin A-D, stilbostenin, neostemonin, stemonamid, stemodiol a další [67].

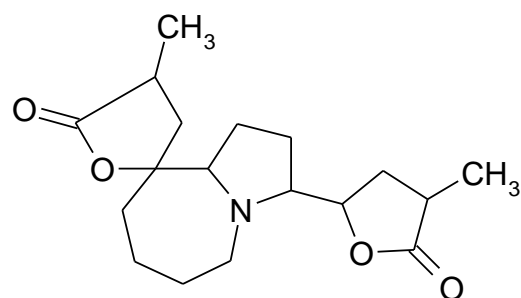
- Tuberostemonin



- Stenin



- Kroomin



3.3.6.4 Využití rostliny v praxi

Tradiční čínská a japonská medicína využívá sušené kořeny k léčbě kašle, plicní tuberkulózy, bronchitidy či vaginitid. Je oficiální v Čínském lékopise [57].

3.3.6.5 Farmakologické účinky

- *Insekticidní účinek* – výtažek z čerstvých kořenů má velmi silný účinek proti hmyzu [68];
- *antiseptický účinek* – tento účinek byl sledován při léčbě akné [69];
- *antitusický účinek* – pro tento účinek je důležitá pyrrolobezazepinová struktura (tuberostemonin) [70,71].

3.3.7 *Stephania tetrandra* S. Moore



3.3.7.1 Systematika

Rod *Stephania* patří do čeledi *Menispermaceae* (Chebulovité). Je původní ve východní a jižní Asii a Austrálii. Je to velice rozsáhlý rod, vedle druhu *Stephania tetrandra* S. Moore zahrnuje dalším téměř 30 druhů [72].

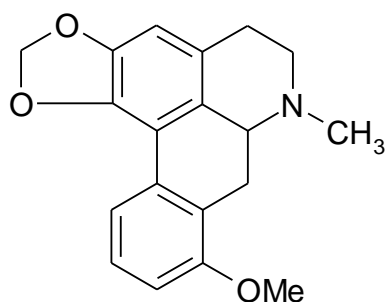
3.3.7.2 Botanický popis

Jedná se popívanou až 4 m vysokou bylinu, s listy vyrůstajícími spirálovitě na stonku. Bohužel žádná dostupná literatura neuvádí bližší popis rostliny [72].

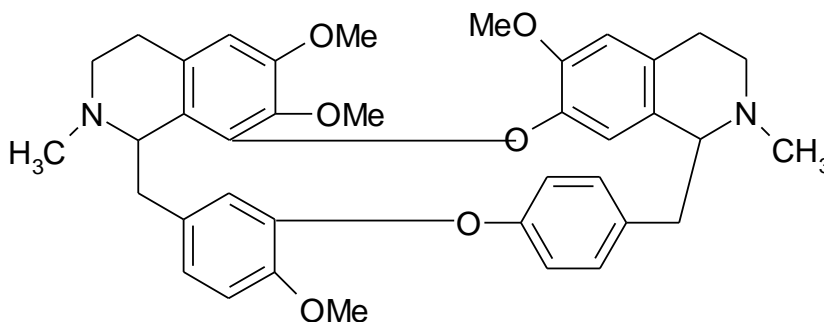
3.3.7.3 Obsahové látky

Hlavními obsahovými látkami, které dávají tomuto druhu celou řadu charakteristickým farmakologických účinků, jsou alkaloidy. Nejvýraznější je alkaloid tetrandrin, jeho obsah se pohybuje kolem 0,7 – 1,3 %. Dále zde nalezneme stefanin, demethyltetrandrin, fangcholin, norfangcholin, cyklanolin, oblongin, fenfangin, berbamin, stefenantrin, isokorydin a celou řadu dalších [73-79].

- Stefanin



- Tetrandrin



3.3.7.4 Využití rostliny v praxi

Tento druh je oficiální v Čínském lékopise. Používá se k léčbě artritidy a silikózy [72].

3.3.7.5 Farmakologické účinky

- *Bakteriostatický účinek* – účinek je dán působením alkaloidů, inhibuje růst *Mycobacterium tuberculosis* [80];
- *antitumorózní účinek* – byl testován a kladně vyhodnocen při léčbě žaludečního a kolorektálního tumoru [81,82];
- *protizánětlivý účinek* – nejvýraznější účinek má tetrandrin, který působí přes COX–2;tento účinek se sleduje při léčbě jaterní a plicní fibrózy [83,84];
- *kardiovaskulární účinek* – působí přes vápníkové kanály v srdci, což lze využít při léčbě hypertenze, anginy pectoris, arytmií [85,86];
- *hypnotický a analgetický účinek* – tyto účinky nejsou příliš výrazné jako výše uvedené [87,88];
- *inhibice AChE* – aktivitu vykazují norfangcholin a berbamin [89,90].

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Všeobecné postupy

4.1.1 Úprava rostlinného materiálu

Rostlinné části byly sbírány za suchého a slunného počasí, sušeny za pokojové teploty ve stínu. Usušené rostlinné části byly rozdrobněny na mlýnku na velikost 1–3 mm, před přípravou extraktů byly rostlinné části dále rozemlety a hmota síťována (0,2 – 0,6 mm).

4.1.2 Úprava rozpouštědel destilací

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

4.1.3 Digesce

2,0 g suchého jemně mletého rostlinného materiálu bylo nasypáno do Erlenmeyerovy baňky a bylo extrahováno 30 ml 95% ethanolu za varu na vodní lázni 30 minut za občasného protřepání. Poté byl extrakt ponechán asi 15 – 30 minut za občasného protřepání stát. Roztok byl zfiltrován přes bezpopelový filtr a zbytek drogy byl promyt 5 – 10 ml 95% ethanolu.

4.1.4 Odpařování

Ethanolový extrakt byl zahuštěn na vakuové odparce za sníženého tlaku a teplotě do 40°C.

4.1.5 Tenkovrstvá chromatografie (TLC)

Tenkovrstvá chromatografie byla prováděna na komerčně vyráběných deskách (Kieselgel 60 F254, Merck) v systému nasycených komor. Sycení komor probíhalo po nalití a mírném protřepání mobilní fáze minimalně 60 min. Extrakty a referenční látky byly nanášeny na chromatogram ve formě čárek podle zvoleného objemu (délka cca 1 cm) pomocí kalibrovaných kapilár Qualicolor. Po vyvinutí byl

chromatogram vyjmut z komory a vysušen nejprve teplým, potom studeným vzduchem. Poté byla provedena detekce, v první fázi pod UV lampou a v další fázi postřikem detekčním činidlem.

4.2 Potřeby

4.2.1 Rozpouštědla

Cyklohexan č.

Diethylamin č.

Ethanol 95%, denaturovaný methanolem, č.

