

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

---

VLIV OBSAHOVÝCH LÁTEK VYBRANÝCH TAXONŮ VYŠŠÍCH ROSTLIN  
NA TROMBOCYTÁRNÍ AGREGACI

Doktorská disertační práce

Mgr. Eliška Štejnarová

Školitel: Doc. RNDr. Lubomír Opletal, CSc.

Studijní program: Farmacie

Obor: Toxikologie přírodních látek

Hradec Králové, červen 2010

## PODĚKOVÁNÍ

V úvodu této práce bych ráda poděkovala:

*Doc. RNDr. Lubomíru Opletalovi, CSc.*, svému školiteli, za odborné vedení a připomínky při sepisování práce,

*Doc. PharmDr. Danielu Junovi, PhD.* z Centra pokročilých studií Fakulty vojenského zdravotnictví UO v Hradci Králové, za uvedení do problematiky trombocytární agregace,

*RNDr. Věře Samkové, PhD.* za konzultace o verifikaci použité rostliny,

*Doc. ing. Kamilovi Kučovi, PhD.* z téhož pracoviště za pomoc při dokončení této práce,

*Mgr. Vítu Kolečkářovi*, za pomoc během společného postupu izolace rostlinných metabolitů,

*PharmDr. Zuzaně Řehákové PhD.* za uvedení do problematiky FRAP,

*Doc. PharmDr. Jiřímu Kunešovi, CSc.* za změření a interpretaci NMR spekter,

*RNDr. Vlastimilu Dohnalovi, Ph.D.* za změření MS spekter,

*Ing. Lucii Cahlíkové, PhD.* za interpretaci MS spekter a cenné připomínky v oblasti strukturní chemie,

*p. Ireně Rejlové* za technickou spolupráci při separaci látek pomocí HPLC,

*kolektivu katedry farmaceutické botaniky a ekologie* za výbornou atmosféru při práci,

*PharmDr. Miloslavu Hronkovi, Ph.D.*,

*Oddělení klinické hematologie 2. interní kliniky Fakultní nemocnice v Hradci Králové* (jmenovitě *p.*

*Zdeňce Pavlíkové*), za odběry a analýzu krve.

Tato práce byla podpořena finančními prostředky grantu IGA UK č. 124/2005/B-BIO/FaF a prostředky projektu Specifického vysokoškolského výzkumu 2010-SVV-2010-261-002.

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

Eliška Štejnarová

Klášter Hradiště nad Jizerou 2010

## OBSAH

1.	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK .....	6
2.	ÚVOD.....	8
3.	CÍL PRÁCE .....	11
4.	TEORETICKÁ ČÁST .....	12
4.1.	Morfologie a vznik trombocytů .....	12
4.2.	Funkce trombocytů.....	13
4.3.	Hemostáza .....	14
4.4.	Antiagregancia .....	25
4.5.	Seskviterpenové laktony čeledi Asteraceae .....	34
4.6.	<i>Leuzea carthamoides</i> L.....	45
5.	MATERIÁL A METODY .....	51
5.1.	Chemikálie, rozpouštědla, standardy .....	51
5.2.	Příprava chromatografických adsorbentů a sušidel .....	52
5.3.	Destilace rozpouštědel.....	53
5.4.	Sloupcová chromatografie .....	53
5.5.	Odpařování frakcí.....	53
5.6.	Sušení extraktů, frakcí a izolovaných látek .....	53
5.7.	Tenkvrstvá chromatografie (TLC) orientační .....	54
5.8.	Tenkvrstvá chromatografie (TLC) preparační .....	54
5.9.	Měření teploty tání .....	54
5.10.	Preparativní HPLC .....	54
5.11.	Nukleární magnetická rezonance .....	55
5.12.	Hmotnostní spektrofotometrie .....	55
5.13.	Příprava lyofilizovaných rostlinných extraktů .....	56
5.14.	Metodika měření agregace destiček .....	56

5.15.	Testování rostlinných extraktů, jednotlivých výtřepků a frakcí na antiagregační aktivitu .....	58
5.16.	Statistické hodnocení agregace .....	59
5.17.	Měření antioxidační aktivity – DPPH test .....	59
5.18.	Měření antioxidační aktivity – FRAP test.....	61
6.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	62
6.1.	Výsledky antiagregačního screeningu rostlin čeledi Asteraceae .....	62
6.2.	Extrakce listů parchy saflorové .....	64
6.3.	Sloupcová chromatografie přečištěného CHCl <sub>3</sub> výtřepku.....	66
6.4.	Sloupcová chromatografie spojené frakce 5 .....	69
6.5.	Separace frakce 6.....	70
6.6.	Sloupcová chromatografie spojené frakce 7 .....	70
6.7.	Analýza subfrakce 7–4 .....	72
6.8.	Čištění látek LC-1, LC-2, LC-3.....	72
6.9.	Separace a čištění krystalů z frakcí 2, 4 a 5.....	72
7.	VÝSLEDKY .....	73
7.1.	Analýza izolovaných látek .....	73
7.2.	Antiagregační aktivita izolovaných látek.....	79
7.3.	Výsledky antioxidačního DPPH testu .....	79
7.4.	Výsledky antioxidačního FRAP testu .....	79
8.	DISKUSE.....	80
9.	SOUHRN .....	92
10.	ABSTRAKT .....	94
11.	ABSTRACT.....	96
12.	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....	98
13.	SEZNAM AUTORSKÝCH A SPOLUAUTORSKÝCH PRACÍ.....	124
14.	PŘÍLOHY.....	127

## 1. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AA	arašidonová kyselina
ADP	adenosindifosfát
AMP	adenosinmonofosfát
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
ASA	acetylsalicylová kyselina
ATP	adenosintrifosfát
CNS	centrální nervový systém
COL	kolagen
COX-2	cyklooxygenasa-2
DPPH	2,2'difenyl-1-pikrylhydrazyl radikál
d. f. III	destičkový faktor III
EEG	elektroencefalogram
FRAP	ferric reducing antioxidant power
GIT	trávicí ústrojí
cGMP	cyklický guanosinmonofosfát
HMWK	vysokomolekulární kininogen
5-HT	5-hydroxytryptamin, serotonin
LOX	lipoxygenasa
LT	leukotrien
NF-κB	Nukleární faktor-κB
NO	oxid dusnatý
iNOS	inducibilní syntéza oxidu dusnatého
t-PA	tkáňový faktor aktivující plazminogen
u-PA	urokinásový faktor aktivující plazminogen
PAF	faktor aktivující destičky
PAI-1	inhibitor aktivátoru plazminogenu 1
PAI-2	inhibitor aktivátoru plazminogenu 2
PDGF	destičkový růstový faktor
PG	prostaglandin
PGI <sub>2</sub>	prostacyklin
PPP	plazma bez destiček
PRP	plazma bohatá na destičky

ROS	reaktivní formy kyslíku
SOD	superoxiddismutasa
TGF- $\beta$	transformující růstový faktor- $\beta$
TNF- $\alpha$	tumor necrosis factor (faktor nekrózy tumoru)
TR	trombin
TX	tromboxan
vWF	von Willebrandův faktor

## 2. ÚVOD

Zatímco v první polovině minulého století byla hlavním problémem infekční onemocnění v čele s tuberkulózou, v posledních padesáti letech dochází ke zřetelnému nárůstu tzv. civilizačních chorob, resp. zhoubného bujení a kardiovaskulárních onemocnění. Z epidemiologického hlediska se jedná o významně otevřenou kapitolu, které se věnuje mnoho autorů (např. Conti, 2000; Bjorntorp, 2000). Na jejich následky ročně zemře více než 33 miliónů lidí. Obecně se dá říci, že se jedná o choroby, které jsou spojeny s životním stylem (Schnall, 2000) především moderní doby a větších měst (Schwella, 2000). Hlavními příčinami jejich vzniku jsou průmyslová potravinářská velkovýroba a druhotně i příjem kaloricky bohatých potravin zejména tučných, slaných a přeslazených jídel, které jsou převážně z živočišných zdrojů, dále pak významný úbytek fyzického pohybu, nadměrná konzumace jídla, alkoholu a cigaret a zvýšený stres – v důsledku těchto negativních vlivů se vyvíjí především metabolický syndrom, následně diabetes mellitus 2. Typu a následuje postižení kardiovaskulárního systému (Azcona, 2000; Betlejewski, 2007; Camacho, 2000; Garber, 2000; Gerber 2002; Martin 2000; Perry, 2000; Ravussin, 2000).

V důsledku toho dochází také kromě jiných negativních projevů ke vzniku oxidačního stresu, který je definován jako nerovnováha mezi vznikem a odstraňováním reaktivních forem kyslíku (ROS) (Štípek, 2000). Je vyvolán zvýšenou tvorbou kyslíkových radikálů (nastává při celé řadě patologických stavů) nebo snížením kapacity antioxidační ochrany (snížená aktivita enzymů, snížení hladin jednotlivých nízkomolekulárních antioxidantů a redukčních ekvivalentů).

Tvorba ROS je nevyhnutelnou součástí aerobního metabolismu. Jeho největším generátorem v těle je sám dýchací řetězec mitochondrií, a pak také aktivované fagocyty, které pomocí enzymu NADPH oxidasy produkují superoxid proti mikrobům a uplatňuje se také v průběhu zánětlivé reakce. Superoxid spontánně nebo působením antioxidačního enzymu superoxiddismutasy (SOD) přechází na peroxid vodíku. Ten je sám o sobě stabilní, ale vyznačuje se reaktivitou s redukovanými redoxně aktivními přechodnými kovy (v těle jsou to atomy železa nebo mědi). Tato tzv. Fentonova reakce poskytuje vysoce reaktivní hydroxylový radikál, který považujeme za vlastní agens, startující oxidační



poškození biomolekul organismu. Radikálové poškození má často podobu řetězové reakce, neboť volný radikál se typicky stabilizuje vytržením elektronu z jiné struktury, čímž ji přemění na jiný radikál a proces pokračuje. Všechny typy biomolekul mohou být, a reálně také během lidského života jsou, poškozovány oxidací. Nedostatečná eliminace volných radikálů může v organismu vyvolat řadu nežádoucích účinků. Řetězová oxidace polynenasycených mastných kyselin v lipidech vede k lipoperoxidaci (žluknutí tuků), oxidace proteinu s enzymatickou funkcí může způsobit narušení, nebo úplné vypnutí jeho katalytické schopnosti a oxidace DNA vede k mutaci. Narušení genetické informace a poškození kontrolních a regulačních procesů pak může přispět až ke vzniku zhoubných novotvarů (Štípek, 2000).

ROS hrají tedy významnou úlohu v rozvoji závažných zánětlivých a degenerativních onemocnění, jako je ateroskleróza, diabetes mellitus, hypertenze, chronické střevní záněty, některé typy zhoubného bujení, ischemicko-reperfuční poškození srdce a jiných orgánů, mozkové trauma/ischemie, Parkinsonova nemoc, Alzheimerova nemoc atd. (Pláteník, 2009).

Hlavními chorobami současnosti jsou tedy zhoubné novotvary a postižení kardiovaskulárního systému. Zde jsou právě hledány látky se schopností tento degenerativní proces zabrzdit (Frusciante, 2000; Eskin, 2006). Nejvýhodnější by bylo užívání těchto přípravků preventivně, jako doplňků stravy. Jedním z perspektivních zdrojů je čeleď Asteraceae, která obsahuje mnoho významných léčivých rostlin s hlavními obsahovými látkami, jako jsou flavonoidy různých struktur, seskviterpenové laktony, polysacharidy ad. látky. Taxony této čeledi jsou významné také ve střední Evropě. Před 50 lety jim začala být věnována významná pozornost na Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR v Praze (seskviterpenové laktony) především z chemotaxonomického hlediska a vlivu na bezobratlé živočichy. Minimálně 15 let se jimi také zabývá pracovní tým na Farmaceutické fakultě UK v Hradci Králové (Chobot, 2003; Kolečkář, Brojerová, 2008; Kolečkář, Opletal, 2008; Opletal, 1997). Biologické účinky a toxicita látek rostlin této čeledi jsou částečně známé, ale probíhá výzkum na další biologické účinky, které doplňují pohled na případný terapeutický zájem nebo toxicitu.

Proagregační a antiagregační působení taxonů této čeledi však není příliš podrobně prozkoumáno. Proto bylo testováno 32 taxonů čeledi Asteraceae a za využití metody bioguided assay byl vybrán nejefektivnější taxon – *Leuzea carthamoides* (Asteraceae). Aktivní látky byly izolovány opět za využití bioguided assay a byla u nich stanovena antiagregační aktivita ( $IC_{50}$ ) s použitím agonistů: COL, AA, ADP, TR.

### 3. CÍL PRÁCE

1. provést sběr vzorků vybraných taxonů z čeledi Asteraceae, rostoucích anebo pěstovaných na území České republiky (léčivé rostliny, rostliny využívané potravinářsky, speciální plodiny, často se vyskytující plevely), katalogizovat tyto vzorky, usušit a adjustovat,
2. připravit extrakty 70% ethanolem z 5 g sušených rostlinných částí, předčistit je a lyofilizovat (pro prvotní screening na antiagregační aktivitu),
3. provést stanovení antiagregační aktivity u těchto vzorků za použití agonistů COL, AA, ADP, TR,
4. vybrat perspektivní taxon, připravit z něho sekvenční extrakty a metodou bioguided assay zjistit nejaktivnější typ extraktu,
5. tento extrakt získaný z většího množství materiálu (10 kg suchého rostlinného materiálu) chromatograficky rozdělit s cílem izolace aktivních látek opět za využití bioguided assay,
6. izolované látky vyčistit, podílet se na strukturní analýze a stanovit u nich antiagregační aktivitu ( $IC_{50}$ ) s použitím agonistů COL, AA, ADP, TR a  $EC_{50}$  aktivitu antioxidační (DPPH test, FRAP test),
7. zhodnotit případnou toxicitu izolovaných látek s ohledem na použití vegetabilních částí parchy saflorové.

## 4. TEORETICKÁ ČÁST

### 4.1. Morfologie a vznik trombocytů

Z hlediska morfologie jsou trombocyty bezjaderné a bezbarvé krevní elementy mající tvar nepravidelných okrouhlých disků o průměru 2 – 4  $\mu\text{m}$  a tloušťce 0,5 – 1  $\mu\text{m}$ . U zdravého člověka je průměrný počet krevních destiček v rozmezí  $150 - 300 \times 10^9 \text{l}^{-1}$  krve a nezávisí na věku. Asi třetina se jich nachází ve slezině, v sinusech, nebo mezi buňkami pulpy. Zbylá část volně cirkuluje v oběhu, přičemž neustále dochází k výměnám destiček ze sleziny s volně cirkulujícími (Trojan, 1994).

Trombocyty vznikají z megakaryocytů kostní dřeně, což jsou velké (35 – 160  $\mu\text{m}$ ) polyploidní buňky pocházející z pluripotentní kmenové buňky kostní dřeně. V dřeni se těchto polyploidních buněk nachází malé množství. Vývoj megakaryocytů je řízen tak, aby nedocházelo k větším výkyvům v počtu destiček. Regulujícími tělovými faktory jsou některé cytokiny a trombopoetin. Zanikající trombocyty jsou pohlcovány makrofágy v játrech, plicích a slezině (Silbernagl, 1993; Trojan, 1994). Jejich doba života v oběhu je 8 – 11 dní. Zánik je v rovnováze s tvorbou a proto jejich počet kolísá jen velmi málo (Lüllman, 2002).

Destičky jsou elementy s omezenou nebo žádnou schopností proteosyntézy. Obsahují poměrně malý počet mitochondrií. Jejich metabolismus probíhá s velkou intenzitou, v cytoplasmě i organelách mají bohaté enzymatické vybavení. Hlavním zdrojem jejich energie je glukosa, kterou získávají z plazmy. V cytoplasmě destiček se nachází shluky zrněk zásobního glykogenu. Obsah ATP v destičkách je 150  $\times$  větší než v erythrocytech (Trojan, 1994).

Tvar cirkulujících trombocytů je udržován marginálními mikrotubuly, které plní funkci buněčného skeletu. V cytoplasmě se rozvětňuje rozsáhlý spongiózní systém vzájemně spojených kanálků a vesikul. Tento systém komunikuje s povrchem destiček a je důležitý pro jejich sekreční funkci. V destičkách se nacházejí tři typy granul obsahující látky nezbytné pro jejich vlastní funkci i pro další děje. Densní neboli skladovací granula obsahují ADP, ATP, vápník a 5-HT. Druhým typem granul jsou početnější  $\alpha$ -granula obsahující směs proteinů pocházejících z megakaryocytů a dále látky získané z plazmy (destičkový faktor IV, který je antagonistou heparinu, PDGF, trombospondin,  $\beta$ -

tromboglobulin, cytokin TGF- $\beta$ , fibrinogen, vWF, faktor V, albumin, protilátky typu IgG a inhibitor aktivátorů plasminogenu). Třetím typem destičkových granul jsou lysosomy, které obsahují enzymy štěpící bílkoviny a sacharidové komplexy.

V trombocytární cytoplazmě je dále přítomen denzní tubulární systém, který patří k organelám a představuje zbytky hladkého endoplazmatického retikula megakaryocytů. Je nositelem enzymů syntetizujících deriváty AA a je jedním ze zdrojů vápníku pro biochemické reakce.

Trombocyty poskytují také fosfolipidy (destičkový faktor III) představující 70 % celkového obsahu lipidů v destičkách. Fosfolipidy jsou termostabilní a jsou poutány především v povrchové membráně. Při hemokoagulaci se na ně vážou koagulační faktory. Jsou také zdrojem AA, která je výchozí látkou pro syntézu agregačně působícího TXA<sub>2</sub> (Trojan, 1994). Mikrotubulární cytoskelet destiček také obsahuje kontraktilní bílkoviny aktin a myosin, které se uplatňují při změně tvaru aktivovaných destiček a při uvolňování obsahu granul. Dalším kontraktilním proteinem destiček je trombostenin (Silbernagl, 1993; Trojan, 1994).

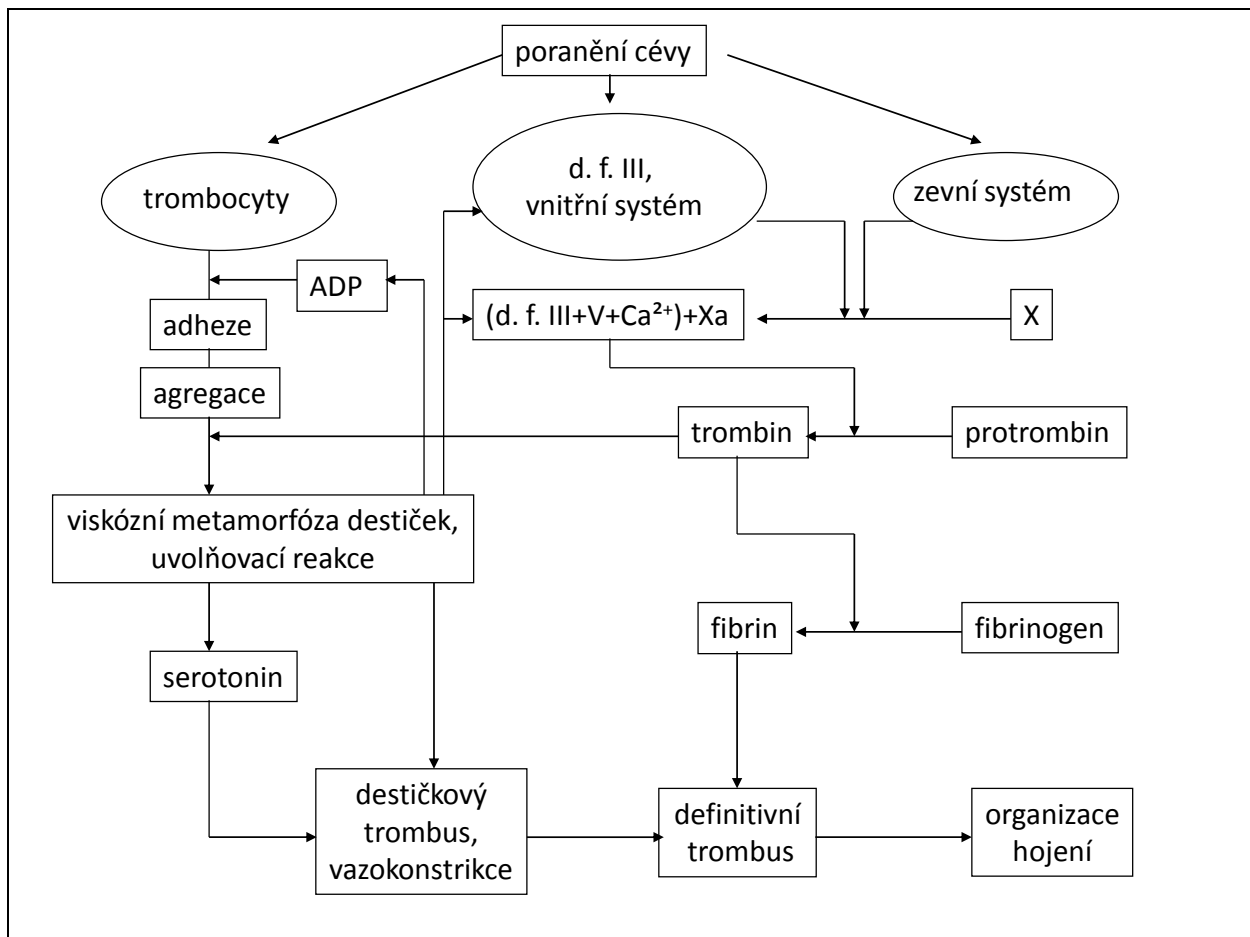
#### **4.2. Funkce trombocytů**

Trombocyty se uplatňují při zánětlivých procesech, při změnách permeability kapilár, při odstraňování cizorodých částic, virů a bakterií i při rejekci transplantátu a jsou součástí hemostatické složky imunitních reakcí. Dále jsou vehikulem pro celou řadu látek, které jsou na jejich povrch adsorbovány. PDGF (z  $\alpha$ -granul) stimuluje migraci a dělení buněk hladké svaloviny stěny cév a fibroblastů a tím se uplatňuje při udržování cévní stěny a při hojení poranění. Je také silným stimulatorem polymorfonukleárních leukocytů, na které působí chemotakticky a indukuje fagocytózu. Chemotaktickými účinky se vyznačují také destičkový faktor IV a TGF- $\beta$ . Nejdůležitější funkcí destiček je však ochrana organismu před ztrátou krve. Zde se uplatňují jak biochemicky, tak i mechanicky (Trojan, 1994).

### 4.3. Hemostáza

Hemostáza neboli zástava krvácení je životně důležitý děj, který chrání organismus před nadměrnou ztrátou krve. Hemostáza spočívá ve vzájemné souhře několika dějů. (Schéma 1)

1. reakce cév v místě poranění (vazokonstrikce),
2. činnost krevních destiček (adheze, agregace, vytvoření hemostatické zátky a uvolnění granul),
3. srážení krve – hemokoagulace – (vzájemná reakce plazmatických faktorů, končící vytvořením fibrinu a definitivního trombu),
4. zhojení poranění (odstranění trombu fibrinolýzou, zhojení za pomoci fibroblastů a hladkých svalových buněk) (Trojan, 1994).