Chloroform č.

Methanol č.

Voda

4.2.2 Chemikálie

Acetylcholinesterasa z elektrického úhoře (electric eel)

Argon

Dusičnan bismutitý p.a.

Fast blue B č.

Hovězí sérový albumin

Jodid draselný č.

Kyselina vinná č.

1-Naftylacetát č.

TRIS

Standardy: fysostigmin (Sigma), galanthamin (Sigma)

4.2.3 Detekční činidla

D1: Dragendorffovo činidlo modifikované podle Muniera

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

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

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

Činidlo pro analýzu: bylo připraveno tak, že se k roztoku 5 g kyseliny vinné rozpuštěné v 50 ml vody bylo přidáno 5 ml zásobního roztoku [91].

D2: UV $\lambda = 254$ nm

Detekce chromatogramu pod UV lampou při vlnové délce 254 nm.

4.2.4 Vyvíjecí soustavy

S1: Chloroform+methanol+voda 65+35+5

S2: Cyklohexan+diethylamin 90+10

4.2.5 Chromatografické adsorbenty

Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck)

4.3 Příprava sumárních extraktů

4.3.1 Materiál

Použitý rostlinný materiál		Původ materiálu	Čínské názvy
<i>Laurus nobilis</i> L. (L-N)	Listy	08/2006, Lindava	-
<i>Buxus sempervirens</i> L. (B-S)	Větvičky, listy	08/2006, ZLR u Farm. Fak. UK	-
<i>Lycopodium clavatum</i> L. (L-C)	Nať	Pragon, Praha	Shen Jincao
<i>Nelumbo nucifera</i> Gaertn. (N-N)	Oddenky	Pragon, Praha	Oujie
<i>Nelumbo nucifera</i> Gaertn. (N-S)	Tyčinky	Pragon, Praha	Lianxu
<i>Fritillaria thunbergii</i> L. (F-T)	Hlíza	Pragon, Praha	Zhebeimu
<i>Fritillaria cirrhosa</i> L. (F-C)	Hlíza	Pragon, Praha	Chuanbeimu
<i>Stemona</i> ssp. (S)	Kořen	Pragon, Praha	Baibu
<i>Stephania tetrandra</i> S. Moore (S-T)	Kořen	Pragon, Praha	Fangji

Tab. 1: Druh a původ rostlinného materiálu

4.3.2 Extrakce drogy a zpracování extraktu

Příprava surového extraktu - Nejdříve byla provedena digesce rostlinného materiálu (viz. 4.1.3 Digesce). Poté bylo provedeno zahuštění na vakuové odparce na malý objem. Vzniklý roztok (2 – 4 ml) byl převeden do injekčních ampulek, do kterých byla zavedena Pasteurova pipeta a na mírně teplé vodní lázni (40°C) bylo odpařeno rozpouštědlo. Ampulky byly sušeny ve vakuovém exsikátoru cca 12 hodin nad silikagelem. Po usušení byly zváženy, naplněny argonem, zataveny a do doby zpracování uchovávány při 4°C v chladničce.

Označení materiálu	Hmotnost drogy [g]	Extrakt	
		[g]	[%]
L - N	2,00	0,0228	1,14
B - S	2,00	0,0226	1,13
L - C	2,00	0,0240	1,20
N - N	2,00	0,0180	0,90
N - S	2,00	0,0194	0,97
F - T	2,00	0,0230	1,15
F - C	2,00	0,0200	1,00
S	2,00	0,0200	1,00
S - T	2,00	0,0198	0,99

Tab. 2: Hmotnost a procentuální obsah extraktů

4.3.3 Bioautografická metoda [92]

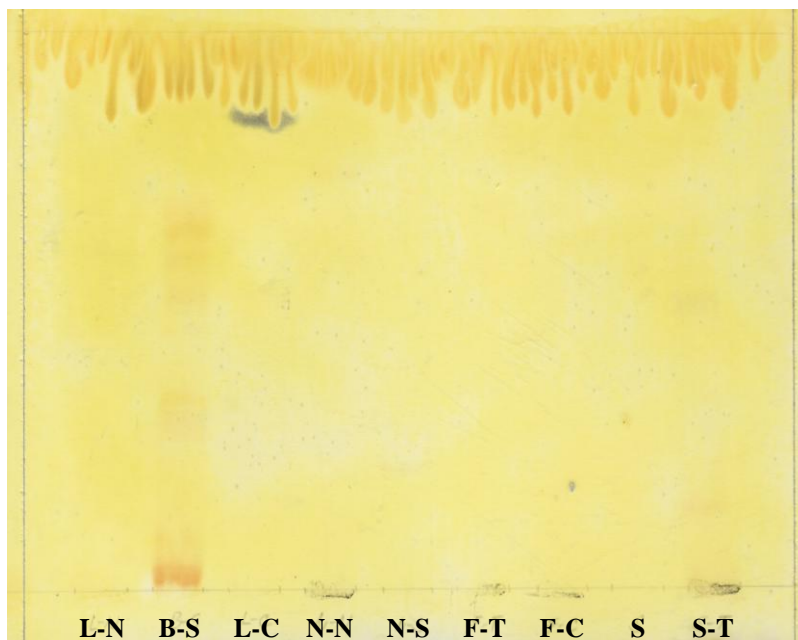
Z jednotlivých výtřepků bylo odebráno 20 mg vzorku a rozpuštěno v 1,0 ml methanolu. Standardy byly rozpuštěny v methanolu na koncentraci 1 mg/1 ml. AChE z elektrického úhoře byla rozpuštěna v 150 ml 0,005M pufru TRIS – kyselina chlorovodíková o pH 7,8. K tomuto roztoku byl přidán hovězí krevní albumin (150 mg) za účelem stabilizace enzymu během biologické zkoušky.

Na start TLC chromatogramu byly nanášeny roztoky výtřepků o objemu 15 µl ve formě čárek délky 10 mm. Pro porovnání byly naneseny i roztoky standardů, o objemu 10 µl. Chromatogramy byly vyvíjeny v soustavě S1. Po vyvinutí byly vysušeny nejdříve teplým, poté studeným vzduchem. Následně se provedl nástřík AChE,

chromatogramy byly mírně vysušeny a inkubovány v komoře prostoupené vodními parami při 37°C po dobu 20 min. Po uběhnutí doby inkubace byly chromatogramy postříkány detekčním činidlem, vzniklým smísením roztoku 1-naftylacetátu (koncentrace 250 mg/100 ml ethanolu) a roztoku Fast Blue B (koncentrace 400 mg/160 ml vody) v poměru 1:4.