Obr. 1 Schema zástavy krvácení (Silbernagl, 1993)

### 1) Vazokonstrikce

V místě poranění nastává rychlá vazokonstrikce, která má charakter přímé odpovědi cévní stěny na poškození. Sousední cévy reagují patrně na základě sympatických vazokonstrikčních reflexů. Dochází k uvolnění serotoninu z destiček, který má silné vazokonstrikční účinky, dále se uvolňují i jiné vazoaktivní aminy (adrenalin) a fibrinopeptidy, které vznikají odštěpováním při přeměně fibrinogenu na fibrin (Trojan, 1994). Největší vazokonstrikce nastává ale vlivem myogenní reakce cév na poranění. Proces vazokonstrikce hraje zásadní roli v zástavě krvácení zejména u větších cév (Martínková, 1990; Silbernagl, 1993).

## 2) Činnost krevních destiček

Při porušení kontinuity cévní stěny je činnost destiček primárním dějem, který spočívá v jejich adhezi, změně tvaru, sekreci obsahu granul a agregaci. Bezprostředně po narušení cévy adherují trombocyty na subendoteliální matrix. Adheze je zprostředkována kolagenem a vWF, který se váže na receptory destiček a poutá je tak k subendotelu. Kolagen trombocyty silně stimuluje. Destičky formují tzv. bílý trombus, který je provizorní hemostatickou zátkou zejména v mikrocirkulaci (kapiláry, malé venuly). Aktivované adherující destičky mění tvar díky činnosti cytoskeletu a kontraktilních bílkovin – ztrácejí svůj plošně diskovitý tvar a stávají se sférickými. Tato změna nastává do 2 sekund. Do okolí vysílají dlouhé a tenké výběžky – filopodie. Tvarově změněné destičky se shlukují a přimykají k sobě vlivem aktivátoru trombinu, který vzniká po uvolnění tkáňového tromboplastinu při srážení krve v místě narušení cévy. Dochází tak k procesu agregace, čehož se účastní i další látky; např. ADP uvolňované z poškozených endotelových buněk a erytrocytů. ADP je nejmohutnějším stimulem agregace. Jeho vlivem také dochází na membráně aktivovaných trombocytů k expozici receptorů pro fibrinogen, který se na ně v přítomnosti dvojjazvných iontů váže a jeho dimerní molekuly vzájemně spojují shlukující se trombocyty. Současně se také z destičkových fosfolipidů uvolňuje AA, která je metabolizována enzymy pocházejícími z denzního tubulárního systému trombocytů na labilní endoperoxidy a  $\text{TXA}_2$ . Jejich účinek je proagregační a současně i vazokonstrikční. Proces adheze, změny tvaru a dosavadní tzv. primární agregace, která je spojená s mírným zvýšením trombocytárních  $\text{Ca}^{2+}$  iontů, jsou vratné. Destičky se mohou ještě rozvolnit a rozptýlit se v krvi. Sekundární, ireverzibilní agregace, spojená s uvolňovací reakcí, při které dochází k secernaci jejich granul, vyžaduje vyšší koncentraci  $\text{Ca}^{2+}$ . Činností aktivovaných kontraktilních proteinů jsou shromážděna granula ve středu destičky, jejich membrána splyne se stěnami kanikulárního systému a obsah granul se vylévá do vnějšího prostředí mimo destičku. Z denzních granul je secernováno ADP. Agregaci dále podporují i adhezivní molekuly trombospondinu z  $\alpha$ -granul a také narůstající množství TR vznikající při koagulaci. Při pozdějším úplném rozpadu a splynutí destiček (tzv. viskózní metamorfóze) je uvolněn i obsah lysosomálních granul. Mezi další látky vyvolávající agregaci patří



adrenalin, serotonin, různé imunitní komplexy a PAF uvolňovaný z aktivovaných leukocytů. Agregace destiček může nastat také v případě aktivace komplementu při imunitní zánětlivé reakci. Reverzibilní agregace slouží k uzavírání stále se tvořících míst prostupu v cévním endotelu a k zacelování malých defektů v subendotelu vlivem PDGF z  $\alpha$ -granul. Ireverzibilní agregace je pak základem hemostatické funkce destiček. Provizorní zátka vzniklá z destiček potřebuje pro svou konsolidaci a stabilizaci ještě fibrinová vlákna, která se v trombu z destiček zachycují (Trojan, 1994).

Destičková agregace je děj s tzv. dvousměrnou regulací. Oproti výše popsanému procesu mají destičky také opačný systém regulace, který zabraňuje jejich spontánní adhezi a agregaci. Jsou to látky (inhibitory agregace) zvyšující aktivitu adenylatcyklasy a obsah cAMP a snižující intracelulární koncentraci  $Ca^{2+}$ . Nejúčinnějším blokátorem agregace je  $PGI_2$  uvolňovaný endotelovými buňkami stejně jako NO. Obě látky inhibují agregační funkce trombocytů a mají také vazodilatační účinek (Murray, 2000). Sekreci  $PGI_2$  a NO stimuluje ADP uvolňovaný z destiček (a vyvolávající jejich agregaci) a dále TR, vzniklý při aktivaci koagulační kaskády. To působí jako zpětná vazba, která omezí další agregaci a adhezi destiček, vazospasmus a také tvorbu trombu. Buňky endotelu navíc štěpí ADP na AMP a adenosin. Adenosin má, kromě jiných efektů, silné vazodilatační účinky. Pokud je nějakým způsobem (např. při ateroskleróze) porušena normální funkce endotelu, uvolňují se NO a  $PGI_2$  v nižším množství než je obvyklé a dochází k nadměrné hyperaktivní činnosti trombocytů a tím k riziku tromboembolických komplikací (Martínková, 1990; Trojan, 1994).

### **3) Hemokoagulace**

Srážení krve (hemokoagulace) je souborem enzymatických reakcí, kdy za spoluúčasti plazmatických proteinů, fosfolipidů a iontů dochází k přeměně tekuté krve na nerozpustný gel.

Smyslem celého systému interakcí koagulačních faktorů je přeměna rozpustného fibrinogenu na nerozpustný polymer fibrin účinkem TR. Fibrinová vlákna zpevňují primární trombocytární zátku a trombus se tak stane hustším, mechanicky odolnějším. Látky potřebné pro vytvoření TR pocházejí z plazmy, destiček a tkání. Aktivní koagulační faktory jsou obvykle charakteru proteolytických

enzymů, v jejichž aktivním centru se nachází zpravidla serin s histidylovými zbytky. Označují se proto jako serinové proteasy. Sled dějů, který vede k vytvoření protrombinu je kaskádovitý. Spočívá vždy ve štěpení proenzymu na aktivní enzym enzymem aktivovaným v předchozí reakci. Navíc v celé kaskádě dochází postupně k zesilovacímu (amplifikačnímu) efektu, kdy aktivace nanogramů enzymů na počátku vyústí v přeměnu miligramů fibrinogenu na fibrin. Výsledné zesílení je tedy až do řádu  $10^6$ . Pro všechny reakce je společným znakem nezbytná přítomnost  $\text{Ca}^{2+}$  iontů.

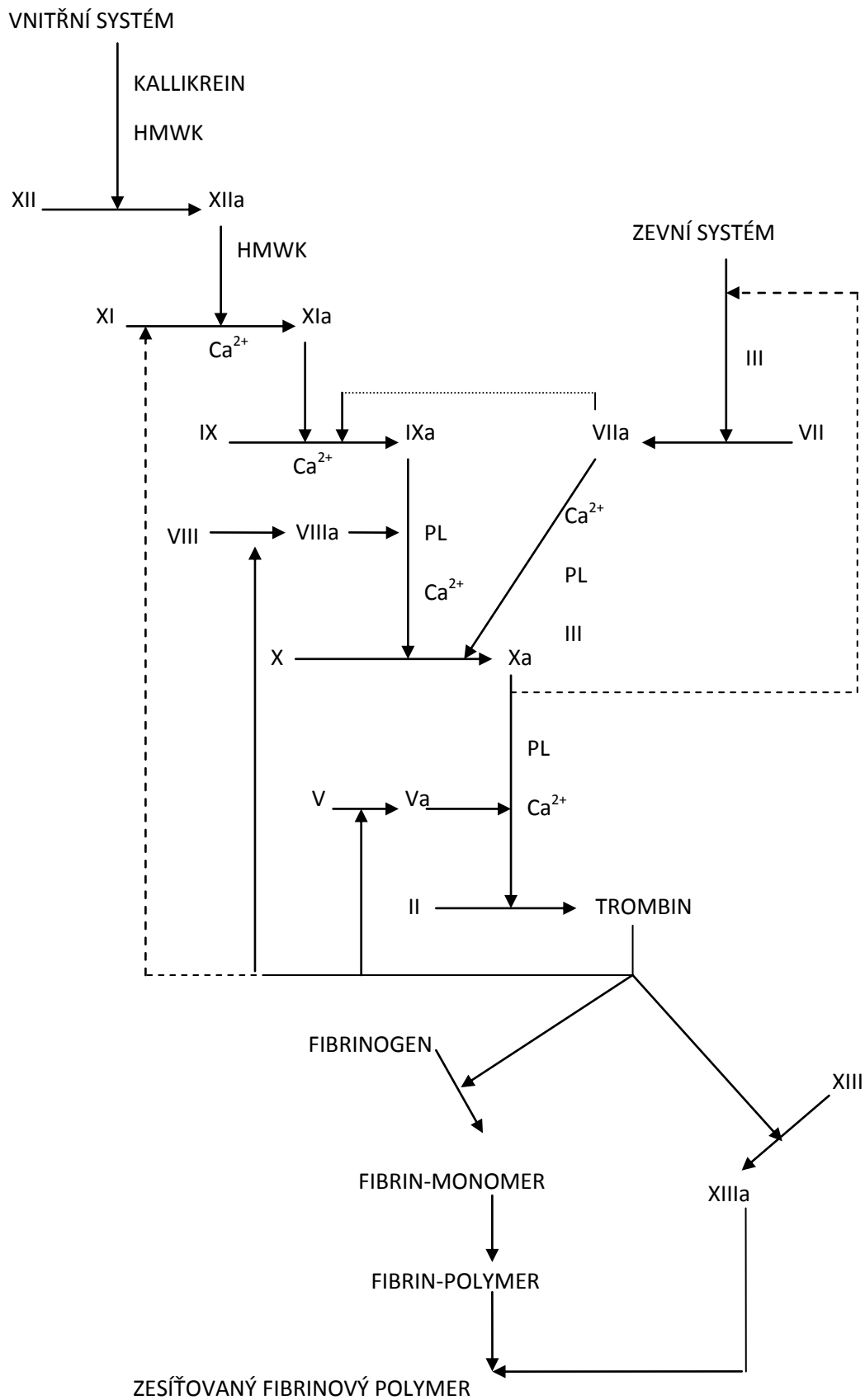
Koagulační děje můžeme rozdělit do dvou základních systémů: systému vnitřního, jehož všechny faktory jsou obsaženy v plazmě a systému zevního, který začíná uvolněním tkáňového tromboplastinu. Oba systémy spolu konvergují při tvorbě faktoru Xa a další sled reakcí vedoucích k vytvoření fibrinu lze tedy označit za společný (Silbernagl, 1993; Trojan, 1994).