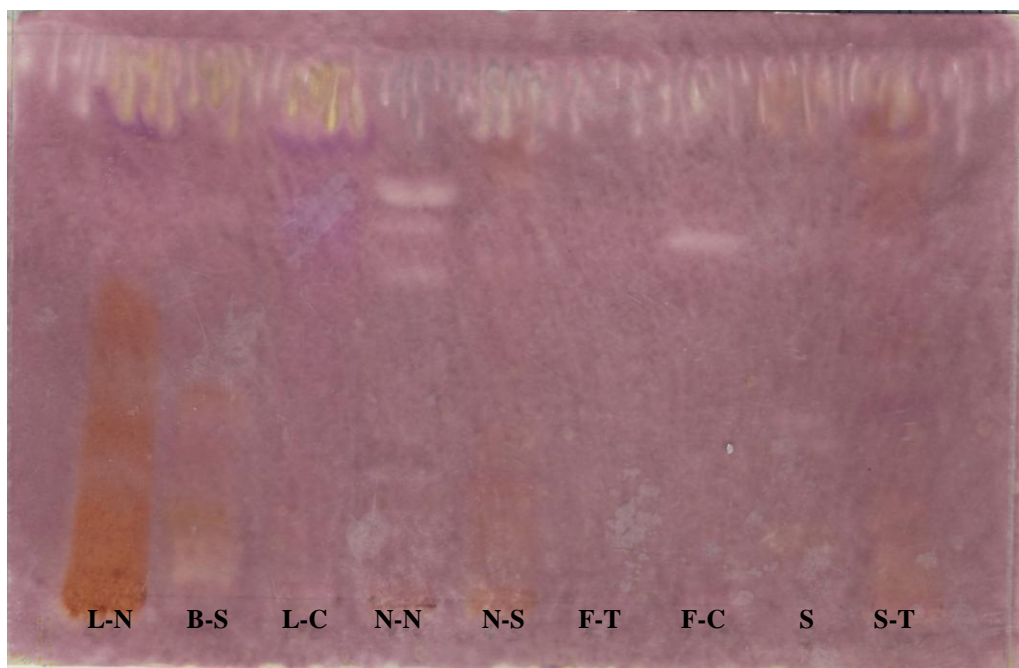
5. VÝSLEDKY

5.1 Detekce alkaloidů Dragendorffovým činidlem (D1) v neutrální vyvíjecí soustavě (S1)



Obr. 1: Detekce alkaloidů Dragendorffovým činidlem (D1) v neutrální vyvíjecí soustavě (S1)

5.2 Detekce alkaloidů bioautografickou metodou v neutrální vyvíjecí soustavě (S1)



Obr. 2: Detekce alkaloidů bioautografickou metodou v neutrální vyvíjecí soustavě (S1)



Obr. 3: Detekce standardů (fisostigminu a galanthaminu) bioautografickou metodou v neutrální vyvíjecí soustavě (S1)

6. DISKUSE

Vzhledem k tomu, že Alzheimerova choroba postihuje nemalé procento populace, probíhá v posledních letech velice intenzivní studium látek (potenciálních léčiv), které by mohly být terapeuticky využitelné v léčbě tohoto zákeřného onemocnění. Vedle syntetických látek, kterých však je jako reálných léčiv jen několik, hraje nemalou roli sledování látek přírodního původu, především alkaloidní povahy.

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

Tato práce je zahájením širšího fytochemického screeningu zahájeného na katedře farmaceutické botaniky a ekologie, jehož cílem je sledování různých alkaloidů rostlin na aktivitu (inhibici) AChE za pomoci jednoduchého testu využívajícího tenkovrstvou chromatografii, ale také BuChE, jejíž propracování chromatografií na tenké vrstvě se dosud na pracovišti nezdařilo, ačkoliv jedna literární práce uvádí, že je to možné [92]. Postup sledování antiAChE účinku na TLC jsem používala již ve své diplomové práci a ukázal se jako velice vhodný. Jednak je k tomuto screeningu třeba jen malé množství rostlinného materiálu, není příliš náročný na provedení ani na použité chemikálie a je poměrně rychlý. Sledování alkaloidů probíhalo u rostlin využívaných v tradiční čínské medicíně, u kterých se předpokládá aktivita z hlediska inhibice AChE.

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

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

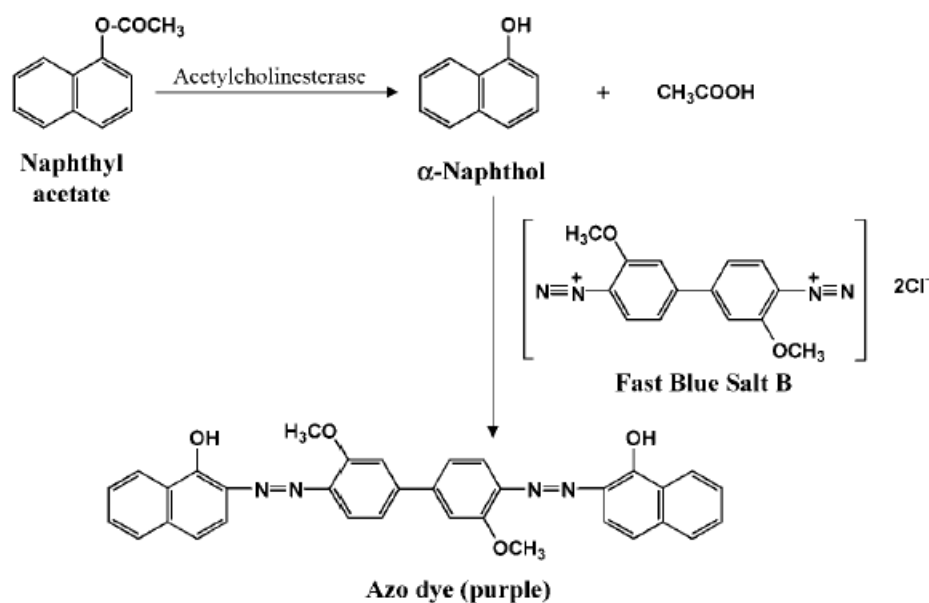
Pro tuto studii jsem zvolila první postup: je výhodný pro prvotní screening, protože k jeho realizaci stačí i velice malé množství rostlinného materiálu, má jednoduché a rychlé provedení a po jeho vyhodnocení lze separovat ty rostlinné druhy, u nichž byla sledována inhibiční aktivita a ty pak podrobit podrobnějšímu studiu. Vedle těchto výhod zde existují i nevýhody. Sumární extrakt obsahuje i velké množství látek nealkaloidní povahy, které mohou dávat falešné reakce na inhibici AChE.

Při této metodě jsem postupovala podle následujících kroků:

- a) příprava surového extraktu vhodnou extrakční metodou za použití nízkomolekulárního alkoholu (zvolila jsem ethanol),
- b) zahuštění extraktu na malý objem a vysušení,
- c) provedení TLC, která umožňuje sledování přítomnosti alkaloidů a jejich inhibiční aktivitu na AChE.