Při srážení krve se uplatňuje řada koagulačních faktorů (Tab. 1), vlastní mechanismus srážení je přísně konsekventní (Obr. 2):

Tab. 1 Koagulační faktory (Ganong, 2005)

Faktor	Název
I	fibrinogen
II	protrombin
III	tromboplastin, TPL, trombokináza
IV	ionty $\text{Ca}^{2+}$
V	proakcelerin, labilní faktor
VII	prokonvertin
VIII	antihemofilický faktor A
IX	Christmasův faktor, PTC
X	Stuartův-Prowerův faktor
XI	antihemofilický faktor C, PTA
XII	Hagemanův faktor
XIII	fibrin stabilizující faktor, FSF
HMW-K	vysokomolekulární kininogen, Fitzgeraldův faktor
Pre-K	prekallikrein
Ka	kallikrein
PL	destičkové fosfolipidy

(faktor VI není samostatnou jednotkou a byl vypuštěn (dříve byl tak nazýván aktivovaný faktor V) (Ganong, 2005))



Obr. 2 Mechanismus srážení (Ganong, 2005)

Jedním z činitelů, kteří způsobují agregaci trombocytů je trombin. Ten vzniká ze srážecího faktoru II – protrombinu – výsledného produktu srážecí kaskády.

Proces hemokoagulace lze rozdělit do tří fází:

#### **a) Vznik protrombin-konvertního systému**

Těchto dějů se účastní vnitřní i vnější systém. Inaktivní koagulační faktory jsou enzymaticky přeměňovány na aktivní, které mají charakter proteas (s výjimkou faktoru V a faktoru VIII, které jsou kofaktory). Začátek řetězu ve vnitřním systému zahajuje fáze kontaktu, kdy obnažený kolagen spolu s dalšími složkami subendotelu váže faktor XII, který je proteolyticky aktivován kallikreinem za přítomnosti HMWK na faktor XIIa. Faktor XIIa zároveň stimuluje přeměnu plazmatického prekallikreinu na kallikrein za přítomnosti HMWK, který celý děj urychluje a zesiluje. Faktor XIIa za přítomnosti HMWK dále aktivuje přeměnu faktoru XI na XIa. Faktor XIa za přítomnosti  $Ca^{2+}$  aktivuje proteolyticky vznik faktoru IXa z faktoru IX. Jedná se o postupnou aktivaci, kdy aktivovaný faktor aktivuje další zymogen (fenomén kaskády). Vnitřní systém končí vytvořením aktivačního komplexu, který se skládá z faktorů IXa, VIII,  $Ca^{2+}$  a destičkových fosfolipidů. Tento komplex konvertuje faktor X na Xa. Zevní srážecí systém se skládá z faktoru VIIa, iontů  $Ca^{2+}$ , tkáňového tromboplastinu a faktoru X. Tyto látky tvoří lipoproteinový komplex, s pomocí kterého vzniká aktivovaný faktor Xa z faktoru X. Zatímco doba aktivace faktoru X ve vnitřním systému zahrnuje celou řadu interakcí mezi více faktory a trvá několik minut, v zevním systému činí několik sekund. Pro tvorbu faktorů II, VII, IX a X je zapotřebí v organismu dostatečná hladina vitamínu K. Chybí-li vitamin K v organismu, nebo jsou-li blokovány jeho účinky, vyplavují se z jater do krve biologicky neúčinné prekurzory (Martínková, 1990; Trojan, 1994). Vitamin K je kofaktorem enzymové reakce při karboxylaci glutamových zbytků na N-terminálních proteinových řetězcích syntetizovaných koagulačních faktorů (Lüllman, 2002; Silbernagl, 1993).

## **b) Konverze protrombinu na trombin**

Je to vícestupňová reakce. V této fázi tvoří faktor V, faktor Xa,  $\text{Ca}^{2+}$  ionty a trombocytární fosfolipid lipoproteinový komplex s protrombinem a aktivují jej. Vzniká tak faktor IIa – TR, který se skládá ze dvou řetězců navzájem spojených disulfidickými můstky – z lehkého řetězce A a z těžkého řetězce B (Martínková, 1990; Silbernagl, 1993).

## **c) Štěpení fibrinogenu na fibrin**

Poslední fáze koagulačních dějů zahrnuje štěpení fibrinogenu na fibrin a jeho stabilizaci. TR odštěpí během několika sekund dva páry malých peptidů, fibrinopeptidu A a fibrinopeptidu B z velké molekuly fibrinogenu. Zbývá molekula se nazývá monomer fibrinu. Rozpustné monomerní molekuly fibrinu se postupně shlukují působením nekovalentních interakcí za vzniku fibrinu rozpustného v roztoku močoviny. Faktor XIII aktivovaný TR za přítomnosti  $\text{Ca}^{2+}$  na faktor XIIIa napojuje kovalentně monomery fibrinu. Jeho transpeptidasa stabilizuje za přítomnosti  $\text{Ca}^{2+}$  fibrin polymer tvorbou isopeptidických vazeb. Vzniká fibrin již nerozpustný v močovině, odolnější proti působení látek s fibrinolytickým účinkem. Nedochozí tak k jeho předčasnému narušení, což by mělo za následek opětovný vznik krvácení. Síť fibrinových vláken pak zpevňuje destičkový trombus a tvoří se definitivní hemostatická zátka. Prostorová síť fibrinu následně zachycuje červené krvinky – vzniká tak trombus červený. Ukládání fibrinu v místě poranění přispívá k reparačním procesům.

Po určité době nastává retrakce koagula, což lze pozorovat např. ve zkumavce při srážení krve. Z koagula dochází k vytlačení krevního séra, které se liší od plazmy nepřítomností některých faktorů (I, II, VIII a XIII) spotřebovaných při srážení. Retrakce koagula je funkcí destiček a začíná, když shluky destiček adherují k fibrinovým vláknům. Jejich filopodie se přichytávají ke křížícím se místům fibrinových vláken a jakmile se zkrátí, dojde ke smrštění celé hmoty (Martínková, 1990; Trojan, 1994).

Tendence ke srážení je vyvažována reakcemi, které srážení krve brání a odbourávají vzniklé sraženiny. Patří sem např. odstraňování aktivovaných faktorů z krve játry, snížení dodávky koagulačních faktorů, jež jsou během srážení konzumovány, vzájemné působení agregaci

stimulujícího TXA<sub>2</sub> a protisrážlivého PGI<sub>2</sub>. Nejdůležitější je inhibice humorální, která zahrnuje celou řadu zpětných vazeb a specifické inhibitory. Typickým příkladem zpětné vazby je úloha konečného produktu celého děje – fibrinu – jako inhibitoru, který má silnou afinitu pro TR a reverzibilně jej váže. Nejdůležitějším inhibítorem je však plazmatický protein antitrombin III, který tvoří komplex s trombinem a dalšími koagulačními faktory (IXa, Xa, XIa, XIIa a kallikrein) a tím je inaktivuje. Antitrombin III je kofaktorem heparinu, který mu po navázání způsobí změnu jeho konformace a usnadní tak vazbu na protrombin a další substráty. Dalším antikoagulačním faktorem je protein C, který je aktivován komplexem: TR, trombomodulin (glykoprotein z cévního endotelu). Aktivovaný protein C ve spojení s kofaktorem proteinem S degraduje koagulační faktory Va a VIIIa.

Sled koagulačních dějů je dokonale modulován řadou aktivačních i inhibičních faktorů, zůstává omezen na místo poranění a je limitován i časově (Ganong, 2005; Lúllman, 2002; Murray, 2002; Trojan, 1994).

#### **4) Fibrinolýza**

Po určité době, když krevní sraženina splnila svoji funkci, je fibrinová usazenina odstraněna enzymatickým štěpením fibrinu plasminem na degradační produkty. Fibrinolytický systém má čtyři složky:

- neúčinný plasminogen,
- účinný plasmin,
- aktivátory plasminogenu a
- inhibitory plasminu a plasminogenu.

V plazmě se normálně vyskytuje neúčinný prekurzorový globulin, proenzym plasminogen. Jeho hladina stoupá při infekci, operaci, infarktu myokardu, při poranění aj. procesech. Proteolytickým štěpením je plasminogen konvertován na účinný plasmin o dvou řetězcích – těžkém (A) a lehkém (B). K jeho aktivaci může dojít třemi způsoby. Buď látkami obsaženými v krevní plasmě (faktor VIIa, kallikrein, TR), nebo látkami pocházejícími z cévní stěny a buněk téměř všech orgánů

(proteasy – t-PA); t-PA jsou pro aktivaci plasminogenu nejdůležitější. Do třetí skupiny patří látky exogenní (u-PA, izolována z lidské moči a streptokinasa, protein produkovaný bakteriemi *Streptococcus haemolyticus*). Pro samotnou aktivaci plasminogenu je nezbytná vazba na fibrin. Ten zde funguje jednak jako substrát budoucího plasminu a také jako kofaktor při jeho vzniku. Plasminogen, který se naváže na vnitřní lysiny fibrinového řetězce, může být následně štěpen na plasmin. Tato nutnost vazby na fibrin před samotnou aktivací omezuje působnost plasminu pouze na samotnou fibrinovou sraženinu a zamezuje vzniku generalizované fibrinolýzy. Samotný plasmin je extracelulární nespecifická serinová proteasa rozpouštějící fibrin na malé fragmenty, které jsou eliminovány z oběhu játry a také buňkami mononukleárního fagocytárního systému. Štěpí dále fibrinogen, protrombin, faktory V a VIII a rozpouští v těle malé tromby (zejména v mikrocirkulaci) a sraženiny vznikající při trombóze hlubokých žil nebo při trombóze koronární.

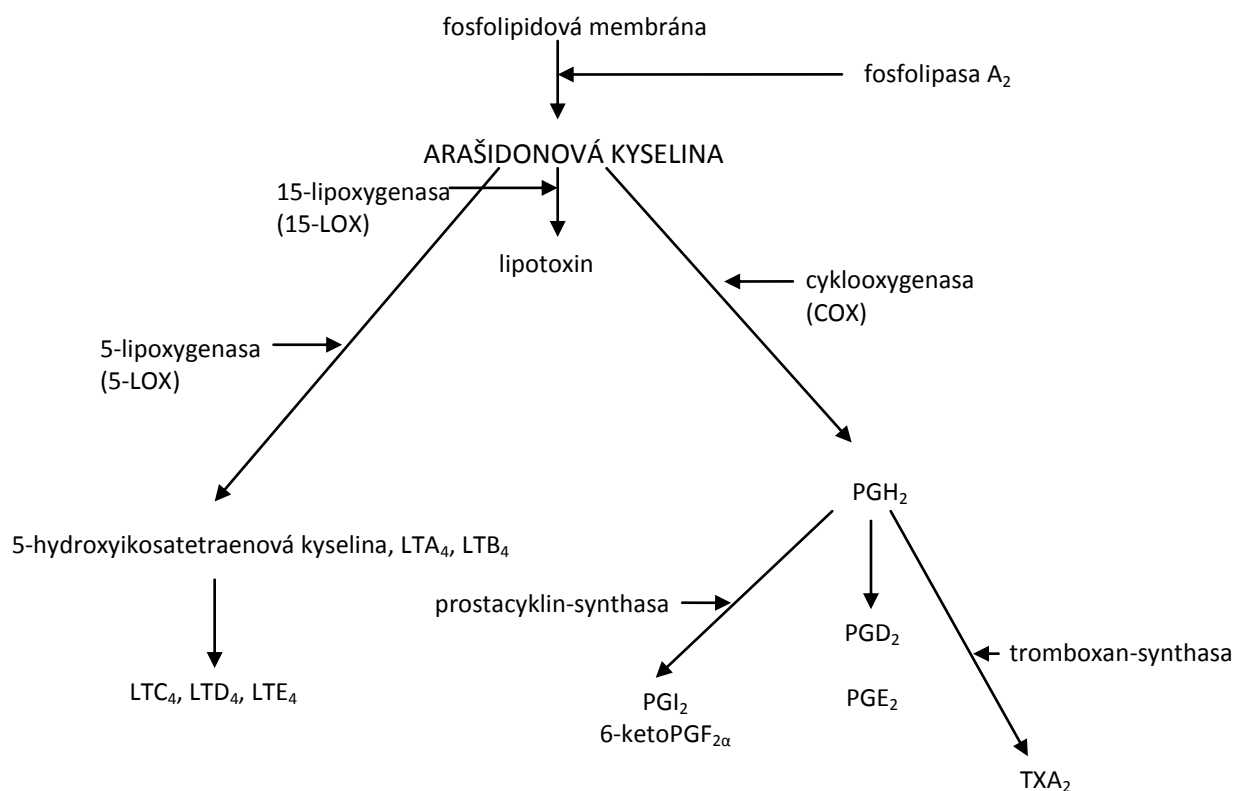
Opačné působení mají inhibitory plasminu a inhibitory aktivátorů plasminogenu. V plasmě jsou inaktivátor  $C_1$  (složka komplementu), inhibitor fibrinolýzy způsobené faktorem XIIa, komplex heparin-antitrombin III a plazmatický lipoprotein  $\alpha_2$ -makroglobulin, který tvoří ireverzibilní komplexy s celou řadou proteas. Inhibitory zevního systému tvoří v plazmě reverzibilní komplexy s aktivátory, které v přítomnosti fibrinu disociují. Mezi hlavní inhibitory plasminu patří  $\alpha_2$ -antiplasmin (plazmatický glykoprotein). Tvoří komplexy s plasminem a inaktivuje jej.  $\alpha_2$ -antiplasmin se uvolňuje také z  $\alpha$ -granul aktivovaných destiček. Patří mezi inhibitory proteas a účinně zabraňuje volné cirkulaci plasminu. Plasmin navázaný na fibrin je však před jeho aktivitou chráněn a zůstává aktivní. Fibrinolýza tak probíhá především lokálně v místě trombu.