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

- modifikované Ellmanově metodě [93], která sleduje dva typy extraktů: ethyl-acetátový (TLC soustava toluen-ethyl-acetát-methanol 30:8:1) a vodný (soustava ethyl-acetát-methanol-voda 100:13,5:10); desky jsou po vysušení postříkány roztokem acetylthiocholinjodidu a 5,5'-dithiobis[2-nitrobenzoové kyseliny] a po vysušení se postříká roztokem AChE z elektrického úhoře (TRIS, pH 8, inkubace 3-5 min. 37 °C). Vznikají bílé skvrny na žlutém podkladě, nebo
- bioautografické metodě [92], využívající také vzniku azobarviva: TLC desky se po nanesení všech výtřepků vyvinou v soustavě chloroform-methanol-voda 65:35:5 (nebo jiné vhodné soustavě), postříkají roztokem AChE, inkubují ve vlhkém prostředí (pH ~8, TRIS pufr, 37 °C, 20 min) a postříkají směsí roztoků 1-naftylacetátu a Fast Blue B Salt; po 2-5 min. dochází k barevnému zviditelnění: na světle fialovém podkladu zůstávají bílé skvrny označující aktivní látky. Mechanismus reakce je následující:



Obr. 3: Reakce AChE s 1-naftylacetátem a podstata tvorby fialového azobarviva u TLC bioautografické metody

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

Pro vlastní screening byla provedena nanáška 15 µl zásobního roztoku extraktů (20 mg/1 ml methanolu) a 10 µl roztoků standardů (fysostigmin, galanthamin; methanolu; R_f hodnoty obou standardních alkaloidů jsou bohužel v použité soustavě prakticky stejné); tyto objemy, které se ukázaly jako optimální, byly zjištěny v předpokusech. Standardy alkaloidů byly nanášeny z důvodu porovnání relativní intenzity skvrn. Desky pro inkubaci AChE byly vyvíjeny v neutrální soustavě (S1). Zároveň byla na jiných deskách provedena detekce Dragendorffovým činidlem (D1), aby bylo možné provést porovnání.

Jistou nevýhodou při tomto sledování je skutečnost, že v neutrální rozpouštědlové soustavě (bez přídavku alkalizačních činidel – diethylaminu, amoniaku) se alkaloidy zpravidla nedělí tak ostře a dobře jako v případě soustav alkalických; pro zjištění antiAChE účinku lze však použít pro vyvíjení chromatogramů pouze neutrální soustavy. Alkalizační látku lze totiž z vrstvy podle mé zkušenosti jen velmi obtížně odstranit (není to možné ani proudem teplého vzduchu, patrně dochází zčásti k sorpci na kyselý silikagel) a její přítomnost výrazně snižuje stabilitu AChE, i když se pracuje v pufrovaném roztoku.

Vhodná soustava, která by dobře dělila jak terciární, tak kvartérní alkaloidy, dosud u nás nalezena nebyla a patrně nebude, vzhledem k rozdílné chemické povaze látek. Proto je tato bioautografická metoda skutečně předběžná, dávající přehled jen o tom, jsou-li v primárním (sumárním) extraktu opravdu nějaké silně účinkující látky (vizuálně, nikoliv kvantitativně porovnáno se standardy fysostigminem a

glanthaminem). Pokud se takové látky vyskytnou, je už záležitostí další fytochemické práce je získat, určit jejich strukturu a změřit IC_{50} .

Lze předpokládat, že přesnější výsledky by přineslo na TLC použití pouze koncentrátů alkaloidů, připravených čištěním perkolátů (metoda 2., jak jsem se o ní zmínila). Protože jsem u několika vzorků tuto metodu prováděla pro srovnání, mohu konstatovat, že je pracovně (časově) velice náročná a výsledky nejsou vždy zcela přesvědčivé (obtěžně lze získat čistou směs kvartérních alkaloidů, které jsou zpravidla *in vitro* neúčinnější). Toto byl další důvod, proč jsem zvolila metodu 1. (přípravu primárního sumárního extraktu), která je jako předběžný test dostačující.

Rostlinný materiál, který jsou pro pokusy používala, byl získán komerčně: list vavřínu z potravinářských surovin a ostatní morfologické části byly získány přímým dovozem komerčních drog z Číny. To je určitá nepříznivá okolnost: potravinářský list vavřínu byl patrně zčásti fermentován (resp. je nezodpověditelnou otázkou, v kterém fenologickém období byly listy sbírány a jak dlouho a za jakých podmínek byly uskladňovány), a tak mohl být výskyt alkaloidů zcela minoritní. Ostatní drogy, původem z Číny, z oficiálního trhu, byly po makroskopickém a mikroskopickém studiu shledány poněkud nižší kvality (přesto jsem je použila, protože jiná možnost získání není a pokud by tato surovina byla používána k izolaci alkaloidů, vycházelo by se stejně z komerčního dodání). Kvalita čínských léčivých drog bývá často velmi proměnlivá a kolísající v závislosti na expedičních podnicích (resp. kvalifikovanosti sběračů a tím renomovanosti firem, které je dodávají).

Laurus nobilis – list: ačkoliv je tento rostlinný druh využíván především pro vysoký obsah silice, je známo, že obsahuje i celou řadu alkaloidů. Bohužel detekcí Dragendorffovým činidlem nebyla patrná výrazná pozitivní reakce a ani nebyl prokázán žádný inhibitor AChE.

Buxus sempervirens – větvičky a listy: zde byla pozorována velmi silná pozitivní reakce na přítomnost alkaloidů. Literatura uvádí, že jejich nejvyšší koncentrace je právě v listech a jedná se o alkaloidy pregnanového typu. Inhibitory AChE byly pozorovány v blízkosti startu, s intenzitou nižší než vykazovaly použité standardy. Těmto látkám je potřeba věnovat další pozornost – ačkoliv se zdají být účinné, jsou to právě látky z nichž některé mohou mít výraznou toxicitu [94].

Lycopodium clavatum – nat': obsahuje celou řadu alkaloidů, z nichž největší zastoupení má lykopodin. V testu na inhibiční aktivitu AChE se ale extrakt jevil jako neaktivní. Nízký obsah alkaloidů je podle mého názoru způsoben nízkou kvalitou drogy – nebylo však možné získat tuto morfologickou část sběrem v ČR.

Nelumbo nucifera – oddenek: u tohoto extraktu byla průkazná velmi silná inhibiční aktivita na AChE, na chromatogramu se jevily 3 intenzivní skvrny a několik méně výrazných. Tyto reakce byly pravděpodobně způsobeny přítomností isochinolinových alkaloidů jako je např. nuciferin, nornuciferin, remerin, neferin, lotusinliriodenin, armepavin a další [35-41].