Fibrinolytický systém je v úzké vazbě a rovnováze se systémem koagulačním. Porucha tohoto vysoce integrovaného systému vede buď k trombóze, nebo ke krvácení (Martínková, 1990; Trojan, 1994; Silbernagl, 1993; Murray, 2002).



#### 4.4. Antiagregancia

Antiagregancia brání aktivaci a agregaci trombocytů a tak zamezuje tvorbě destičkových trombů. Proces agregace regulují mimo jiné dva antagonistické faktory:  $\text{TXA}_2$ , který agregaci zvyšuje a  $\text{PGI}_2$ , který ji naopak inhibuje. Jak bylo dříve vysvětleno, obě látky vznikají působením enzymu COX z AA (schéma 3). Poslední krok této reakce je řízen syntasou tromboxanu, respektive prostacyklinu.  $\text{TXA}_2$  vzniká zejména v destičkách,  $\text{PGI}_2$  v endotelu cév (Lüllman, 2002; Silbernagl, 1993).



Obr. 3 Metabolismus AA (Williamson, 1996)

Podávání inhibitorů agregace trombocytů slouží k profylaxi vzniku trombů v arteriálním řečišti. Arteriální trombus vzniká na základě agregace trombocytů, které se uložily na defekt cévní stěny a na této vzniklé „hlavě“ složené z trombocytů se začne vylučovat fibrin. Na rozdíl od nich tromby ve venózním řečišti vznikají převážně na základě zpomalení proudu a městnání. Jsou složeny pouze z fibrinu, destičky zde nehrají významnou roli. Při terapii arteriálních trombů jsou tedy

podávána antitrombotika zabraňující vzniku trombů, zatímco při terapii trombů venózních jsou to fibrinolytika, která brání vzniku fibrinu, nebo ho rozpouštějí (Lüllman, 2002).

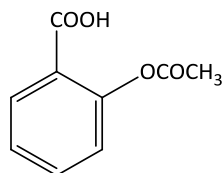
### **Antiagregancia podle mechanismu účinku**

V současné době existuje mnoho látek přírodního i syntetického charakteru s antiagregačním účinkem, které působí různým mechanismem účinku. Jejich praktická využitelnost jako referenční látky pro farmakologické pokusy, především však jako léčivo, je problémová. Proto zde uvádím jednoznačně ověřené látky, které jsou v současnosti používány jako léčiva, případně standardy pro biologické pokusy.

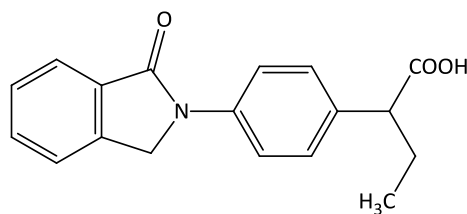
#### **1. Inhibice cyklooxygenasového systému**

##### ***Kyselina acetylsalicylová (ASA)***

V trombocytech a buňkách endotelu ireverzibilně acetyluje, čímž inhibuje COX systém destiček účastnících se tvorby TXA<sub>2</sub>. Trombocyty jsou k ASA velmi citlivé. Pro obnovení funkce enzymu v těle musí dojít k jeho syntéze *de novo*. ASA inhibuje i tvorbu PGI<sub>2</sub> v endotelových buňkách. Ty však na rozdíl od destiček regenerují COX aktivitu během několika hodin. V bezjaderných trombocytech naproti tomu k žádné nové syntéze nedochází a jsou tedy postiženy do konce své životnosti (tzn. nejdéle 8 – 11 dní) a tak je výsledná aktivita posunuta ve prospěch PGI<sub>2</sub> (Murray, 2002; Williamson, 1996). Útlum agregace destiček nastává, podává-li se ASA tak, aby byla umožněna regenerace syntézy PGI<sub>2</sub>. Z důvodu zabránění vzniku ikosanoidů, musí ASA proniknout do místa účinku v nezměněné chemické formě, aby byla schopna acetylovat enzym. ASA zabraňuje agregaci trombocytů, nikoliv však jejich adhezivitě. Nezabrání vzniku venózních trombů. Podává se při nestabilní angina pectoris, k sekundární profylaxi po infarktu myokardu a k profylaxi okluzí po chirurgickém bypassu. ASA snižuje incidenci mozkových infarktů a tranzitorních ischemických atak (Lüllman, 2002; Suchopár, 1999). Slouží i jako standard pro biologické testování (Williamson, 1996).



acetylsalicylová kyselina



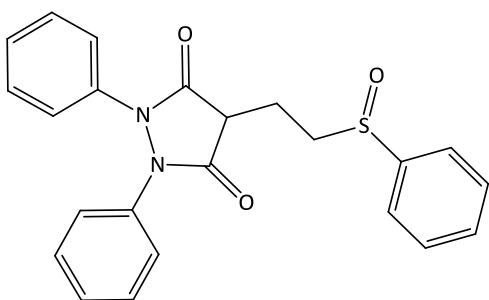
indobufen

### **Indobufen**

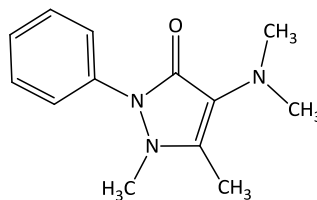
Blokuje COX podobně jako ASA, avšak na rozdíl od ASA je účinek této látky reverzibilní a funkce destiček se spontánně obnoví do 24 hodin od ukončení podávání. Indobufen nemá vliv na hladinu koagulačních faktorů. Podává se u stejných indikací jako ASA, protože je však finančně náročnější, je podáván pouze v případech, je-li ASA kontraindikována nebo je-li zapotřebí inhibici agregace rychle přerušit (Suchopár, 1999).

### **Sulfipyrazon**

Účinek spočívá v kompetitivně reverzibilní inhibici COX (antiagregace) a inhibici adheze destiček na kolagen. Příznivý účinek byl prokázán pouze v profylaxi tromboembolických příhod u nemocných s mitrální stenózou. Při jiných indikacích (ischemické choroby srdce, tranzitorní mozkové příhody) efekt selhal (Suchopár, 1997).



sulfipyrazon



aminofenazon

### **Aminofenazon**

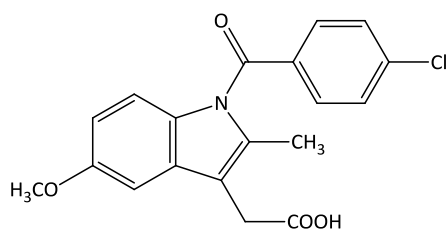
Z důvodu nežádoucích účinků je používán už jen jako standard pro biologické pokusy. Inhibuje COX cestu metabolismu AA tím, že zháší volné radikály (endoperoxidy), tvořené v prvním kroku syntézy prostaglandinů (Williamson, 1996).

### **Indometacin**

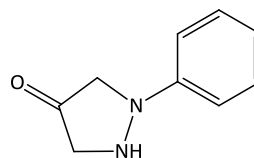
Nesteroidní antirevmatikum, antiflogistikum, analgetikum (v současnosti s omezeným terapeutickým použitím z důvodu nežádoucích vedlejších účinků), standard při biologickém testování (Williamson, 1996).

### **Fenidon**

Kromě inhibice COX, blokuje i LOX aktivitu. Používá se jako standard v biologických pokusech (Williamson, 1996).



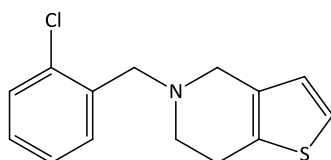
indometacin



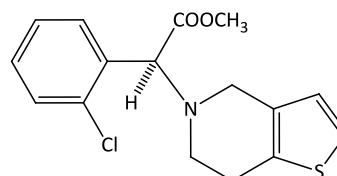
fenidon

## **2. Inhibice fosfolipasy C**

### **Tiklopidin, klopidogrel**



tiklopidin



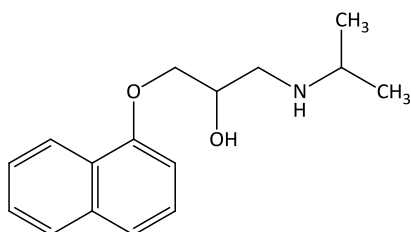
klopidogrel

Chemicky příbuzné látky. I mechanismus působení je podobný – spočívá v inhibici fosfolipasy C a blokádě membránových receptorů pro ADP s následnou inhibicí adheze a degranulace destiček. Zabraňují navázání kontaktu mezi fibrinogenem a glykoproteinovými molekulami (IIb/IIIa) lokalizovanými na povrchu destiček a tím znemožňují vytvoření trombocytové sítě za účasti molekul fibrinogenu. Účinek se vyvíjí teprve v průběhu několika dní a pouze *in vivo*. Tiklopidin a klopidogrel se podávají při poruchách cerebrální cirkulace. Snižují incidenci iktů a infarktu myokardu. Užívání tiklopidinu bývá však spojeno s výraznými nežádoucími účinky (průjmy, neutropenie, trombocytopenie, kožní reakce). Je proto vhodné ho podávat pouze u pacientů s intolerancí či rezistencí ASA, nebo dát přednost klopidogrelu, který má výskyt nežádoucích účinků nižší (Lüllman, 2002; Suchopár, 1999).

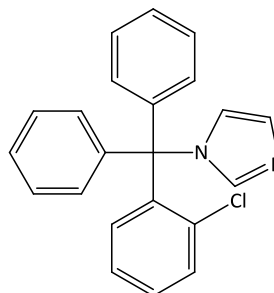
### 3. Inhibice fosfolipasy A<sub>2</sub>

#### *Propranolol*

Inhibicí fosfolipasy A<sub>2</sub>, brání uvolnění AA z membrány trombocytů. Patří do skupiny léčiv – betablokátorů – a je používán také jako standard v biologických testech (Williamson, 1996).



propranolol



klotrimazol

### 4. Inhibice tromboxan-synthasy

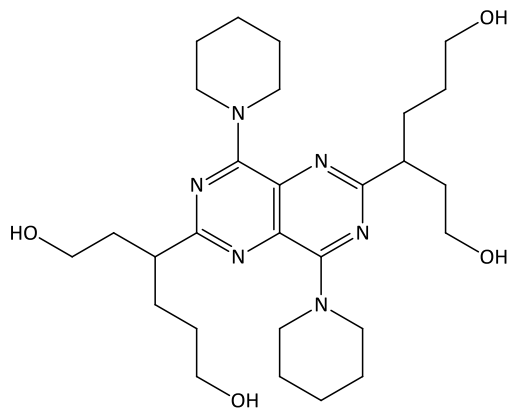
#### *Klotrimazol*

Inhibuje poslední krok při syntéze tromboxanů. Je to léčivo patřící mezi antimykotika, slouží také jako standard při biologickém testování (Williamson, 1996).