Nelumbo nucifera – tyčinky: extrakt nevykázal tak intenzivní reakci jako tomu bylo v předchozím případě. Literatura bohužel neuvádí, která rostlinná část je na alkaloidy bohatší, tak nelze s jistotou určit, jestli byla reakce ovlivněná experimentálními podmínkami nebo množstvím pozitivně reagujících látek.

Fritillaria thunbergii – hlíza: je známo, že v této rostlinné části se nachází velké množství alkaloidů, převážně steroidního typu. Nebyla však prokázána jejich přítomnost ani inhibiční afekt na AChE.

Fritillaria cirrhosa – hlíza: podobně jako u výše zmíněného druhu je největší koncentrace alkaloidů v hlíze. Zde byla však pozorována intenzivní reakce v podobě bělavé skvrny, která tak určuje přítomnost inhibitorů AChE.

Stemona ssp. – kořen: u této, na alkaloidy poměrně bohaté rostliny nebyla reakce a AChE příliš přesvědčivá.

Stephania tetrandra – kořen: ani zde není množství alkaloidů zanedbatelné, nejvýraznější je tetrandrin. Jejich přítomnost sejevila v testu s Dragendorff. činidlem. Literatura uvádí, že tyto alkaloidy mají inhibiční aktivitu, ale pomocí bioautografické metody nebyla prokázána.

Výsledky své rigorózní práce bych shrnula takto:

- 1) bioautografická metoda využívající na TLC barevné reakce s 1-naftylaminem a Fast Blue B Salt je vhodná a dobře použitelná,
- 2) pro základní screening lze použít i malé množství rostlinné drogy,
- 3) pro bližší studium se jako vhodné ukazují taxony *Buxus sempervirens* L., *Nelumbo nucifera* Gaertn., *Fritillaria cirrhosa* L. a *Stemona ssp.*

7. ABSTRAKT

Nováková, J.: Biologická aktivita obsahových látek rostlin XVII. Vliv alkaloidů z různých rostlinných taxonů na acetylcholinesterázu. Rigorózní práce, Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta, Katedra farmaceutické botaniky a ekologie, Hradec Králové 2008, 71 s.

V rámci rigorózní práce byl proveden screening látek alkaloidní povahy z některých rostlinných druhů používaných anebo toxikologicky významných v Evropě, především však v tradiční čínské medicíně na inhibici acetylcholinesterázy (AChE). Vhodnou extrakční metodou byly získány sumární extrakty z morfologických částí rostlin *Laurus nobilis* L. (list), *Buxus sempervirens* L. (větvíčky a list), *Lycopodium clavatum* L. (nať), *Nelumbo nucifera* Gaertn. (tyčinky a oddenek), *Fritillaria thunbergii* L. (hlíza), *Fritillaria cirrhosa* L. (hlíza), *Stemona* spp. (kořen) a *Stephania tetrandra* S. Moore (kořen).

Jednotlivé extrakty byly získány digescí a dále sledovány pomocí TLC v neutrální a bazické soustavě na silikagelu na obsah alkaloidů (Dragendorffovo činidlo). Následně byly podrobeny zjištění inhibiční aktivity na AChE pomocí autobiografické metody spolu se standardy (fysostigmin, galanthamin) s použitím TLC (silikagel, jen neutrální vyvíjecí soustava). AChE pocházela z elektrického úhoře, pro barevnou reakci byl zvolen 1-naftylacetát a Fast Blue B Salt; výsledkem pozitivní reakce byly bílé zóny na fialovém pozadí.

Ve většině sledovaných vzorcích rostlinného materiálu byla prokázána přítomnost inhibitorů AChE, kteří vykazovaly různý stupeň aktivity. U některých taxonů bohužel nebyla inhibiční aktivita patrná, ačkoliv obsahují celou řadu látek alkaloidní povahy. Je možné, že tuto aktivitu nemají nebo byla potlačena vlivem reakčních podmínek (nedostatek rostlinného materiálu, přítomnost balastních látek).

Pro další studium se z hlediska intenzity inhibice AChE zdají být vhodné taxony *Buxus sempervirens* L. (větvíčky a listy), *Nelumbo nucifera* Gaertn. (oddenek) a *Fritillaria cirrhosa* L. (hlíza).

Klíčová slova: vyšší rostliny – alkaloidy – acetylcholinesteráza - inhibice

8. ABSTRACT

Nováková, J.: Biological activity of plant metabolites XVII. Influence of alkaloids from several taxons of plants on acetylcholinesterase. Rigorous thesis. Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, 2008. p. 71.

Within the frame of the rigorous thesis, a screening of alkaloids from some botanical taxons used or toxikologically significant in Europe (and also in traditional Chinese medicine) on inhibition of acetylcholinesterase (AChE) was performed. Using a suitable extraction method the summary extracts from morfological parts of *Laurus nobilis* L. (leaf), *Buxus sempervirens* L. (sprigs and leaf), *Lycopodium clavatum* L. (aerial parts), *Nelumbo nucifera* Gaertn. (stamens and bulb), *Fritillaria thunbergii* L. (tuber), *Fritillaria cirrhosa* L. (tuber), *Stemona* spp. (root) a *Stephania tetrandra* S. Moore (root) have been obtained.

Individual extracts were prepared by digestion and further analyzed by TLC on silica gel in neutral and basic system for alkaloid content (Dragendorff-reactant). Inhibitory activities of the extracts and of the standards (physostigmine, galanthamine) were subsequently determined by means of autobiographical method using TLC (silica gel, only neutral developing system). AChE came from electrical conger, 1-naphtyl acetate and Fast Blue B Salt were used for the detection. As the result of a positive reaction, white zones on a purple background could be observed.

In most of examined botanical samples the presence of AChE inhibitors - exhibiting various levels of potency has been demonstrated. Unfortunately, no perceptible inhibitory activity was observed in some taxons, although they contain substances of alkaloid character. It is possible that they really lack the activity or their activity was suppressed by influence of reaction conditions (lack of botanical material, presence of ballast material).

Based on the intensity of AChE inhibition, the taxons *Buxus sempervirens* L. (sprigs and leaf), *Nelumbo nucifera* Gaertn. (stamens

and bulb) and *Fritillaria cirrhosa* L. (tuber) seem to be suitable for further studies.