## 5. Inhibice fosfodiesterasy

### *Dipyridamol*

Mechanismem antiagregačního působení této látky je zvýšení hladiny cAMP inhibicí fosfodiesterasy (transformuje cAMP na neúčinný 5'AMP) a stimulací adenylcyklasy (podmiňuje tvorbu cAMP z ATP) trombocytů. Za účelem vyššího efektu jej lze v terapii kombinovat s ASA z důvodu jejich rozdílného mechanismu účinku. Podávání dipyridamolu není vhodné u ischemické choroby srdeční, protože ve vyšších dávkách vyvolává vazodilataci s poklesem cévního odporu, což může vyvolat odklon krevního proudu od ischemických oblastí. Používá se v kombinaci s antikoagulační terapií k profylaxi tromboembolických komplikací u chlopenních náhrad (Martínková 1990; Suchopár, 1999).



dipyridamol



abciximab

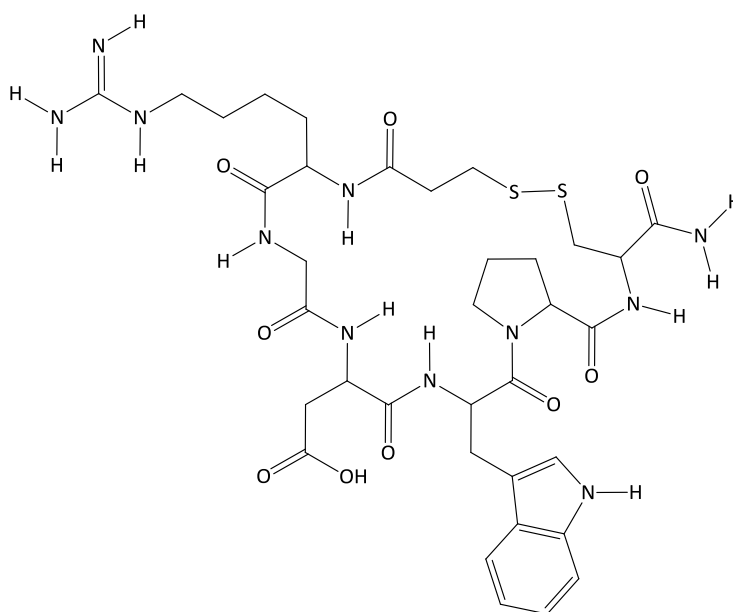
## 6. Blokace glykoproteinů IIb/IIIa

### *Abciximab*

Abciximab je  $F_{ab}$  fragment protilátek, které blokují vazebný protein fibrinogenu, glykoprotein IIb/IIIa, takže výsledkem je neschopnost fibrinogenu se na proteiny navázat. Blokádou glykoproteinů IIb/IIIa dojde k inhibici konečného společného úseku jinak rozdílných mechanismů aktivace trombocytů. Abciximab se podává intravenózně a ve speciálních případech, při perkutánní transluminální koronární angioplastice, v kombinaci spolu s heparinem (Lüllman, 2002; Suchopár, 1999).

### **Tirofiban, eptifibatid**

Jsou to blokátory glykoproteinu IIb/IIIa. Tirofiban patří mezi fibany, samy nemají charakter protilátek, jsou to nepeptidová léčiva. Eptifibatid patří mezi syntetické inhibitory. Podávají se podobně jako abciximab intravenózně při infarktové symptomatologii při nestabilní angina pectoris, kdy mají zabránit úplným uzávěrům (Lúllman, 2002; Suchopár, 1999).

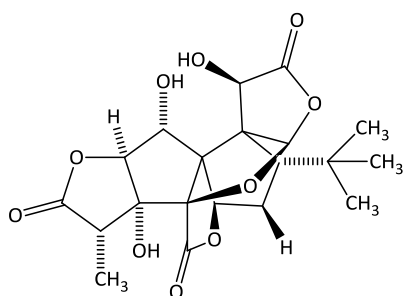


tirofiban

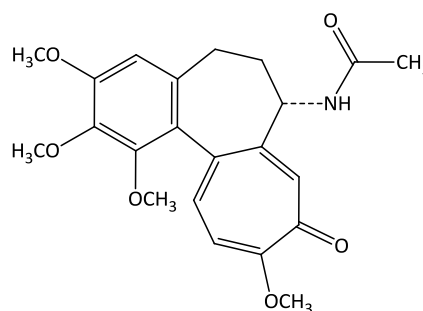
### **7. Antagonismus PAF**

#### **BN 52021 (ginkgolid B), BN 52063 (směs ginkgolidů)**

Přírodní látky izolované z *Ginkgo biloba* (Ginkgoaceae), slouží jako standardy při biologických pokusech (Williamson, 1996). Látka 52021 (fy Beaufour-Ipsen) je významným potenciálním léčivem v terminálním stadiu schvalování využitelným při léčbě septického šoku.



ginkgolid B



kolchicin

## 8. Inhibice kontraktálního aparátu trombocytů

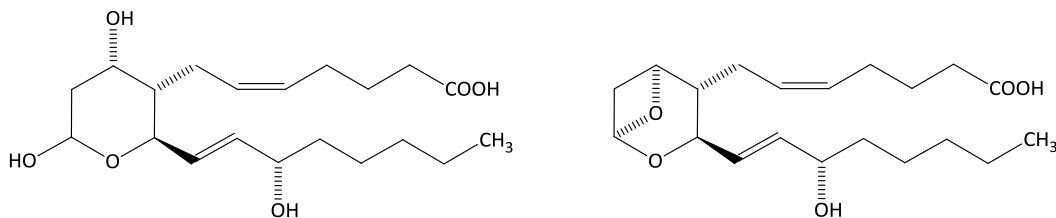
### *Kolchicin*

Alkaloid izolovaný z hlíz (semen) *Colchicum autumnale* (Colchicaceae). Je to mitotický jed, v trombocytech inhibuje mikrotubulární systém. Používá se jako standard při biologických testech a jako léčivo – antiuraticum – k léčbě záchvatů dny (Williamson, 1996).

## 9. Antagonismus na tromboxanových a prostaglandinových receptorech

### *Analoga tromboxanu A<sub>2</sub>*

Tyto sloučeniny se uplatňují na receptorech pro tromboxany a prostaglandiny, používají se jako standardy při biologických pokusech (Williamson, 1996).

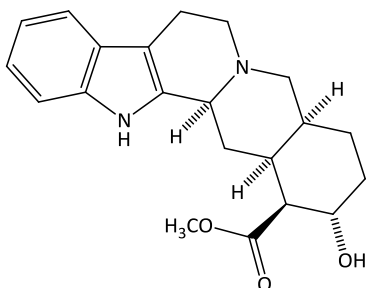


analoga tromboxanu A<sub>2</sub>

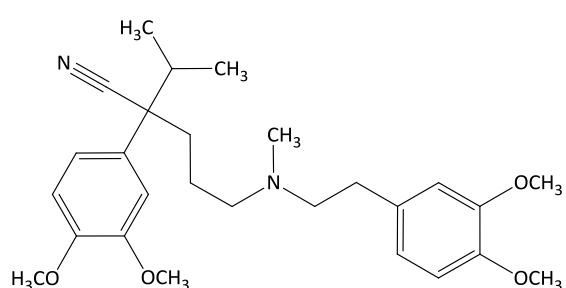
## 10. Antagonismus $\alpha$ -adrenergických receptorů

### *Yohimbin*

Alkaloid z kůry stromu *Pausinystalia yohimbe* (Rubiaceae) brání agregaci trombocytů navozené adrenalinem, používá se jako standard při biologických testech (Williamson, 1996).



yohimbin



verapamil



## 11. Vliv na transport $\text{Ca}^{2+}$

### **Verapamil**

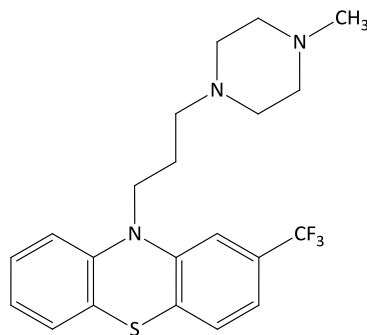
Jako léčivo patří mezi antiarytmika, vazodilatancia; ovlivňuje vstup  $\text{Ca}^{2+}$  do buněk. Je také často používán jako standard při studiu antiagregačních účinků potenciálních léčiv (Williamson, 1996).

### **Trifluorperazin**

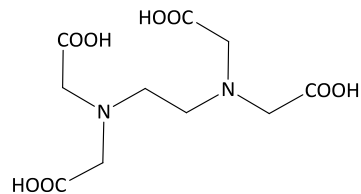
V současnosti se jedná o léčivo – fenothiazinové neuroleptikum, které inhibuje kalmodulin (intracelulární bílkovina, která váže  $\text{Ca}^{2+}$ ), brání agregaci způsobené více agonisty. Používá se jako standard při biologickém testování (Williamson, 1996).

### **EDTA (kyselina ethylendiaminotetraoctová)**

Je to chelatovná látka, která váže  $\text{Ca}^{2+}$  do nedisociovaného komplexu a tím snižuje jeho dostupnost. Používá se především experimentálně (Williamson, 1996).



trifluorperazin

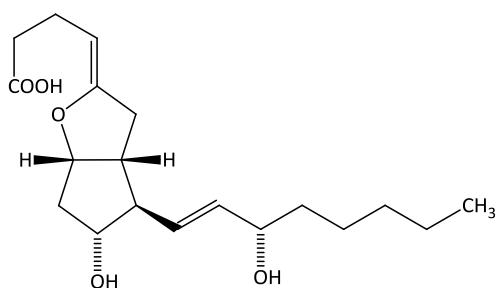


EDTA

## 12. Zvýšení hladiny cAMP

### **$\text{PGI}_2$**

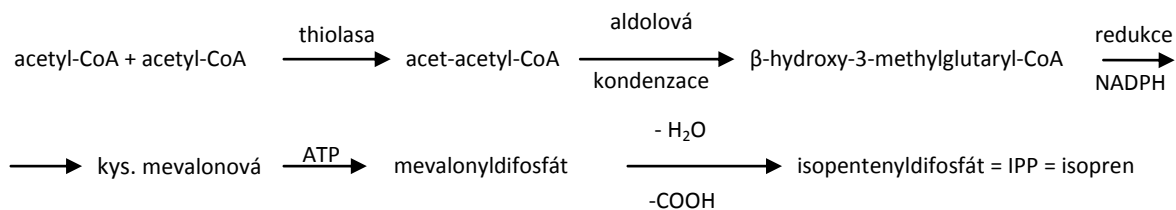
Zabraňuje agregaci způsobené mnoha agonisty, slouží jako standard v biologických pokusech (Williamson, 1996).



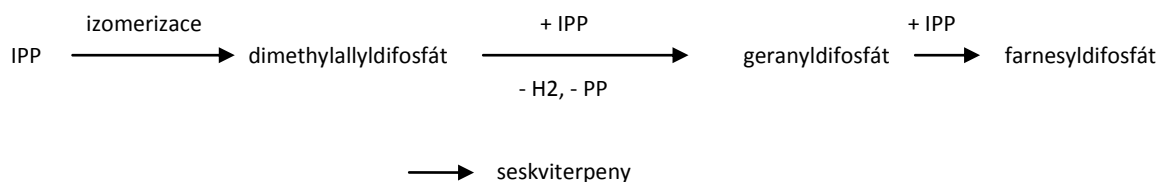
PGI<sub>2</sub>

#### 4.5. Seskviterpenové laktony čeledi Asteraceae

Seskviterpenové laktony (dále jen laktony) řadíme spolu s ostatními seskviterpeny do největší známé skupiny sekundárních metabolitů – terpenů. Terpeny jsou odvozovány ze základní stavební jednotky – pětiuhlíkatého 2-methylbutadienu (isoprenu). Podle počtu isoprenových těchto jednotek tuto skupina dělíme na: hemiterpeny C<sub>5</sub>, monoterpeny C<sub>10</sub>, seskviterpeny C<sub>15</sub>, diterpeny C<sub>20</sub>, sesterpeny C<sub>25</sub>, triterpeny C<sub>30</sub> a karoteny C<sub>40</sub>. (Jahodář, 2004).



Obr. 4 Vznik isoprenu

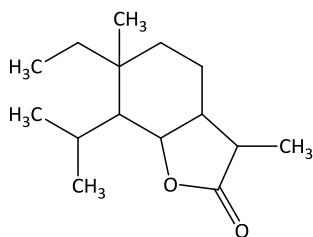


Obr. 5 Vznik seskviterpenů (rámcové schema)

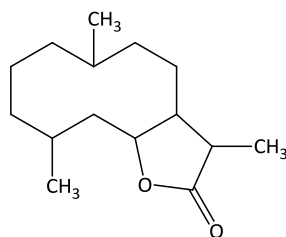
V rostlinách se vyskytují prakticky 3 skupiny seskviterpenových sloučenin:

- seskviterpenové uhlovodíky*; lze je získat destilací s vodní parou, při normální teplotě jsou olejovité,
- seskviterpenové alkoholy*; při izolaci za pomoci vodní páry se zpravidla nerozkládají, s vodní parou těkají, při normální teplotě jsou zpravidla olejovité nebo krystalizující. Jsou lépe rozpustné v nízkomolekulárních alkoholech než v uhlovodících,
- seskviterpenové glykosidy*; vycházejí z alkoholů, jsou rozpustné v polárních rozpouštědlech a jsou v přírodě nečetné,
- oxidované formy seskviterpenů*; zahrnují řadu sloučenin s mnoha funkčními skupinami (alkoholy, epoxidy, aldehydy, karboxylové kyseliny, estery s mastnými kyselinami krátkých řetězců, laktony). S vodní parou jsou jen velmi obtížně těkavé (prakticky netěkavé), jsou rozpustné spíše v méně polárních rozpouštědlech. Polarita těchto látek (resp. logP) je dána povahou funkčních skupin, počtem dvojných vazeb a prostorovým uspořádáním konkrétní molekuly.

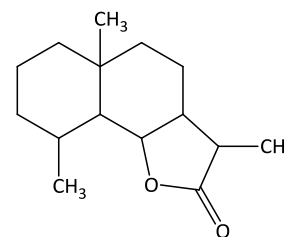
*Seskviterpenové laktony* právě představují velmi významnou skupinu těchto látek. Jedná se o širokou skupinu funkčních derivátů seskviterpenů, z nichž hlavní a nejčastěji se vyskytující látky patří do 8 strukturních skupin (Hänsel, 2004): elemanolidy, germakranolidy, eudesmanolidy, eremofilanolidy, xanthanolidy, guajanolidy, ambrosanolidy a helanalolidy. Je však nutné říci, že v přírodním materiálu nalézáme sloučeniny, které se řadí k dalším strukturním typům těchto laktonů (Jahodář, 2004), nebývají však zpravidla tak četné.



elemanolid



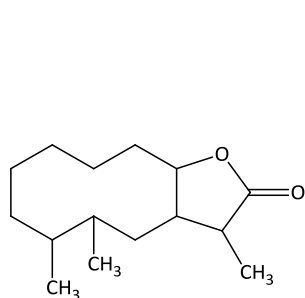
germakranolid



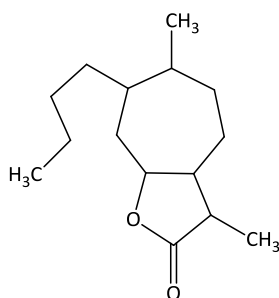
eudesmanolid

Laktony se hojně vyskytují především v řádu Asterales (značně v čeledi Asteraceae). Mají hořkou chuť, nebo působí jako vonné složky taxonů uvedené čeledi (Jahodář, 2004). Jsou uskladněné

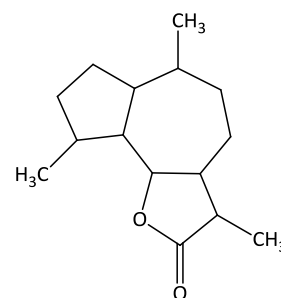
ve speciálních orgánech rostlin, jako jsou např. laticiferní buňky, pryskyřičné kanálky nebo trichomy (Gopfert, 2009).



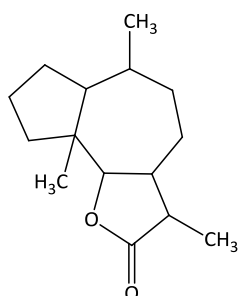
eremofilanolid



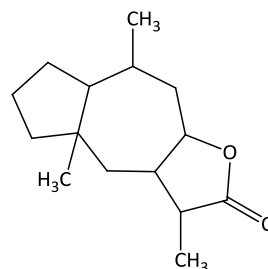
xanthanolid



guajanolid



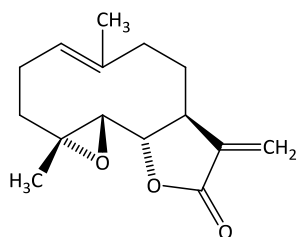
ambrosanolid



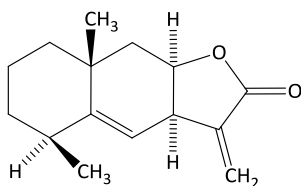
helenanolid

Vykazují jak pozitivní biologické efekty, tak i nežádoucí, toxické a alergenní účinky. Mnoho rostlin čeledi Asteraceae obsahující laktony bylo po staletí užíváno v lidovém léčitelství mnoha kultur a nadále bude využíváno také v moderní fytoterapii. Většina biologických účinků běžných typů laktonů je zprostředkována alkylací makromolekul (Schmidt, 2006). Otázkou je jejich vstřebávání do organismu. Výsledky studie na prověření farmakokinetických vlastností laktonů ukázaly, že všech 30 zkoumaných laktonů izolovaných z řeckých druhů rodu *Centaurea* nemůže být vstřebáno přes střevní bariéru, má nízkou afinitu k plasmatickým proteinům a nepřekonává hematoencefalickou bariéru (Koukoulitsa, 2006). Široké využití mají rostliny čeledi Asteraceae především díky svým protizánětlivým účinkům. Protizánětlivými činiteli jsou zde právě laktony, které ale zároveň mohou způsobovat alergické kontaktní dermatitidy (Rios, 2005). V řadě odborných publikací byly tyto alergické kontaktní dermatitidy způsobené laktony popsány (Jovanovic, 2003; Reider, 2001). Pouze jedna studie zpochybnila tento účinek laktonů (např. parthenolidu) a přisoudila jej monoterpenům

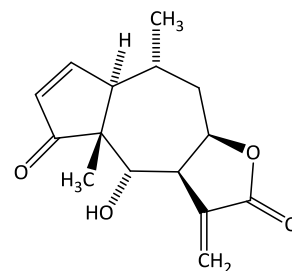
(Christensen, 1999). Většina toxických a alergenních laktonů patří mezi: guajanolidy, eudesmanolidy, germakranolidy, pseudoguajanolidy, sekoguajanolidy, sekoeudesmanolidy a sekopseudoguajanolidy. Přítomnost exocyklické  $\alpha$ -methylenové skupiny je podmínkou vyvolání kontaktní hypersenzitivity (vazba laktonů na aminokyseliny). Toto zjištění přináší závěr o potenciální alergenní aktivitě u více než 400 laktonů identifikovaných v čeledi Asteraceae (Jahodář, 2004). Senzibilizující vlastnosti mohou mít i laktony bez methylenové skupiny, ale s obsahem epoxyskupiny nebo s cyklopentenovým kruhem. Příkladem mohou být: brevelin A, arnikolid D, tenulin a  $16\alpha$ -(1-methyl-1,2-epoxypropyl)eremantholanolid (Hausen, 1985). Navíc u jedinců citlivých k těmto laktonům dochází ke zkřížené reaktivitě – prokazují hypersenzibilitu i při kontaktu s jiným rostlinným druhem obsahujícím laktony (Hausen, 1983; Lundh, 2006; Lundh, 2007). Laktony jsou nízkomolekulární látky, jejich schopnost indukovat hypersenzibilitu pozdního typu je podmíněna přímým kontaktem s kůží (Schwanitz, 1988; Stingeni 1999). V řadě případů tuto dermatitidu způsobuje parthenolid z *Tanacetum parthenium* (Hausen, 1983; Paulsen, 2007). Dehydrokostuslakton, alantolakton a kostunolid patří mezi další nejčastější senzitivátory alergické kontaktní dermatitidy, které se zároveň používají v alergologii při „patch testing“ (Goulden, 1998; Paulsen, 1999; Paulsen, 2001). Senzibilizující schopnost byla prokázána i u dalších laktonů jako je např. anthehotulid izolovaný z *Anthemis cotula* (van Klink, 2003),  $\alpha$ -peroxyachifolid (poměrně silný iritant) z *Achillea millefolium*, (Hausen, 1991) helenalin z *Arnica montana*, laktucin a laktukopikrin z *Cichorium intybus*, knicin z *Cnicus benedictus*, grossheimin z *Cynara scolymus*, achillin z *Achillea* spp., ambrosin a koronopilin z rodu *Ambrosia*, arteglašin A z *Artemisia douglasiana* a *Dendrathera indicum*, (-)-frulanolid z rodu *Frullania*, glukosid taraxinové kyseliny z *Taraxacum officinale*, pyretrosin z *Tanacetum cinerariifolium* a *Anthemis cupaniana*, tetraneurin A z rodu *Parthenium* a další (Jahodář, 2004).