Keywords: higher plants – alkaloids – acetylcholinesterase – inhibition

9. LITERATURA

- [1] Svaz pacientů České republiky. *Homocystein: je společným klíčem k civilizačním chorobám?* 1.1.2005, [cit. 2006-13-11]. <<http://www.pacienti.cz/clanek.php?id=37>>
- [2] PYDYCHOVÁ, E.: *Alzheimerova nemoc*. Solutio. 2002/2003, [cit. 2007-12-12]. <<http://www.medon-solutio.cz/main.php?>>
- [3] JIRÁK, R. – KOUKOLÍK, F.: *Demence: neurobiologie, klinický obraz, terapie*. 1. vyd. Praha: Galén, 2004. s. 335.
- [4] JOKEŠOVÁ, J.: *Alzheimerova nemoc*. Pharma news. Praha: Skip Servis, **2005**. Vychází jednou za dva měsíce.
- [5] HOLMEROVÁ, I. – JANEČKOVÁ, H. – VAŇKOVÁ, H. – VELETA, P.: Nefarmakologické přístupy v terapii Alzheimerovy demence a praktické aspekty péče o postižené. *Psychiatrie pro praxi*, **2005**, s. 180-182.
- [6] JIRÁK, J.: Současné trendy v biologické terapii Alzheimerovy choroby. *Psychiatrie pro praxi*, **2006**, s. 8-11.
- [7] HOUGHTON, P.J. - HOWES M.-J.: Natural Products and Derivatives Affecting Neurotransmission Relevant to Alzheimer's and Parkinson's Disease. *Neurosignals*, **2005**, s. 6-22.
- [8] BOLLIGER, M. – ERBEN, M. – GRAU, J. – HEUBL, G.: Keře.1. vyd. Praha: Ikar, 1998. s. 24.
- [9] GRAU, J. – JUNG, R. – MÜNKER, B.: Bobulovité, užitkové a léčivé rostliny. 1. vyd. Praha: Ikar, 1996. s. 52.
- [10] PECH, B. – BRUNETON, J.: Alkaloids of *Laurus nobilis*. *Planta Medica*, 2007, s. 560-563.
- [11] JENČA, J. – ZENTRICH, J.: *Herbář léčivých rostlin* 5. díl. 1. vyd. Praha: Eminent, 1997. s. 72-75.
- [12] BALOUN, J. – JAHODÁŘ, L. – LEIFERTOVÁ, I.: Rostliny způsobující otravy a alergie. 1. vyd. Praha: Avicenum, 1989. s. 276.
- [13] KHODZHAEV, B. - SHAKIROV, R.: Accumulation dynamics of *Buxus sempervirens* alkaloids. *Chemistry of Natural Compounds*, **2000**, s. 100-101.

- [14] RAHMAN, A. - ATHAR, A. - SAMINA, N.: New Steroidal Alkaloids from the Roots of *Buxus sempervirens*. *Journal of Natural Products*, **1999**, s. 665-669.
- [15] RAHMAN, A.- DILDAR, A. – ARSHAD, J.: Steroidal alkaloids from leaves of *Buxus sempervirens*. *Phytochemistry*. **1991**, s. 1295-1298.
- [16] KHODZHAEV, B. – PRIMUKHAMEDOV, I. – YUNUSOV, S.: Cyclovirobuxine F - a novel alkaloid from *Buxus sempervirens*. *Khimiya Prirodnikh Soedinenii*. **1985**. s. 718-719.
- [17] KHODZHAEV, B. – PRIMUKHAMEDOV, I. – YUNUSOV, S.: *Buxus sempervirens* alkaloids. *Khimiya Prirodnikh Soedinenii*. **1984**, s. 802-803.
- [18] MOKRÝ, P. – VOTICKÝ, Z.: *Buxus* alkaloids. XX. Alkaloids of *Buxus arborescens* Mill. *Chemicke Zvesti*. **1984**, s. 101-109.
- [19] RAHMAN, A. - ATHAR, A. - SAMINA, N.: New triterpenoidal alkaloids from *Buxus sempervirens*. *Zeitschrift fuer Naturforschung*, **2002**, s. 21-28.
- [20] SAIDKASIMOV, T.: Pharmacology of the alkaloid cyclobuxine D. *Farmakol. Prir. VeschestV*. **1978**, s. 74-78.
- [21] KVALTINOVA, Z. – LUKOVIC, L. - MACHOVA, J. – FATRANSKA, M.: Effect of the steroidal alkaloid buxaminol-E on blood pressure, acetylcholinesterase activity and (3H)quinuclidinyl benzilate binding in cerebral cortex. *Pharmacology*. **1991**, s. 20-25.
- [22] VINCENT, D. – PARANT, M.: Action of the alkaloids of box (*Buxus sempervirens*) on cholinesterases. *Comptes Rendus des Seances de la Societe de Biologie et de Ses Filiales*. **1954**, s. 1878-1880.
- [23] VINCENT, D. – SERO, I. – LAURENT, R.: Pharmacologic considerations on boxwood. *Therapie*, **1948**, s. 29-32.
- [24] HEJNÝ, S. – SLAVÍK, B.: *Květena České republiky* 1. 2. vyd. Praha: Academia, 1997, s. 557.

- [25] CELYSVET. *Plavuň vidlačka (Lycopodium clavatum L.)*. 2005/2007, [cit. 2008-24-6]. <<http://www.celysvet.cz/plavun-vidlacka.php>>
- [26] ACHMATOWICZ, O. - UZIEBLO, W.: Alkaloids of lycopodium (*Lycopodium clavatum L.*). *Roczniki Chemii*, **1938**, s. 88-95.
- [27] RODEWALD, W. - GRYNKIEWICZ, G.: Lycopodium alkaloids. Part VII. The alkaloids of *Lycopodium clavatum L.* *Roczniki Chemii*, **1977**, s. 1271-1275.
- [28] KHOMENOK, V. - GEORGIEVSKII, V.: Alkaloid content in *Lycopodium clavatum* grass. *Rastitel'nye Resursy*, **1974**, s. 382-385.
- [29] ORHAN, I. – OZCELI, B.- ASLAN, S. – KARTAL, M. – SENER, B.: Antioxidant and antimicrobial actions of the clubmoss *Lycopodium clavatum L.* *Phytochemistry Reviews*, **2007**, s. 189-196.
- [30] NIKONOROW, M.: Investigation of the antipyretic action of native medicinal plants. *Acta Polon. Pharm.*, **1939**, s. 23-56.
- [31] ORHAN, I. - KUPELI, E. - SENER, B.: Appraisal of anti-inflammatory potential of the clubmoss, *Lycopodium clavatum L.* *Journal of ethnopharmacology*, **2007**, s. 146-150.
- [32] WIKIPEDIE. *Nelumbo nucifera*. 1996/2008, [cit. 2008-16-8]. <http://en.wikipedia.org/wiki/Nelumbo_nucifera>
- [33] NAVAJO. *Nelumbo nucifera*. 2006/2008, [cit. 2008-5-5]. <<http://nelumbo-nucifera.navajo.cz/>>
- [34] ATLAS KVĚTIN. *Lotos. Nelumbo nucifera Gaertner*. 2000/2008, <<http://www.atlasbotani.eu/index.php?detail&urlback=P3ZuYXpldj1uZWx1bWJvK251Y2lmZXJhJmFtcDt0cmIkPTE&cislo=1771>>
- [35] ARTHUR, H. – CHEUNG, H.: An aporphine alkaloid, nuciferine, from asiatic lotus cultivated in Hong Kong. *Chem Soc*, **1959**, s. 2306.
- [36] TOMITA, M. – WATANABE, Y. – FURUKAWA, H.: Alkaloids of *Nelumbo lucifera* I. *Yakugaku Zasshi*, **1961**, s. 469-473.

- [37] TOMITA, M. – WATANABE, Y. – FURUKAWA, H.: Alkaloids of *Nelumbo lucifera* II. Structure of nornuciferine. *Yakugaku Zasshi*, **1961**, s. 942-947.
- [38] TOMITA, M. – WATANABE, Y. – FURUKAWA, H.: Alkaloids of *Nelumbo lucifera* IV. Isolation of *dl*-armepavine. *Yakugaku Zasshi*, **1961**, s. 1644-1647.
- [39] TOMITA, M. – WATANABE, Y. – FURUKAWA, H.: Alkaloids of *Nelumbo lucifera* V. Alkaloids of Ohga-Hasu . *Yakugaku Zasshi*, **1962**, s. 1458-1460.
- [40] KUNITOMO, J. – NAGAI, Y. – OKAMOTO, Y. – FURUKAWA, H.: Alkaloids of *Nelumbo lucifera* XIV. Tertiary base. *Yakugaku Zasshi*, **1970**, s. 1165-1169.
- [41] FURUKAWA, H.: Alkaloids of *Nelumbo lucifera* IX. Alkaloids of loti embryo. 2. Structure of niferine, a new biscoclaurine type alkaloid. *Yakugaku Zasshi*, **1965**, s. 335-338.
- [42] MACKO, E. – DOUGLAS, B. – WEISBACH, J. – WALTZ, D.: Pharmacology of luciferine and related aporphines. *Arch Int Pharmacodyn*, **1972**, s. 261-273.
- [43] CHEN, J. – GUO, Y. – CHEN, H.: Manufacture and application of *Nelumbo nucifera* leaf extract. *Faming Zhuanli Shenqing Gongkai Shuomingshu*, **2007**, s. 1014-1952.
- [44] KASHIWADA, Y. – AOSHIMA, A. – CHEN, Y. – FURUKAWA, H.: Anti-HIV benzyloquinoline alkaloids and flavonoids from the leaves of *Nelumbo nucifera*, and structure-activity correlations with related alkaloids. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2004**, s. 443-448.
- [45] DAM, T. – DONG, N. – BAN, N.: Effect of alkaloids from lotus leaves on barium chloride-induced arrhythmia in rabbits. *Tap Chi Duoc Hoc*, **1992**, s. 15-19.
- [46] DAM, T. – PHUONG, D.: Sedative effect of senin, a total alkaloid powder from Lotus leaves. *Tap Chi Duoc Hoc*, **2006**, s.19-22.

- [47] WIKIPEDIE. *Řebčík*. 1996/2008, [cit. 2008-4-8]. <<http://encyklopedie.seznam.cz/heslo/496772-rebcik>>
- [48] LI, S. – LIN, G. – CHAN, S.- LI, P.: Determination of the major isosteroidal alkaloids in bulbs of *Fritillaria* by high-performance liquid chromatography coupled with evaporative light scattering detection. *Journal of Chromatography*, **2001**, s. 207-214.
- [49] LI, S. – LIN, G. – CHAN, S.- LI, P. – HO, I.: Simultaneous determination of seven major isosteroidal alkaloids in bulbs of *Fritillaria* by gas chromatography. *Journal of Chromatography*, **2000**, s. 221-228.
- [50] CHOU, T. – CHEN, K.: The alkaloids of the chinese drug pei-mu, Peimine and Peiminine. *Chin J Physiol* **6**, **1932**, s. 265-270.
- [51] ZHANG, J. – LAO, A. – XU, R.: Two new steroidal alkaloids, dongbeinine and dongbeirine, from *Fritillaria thunbergii* Miq. var. *chekiangensis*. *Chinese Chemical Letters*, **1993**, s. 321-322.
- [52] LI, P. - LI, S. – ZENG, L.: Comparative studies on quantitative methods for chromophore-lacking total alkaloids in Beimu. *Zhongguo Yaoxue Zazhi*, **2002**, s. 614-617.
- [53] KITAJIMA, J. – NODA, N. – IDA, Y. – KAWASAKI, T.: Steroid alkaloids of fresh bulbs of *Fritillaria thunbergii* Miq. and of crude drug “Bai-Mo” prepared therefrom. *Heterocycles*, **1981**, s. 791-796.
- [54] KITAJIMA, J. – KOMORI, T. - KAWASAKI, T.: Studies on the constituents of crude drug “*Fritillariae* Bulbus”. New sterol glycosides from aerial parts of *Fritillaria thunbergii* Miq. *Yakugaku Zasshi*, **1982**, s. 1009-1015.
- [55] QIAN, B. – XU, H.: Antitussive and sedative effects of peimine and peiminine. *Acta Pharm Sin*, **1985**, s. 306-308.
- [56] WIKIPEDIE. *Stemona*. 1996/2008, [cit. 2008-6-4]. <<http://en.wikipedia.org/wiki/Stemona>>

- [57] Department of systematic and evolutionary botany. *Stemona*. [cit. 2007-12].
<<http://www.phytochemie.botanik.univie.ac.at/herbarium/stemona.htm>>
- [58] Dendrologie online. *Stemonaceae*. 2006/2007, [cit. 2007-12-2].
<<http://databaze.dendrologie.cz/index.php?menu=3&id=265>>
- [59] SUZUKI, K.: Alkaloids of *Stemona*. V. A new alkaloid, isostemonidine, from the roots of *Stemona ovata* Nakai. *Pharm Soc Jpn*, **1934**, s. 567-572.
- [60] LOBSTEIN, E. – GRUMBACH J. : An alkaloid extracted from the root of *Stemona tuberosa* Loureiro. *Hebd Seance Acad Sci*, **1932**, s. 386-389.
- [61] SUZUKI, K.: Alkaloids of *Stemona*. VI. An alkaloid, tuberostemonine, from the root of *Stemona tuberosa* Loureiro. *Pharm Soc Jpn*, **1934**, s. 573-579.
- [62] KONDO, H. – SUZUKI, K. – SATOMI, M.: The bases of *Stemona tuberosa* Loureiro. VII, VIII. Tuberostemonine of the root of *Stemona tuberosa* Loureiro. *Pharm Soc Jpn*, **1939**, s. 443-450.
- [63] KONDO, H. – SATOMI, M. – ODERA, T.: *Strmina* alkaloids. XVI. Alkaloid from the root of *Stemona tuberosa*. *Annu Rep*, **1954**, s. 99-102.
- [64] HARADA, H. – IRIE, H. – MASAKI, K. – UEYO, S.: The stereochemistry and absolute configuration of stenin and tuberostemonine. *Chem Commun*, **1967**, s. 460-462.
- [65] EDWARDS, O. – FENIAK, G. – HANDA, K.: The alkaloids of *Stemona sessilifolia*. *Can J Chem*, **1962**, s. 455-462.
- [66] XU, R. – LU, Y. – CHU, J. – NAOKI, H.: Studies on some new *Stemona* alkaloids. *Tetrahedron*, **1982**, s. 2667-2670.
- [67] IRIE, H. – MASAKI, N. – OHNO, K.: The crystal structure of new alkaloid, stemofoline, from *Stemona japonica*. *Chem Commun*, **1970**, s. 1066.

- [68] WANG, CH.: Compound sophora flavescens insecticide manufactured from natural plants. *Faming Zhuanli Shenging Gongkai Shuomingshu*, **2007**.
- [69] ZHANG, J. – AN, W. – WU, J.: A series of cosmetics effective in treating acne.
- [70] FRANKOWSKI, K. – AUBE, J.: Total synthesis of neostenine and Stemona alkaloid-inspired libraries. *American Chemical Society*, **2007**.
- [71] FRANKOWSKI, K. – AUBE, J.: Compound libraries based on the Stemona alkaloid skeleton. *American Chemical Society*, **2007**.
- [72] WIKIPEDIE. *Stephania tetrandra*. 1996/2008, [cit. 2008-15-6]. <http://en.wikipedia.org/wiki/Stephania_tetrandra>
- [73] HU, T. – ZHAO, S.: The structures of oxofangchirine and stephenanthrine isolated from *Stephania tetrandra* S. Moore. *Nanjing Coll. Pharm.*, **1986**, s. 29-34.
- [74] HE, L.: TLC separation and densitometric determination of twelve isoquinoline alkaloids. *Zhongcaoyao*, **1983**, s. 395-398.
- [75] CHEN, K. - CHEN, A.: The alkaloids of han-fang-chi. *Biol Chem*, **1935**, s. 681-685.
- [76] CHUANG, C. – HSING, C. – KAO, Y. – CHANG, K.: The alkaloids of han-fang-chi. Fangchinoline, a demethyltetrandrine. *Chem Ber*, **1939**, s. 519-525.
- [77] HSING, C. – CHANG, C.: Constitution of fangchinoline. *Sci Sin*, **1958**, s. 59-63.
- [78] FENG, Y. – CHEN, H.: Pharmacognostic and chemical identification of Fang Ji (*Stephania tetrandra*). *Chin J Pharm Anal*, **1985**, s. 28-31.
- [79] YANG, Y.: Thin layer chromatography-UV-spectrophotometry for tetrandrine in *Stephania tetrandra*. *Chin Trad Herb Druha*, **1985**, s. 281.

- [80] LIU, X. – ZHANG, H. – TAN, Z. – SUN, L.: Microcalorimetric study on the bacteriostatic activity of isoquinoline alkaloids. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, **2007**, s. 907-911.
- [81] NOMURA, M. – YAMAZAKI, R. – TAKAYA, M.: Inhibition of tetrandrine on epidermal growth factor-induced cell transformation and its signal transduction. *Anticancer Research*, **2007**, s. 3187-3194.
- [82] WEI, J. – LIU, B. – WANG, L.: Synergistic interaction between tetrandrine and chemotherapeutic agents and influence of tetrandrine on chemotherapeutic agent-associated genes in human gastric cancer cell lines. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, **2007**, s. 703-711.
- [83] WU, S.: Tetrandrine inhibits proinflammatory cytokines, iNOS and COX-2 expression in human monocytic cells. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, **2007**, s. 59-62.
- [84] CHEN, CH. – CHOU, Z. – SHEN, Y.: Antiinflammatory agents containing defined Radix Stephaniae tetrandrae extracts. *Jpn. Kokai Tokkyo Koho*, **2004**, s. 30.
- [85] WANG, J. – CHEN, Z. – ZHAI, H.: Determination of Tetrandrine and Demethyltetrandrine in Stephania tetrandra S. Moore by capillary electrophoresis with high frequency conductivity detection. *Fenxi Shiyanshi*, **2004**, s. 62-66.
- [86] HUANG, Y. – HONG, CH.: Tetrandrine. *Cardiovascular Drug Reviews*, **1998**, s. 1-15.
- [87] ZHAO, X. – CUI, X. – CHEN, B. – ZHANG, Y.: Tetrandrine, a bisbenzylisoquinoline alkaloid from Chinese herb Radix, augmented the hypnotic effect of pentobarbital through serotonergic system. *European Journal of Pharmacology*, **2004**, s. 101-105.
- [88] CHANG, T. – FANG, T. – LU, F.: The potentiating effect of diphenhydramine upon the analgesic action of han-fang-chi and some other analgesics. *Shengli Xuebao*, **1957**, s. 133-141.

- [89] OGINO, T. – YAMAGUCHI, T. – SATO, S.: Isolation of berbamine alkaloids from as acetylcholine esterase inhibitors. *Jpn. Kokai Tokkyo Koho*, **1992**, s. 10.
- [90] OGINO, T. – YAMAGUCHI, T. – SATO, T.: Studies on inhibitory activity against acetylcholinesterase of new bisbenzylisoquinoline alkaloid and its related compounds. *Heterocycles*, **1997**, s. 2253-2260.
- [91] STAHL, E.: Thin – Layer Chromatography. A Laboratory Handbook. 2nd edition. Springer-Verlag. New York, 1969. s. 873.
- [92] MARSTON, A. - KISSLING, J. - HOSTETTMANN, K.: A Rapid TLC Bioautographic Method for the Detection of Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase Inhibitors in Plants. *Phytochem. Anal.*, **2002**, č. 13, s. 51-54.
- [93] SALAH. S. M. – JÄGER. A. K.: Screening of traditionally used Lebanese herbs for neurological activities. *J. Ethnopharmacol.* **2005**, s. 145-149.
- [94] PIERCE CONSERVATION DISTRICT. *Common Poisonous Plants of Western Washington Which Affect Livestock*. 2005/2008, [cit. 2008-8-1]. <http://www.piercecountycd.org/tip_toxicplnts_p.html>

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

V Hradci Králové, dne 5.5.2008