parthenolid



allantolakton

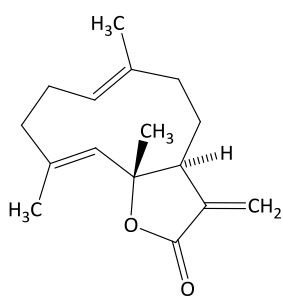


grossheimin

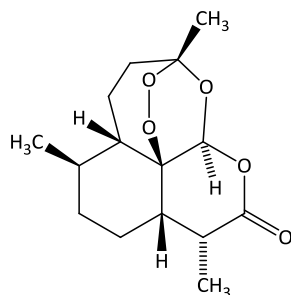
Protizánětlivé působení laktonů, které již bylo zmíněno, je předmětem výzkumu mnoha studií. Laktony zasahují do zánětlivých procesů různými mechanismy účinku. Některé laktony inhibují NF- $\kappa$ B (transkripční faktor, který hraje významnou roli při syntéze zánětlivých mediátorů, jako jsou cytokiny a chemokiny) (Merfort, 2002). Takto působí např. melampolidy enhydrin a uvedalin (Schorr, 2007). Rovněž všech třináct laktonů izolovaných z *Milleria quinqueflora*, která je v lidovém léčitelství používána na léčbu kožních infekcí, inhibovalo NF- $\kappa$ B (Castro, 2000). Jiná cesta protizánětlivých pochodů vede přes inhibici COX systému. Příkladem mohou být laktony guajanolidového typu z *Ainsliaea fragrans*: 2'-*O*-*E*-kaffeoyl-8 $\alpha$ -hydroxy-11 $\alpha$ ,13-dihydro-3 $\beta$ -*O*- $\beta$ -D-glukozaluzanin C, 8 $\alpha$ -hydroxy-11 $\alpha$ ,13-dihydro-3 $\beta$ -*O*- $\beta$ -D-glukozaluzanin C, 8 $\alpha$ -hydroxy-11 $\alpha$ ,13-dihydrozaluzanin C, 3 $\alpha$ -hydroxy-11 $\beta$ ,13-dihydro-8 $\alpha$ -*O*- $\beta$ -D-glukozaluzanin C, 3 $\beta$ -hydroxy-11 $\beta$ ,13-dihydro-8 $\alpha$ -*O*- $\beta$ -D-glukozaluzanin C, 3 $\beta$ -*O*- $\beta$ -D-glukozaluzanin C. Vykazují inhibiční aktivitu proti COX-1 i COX-2 (Wang, 2009). Inhibiční aktivitu v testu oxidačního vzplanutí prokázaly lychnofolid, centratherin a goyazensolid, které byly izolovány z *Lychnophora pohlii*. Jejich mechanismus účinku spočívá pravděpodobně v inhibici některého z enzymů nutného pro vznik ROS (Kanashiro, 2006). Mechanismus působení protizánětlivého helenalinu, široce rozšířeného laktonu v čeledi Asteraceae, spočívá v ireverzibilní inhibici LTC<sub>4</sub> synthasy v trombocytech; v granulocytech helenalin inhibuje kromě LTC<sub>4</sub> synthasy i 5-LOX. Kromě této aktivity má i antineoplastické účinky (Tornhamre, 2001). Jiný protizánětlivý mechanismus účinku mají millerenolid a thieleanin, které inhibovaly *in vitro* produkci NO u krysích makrofágů (Dupuy, 2008). Tuto aktivitu projevují také: hemistepsin B, kumambrin B, tulipinolid a kostunolid (Jang, Yang et al., 1999) nebo kumanin (ambrosanolid), který

prokázal velmi silný efekt (Lastra, 2004). Další studie protizánětlivé aktivity zkoumala vliv laktonů na uvolnění prozánětlivého enzymu elastasy z lidských neutrofilů *in vitro*. Laktony různých struktur (eudesmanolidy, guajanolidy, pseudoguajanolidy a germakranolidy) inhibovaly uvolnění elastasy z lidských neutrofilů (Siedle, 2003). Protizánětlivou aktivitu projevíly také hypokretenolidy (malá skupina laktonů s netypickou kruhovou strukturou) z *Leontodon hispidus*, které byly podrobeny dvěma *in vitro* a následně jednomu *in vivo* testu. 14-hydroxyhypokretenolid- $\beta$ -D-glukosid-4'-14''-hydroxyhypokreteroát prokázal aktivitu ve všech třech použitých zkouškách (Zidorn, 1999). 1 $\beta$ ,10 $\alpha$ ,4 $\alpha$ ,5 $\beta$ -diepoxy-8 $\alpha$ -angeloyloxy-kostunolid izolovaný z *Dimerostemma brasilianum* ukázal jednoznačné protizánětlivé působení (Stefani, 2006), stejně jako deoxyelefantopin a isodeoxyelefantopin z *Elephantopus scaber*, které jsou používány pro léčbu široké škály zánětlivých onemocnění (Ichikawa, 2006). Protizánětlivá aktivita byla stanovena i u čtyř germakranolidů: ovatifolinu, ovatifolinacetátu, deacetylovatifolinu a 1,10-epoxyovatifolinu, které byly izolovány z *Podanthus ovatifolius* a *Podanthus mitiqui*. Všechny čtyři laktony vykázaly výrazný pozitivní efekt; ovatifolin měl dokonce větší inhibiční potenci než indometacin (Cespedes, 2000). Santonin – lakton – který se běžně vyskytuje v čeledi Asteraceae má kromě protizánětlivých účinků také antipyretické a analgetické vlastnosti (Al-Harbi, 1994). Protizánětlivé účinky má i zmíněný alergenní lakton parthenolid izolovaný z *Tanacetum vulgare* (Schinella, 1998). Obsah parthenolidu (hlavní seskviterpenový lakton rostliny) významně ovlivňuje uvolňování serotoninu z trombocytů (Marles, 1992); tento účinek mají i jiné laktony z čeledi Asteraceae (Wagner, 2008). Extrakt z *Tanacetum parthenium*, parthenolid a další laktony z rostliny také podporují růst vlasů (Masaki, 2008), avšak nejvýznamnější působení parthenolidu spočívá v terapii migrény (Cutlan, 2000).

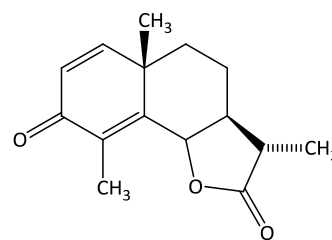
Mnohé laktony vykazují také značnou antimikrobiální aktivitu. Třicetšest laktonů guajanolidového a germakranolidového typu bylo testováno na antibakteriální aktivitu. U třiceti z nich byla prokázána aktivita proti různým bakteriálním kmenům, nejméně aktivní byl lakton typu melampolidu proti methicilin-rezistentnímu kmenu *Staphylococcus aureus* (Cartagena, 2008).



kostunolid



artemisinin



santonin

Laktony izolované z rodu *Tanacetum* prokázaly antibakteriální aktivitu proti *Staphylococcus aureus* (gram-pozitivní), *Escherichia coli*, a *Salmonella* sp. (gram-negativní) (Stefanovic, 1988). Proti gram-pozitivním bakteriím byly aktivní všechny testované laktony ve studii (Jawad, 1985). 13-acetylsolstitialin A izolovaný z *Centaurea solstitialis* měl jednoznačnou pozitivní aktivitu proti *Enterococcus faecalis*, která byla srovnatelná s ampicilem (referenční látka). Podobný efekt prokázal i proti DNA viru (Ozcelik, 2009). Šest laktonů izolovaných z *Acanthospermum hispidum* inhibovalo tvorbu bakteriální biovrstvy v kultuře *Pseudomonas aeruginosa* (Cartagena, 2007). 3 $\beta$ ,8 $\alpha$ -dihydroxyguajan-4(15),10(14),11(13)-trien-6,12-olid (8-desacylcynaropikrin), 3 $\beta$ ,9 $\beta$ -dihydroxyguajan-4(15),10(14),11(13)-trien-6,12-olid a 8 $\alpha$ -hydroxy-4 $\alpha$ (13),11 $\beta$ (15)-tetrahydrozaluzanin C – antibakteriálně působící laktony – byly izolovány z *Crepis cameroonica* (Ndom, 2006). Proti kmenům *Bacillus subtilis* a *Pyricularia oryzae* vykázaly silnou aktivitu methylester 8 $\beta$ -methakryloyloxymelampolid-14-ové kyseliny a fluktuanin, které byly izolovány z listů *Smallanthus sonchifolius* (Lin, 2003). 13-sulfo-dihydrodehydrokostuslakton ze *Saussurea lappa* (s netypickou sulfonovou skupinou) vykazuje antibakteriální aktivitu (Yin, 2007). Laktony působí i antimykoticky. Dehydroleukodin a 3,4-epoxyleukodin (guajanolidy) jsou aktivní proti gram-pozitivním, gram-negativním bakteriím, kvasinkám a dermatofytům (Giesbrecht, 1990). Tomentosin izolovaný z *Inula viscosa* prokázal antimykotickou aktivitu proti *Microsporum canis*, *Microsporum gypseum* a *Trichophyton mentagrophytes* (Cafarchia, 2001). Encelin izolovaný z *Montanoa speciosa* ovlivňuje růst a morfogenetický proces houbových buněk (Sabanero, 1995). Antimikrobiální a cytotoxická aktivita byla prokázána také u tagitininu C a F ve studii (Mungarulire, 1990). Glaukolid B izolovaný z *Vernonia*



*eremophila* má kromě antimikrobiální a cytotoxické aktivity i analgetické a schistosomicidní účinky (Burim, 1999).

Seskviterpenové laktony jsou aktivní nejen proti bakteriím, virům a houbám, ale působí i na další organismy. Jedním z mnoha příkladů je artemisinin, lakton s významným antimalarickým působením, který je velmi efektivní proti multirezistentnímu kmenu *Plasmodium falciparum* (Ferreira, 1994; Ro, 2006; Simonnet, 2006). V dnešní době, kdy se neustále zvyšuje rezistence prvoka *Plasmodium falciparum* na tradiční léčiva typu chlorochinu a meflochinu, hraje artemisinin (komerčně označovaný Qinghaosu) hlavní roli při vývoji nových antimalarik (De Magalhaes, 1997). Mírnou antiplasmodiální, ale silnou antimykobakteriální aktivitu prokázaly také laktony izolované z *Camchaya calcare*. Některé z nich jsou cytotoxické (Vongvanich, 2006). Psilostachyin a peruvín jsou antiprotozoálně působící laktony izolované z *Ambrosia tenuifolia*. Oba způsobily silný trypanocidní efekt proti epimastigotám *Trypanosoma cruzi* a zároveň výrazný leishmanicidní účinek proti rodu *Leishmania* (Sulsen, 2008). Anthekularin izolovaný z *Anthemis auriculata* prokazuje antitrypanosomální a antiplasmodiální aktivitu (Karioti, 2007). Inhibici růstu parazitů z kmenů *Leishmania mexicana*, *Trypanosoma cruzi*, *Trichomonas vaginalis* vykazuje ethanolový extrakt z *Neurolaena lobata*, ze kterého byly izolovány 3 germakranolidy. V čisté formě jsou vysoce aktivní proti *Leishmania mexicana* a *Trypanosoma cruzi* (Berger, 2001). Dehydrozaluzanin C (guajanolid) izolovaný z *Munnozia maronii* inhibuje *in vitro* růst promastigot *Leishmania amazonensis* a epimastigot *Trypanosoma cruzi* (Fournet, 1993). Některé laktony vykazují také účinky proti měkkýšům (Borkosky, 2009; Slacanin, 1988).

Jiné laktony působí insekticidně (Guillet, 2000). Příkladem může být knicin (Landau, 1994). Pro kobylku luční *Melanoplus sanguinipes* je nejvíce toxickým laktonem parthenin (Isman, 1985). Isoalantolaktón > alantolaktón > parthenin > koronopilin > bipinnatin > hymenolin (seřazeny podle klesající aktivity) představují toxicitu pro komára *Aedes atropalpus* (Arnason, 1985). Dehydroleukodin (guajanolid) z *Artemisia tridentata vasevana* prokázal inhibiční efekt na růst (moučného červa) *Heliothis zea* (Wisdom, 1983). Jsou známé také laktony ochraňující rostlinu proti požití hmyzem

(Rodriguez, 1985). Jsou to např. helenalin, schkuhriolid, desacetylarktolid, erivanin, ursiniolid, arktolid, ageratriol, akroptilin, 3-hydroxygrandiolid a 3-oxograndiolid. (Nawrot, 1983). Tento účinek helenalinu potvrdila studie (Nawrot, 1986). Na druhou stranu, některé laktony mohou být jinými organismy využívány. Např. damsín a kyselina damsínová z *Ambrosia ambrosioides* jsou využívány býložravým členovcem *Physonota arizonae* k obraně před nepřítelem (Aregullin, 2003).

Toxicitu pro žábřonožku *Artemia salina* představují laktony z *Stachycephalum argentinum*. Nejvíce aktivní se jevil kostunolid (Alarcon, 2000).

Cytotoxicita byla prokázána u celé řady laktonů čeledi Asteraceae (akroptilin, alantolakton, alatolid, ambrosin, anisatin, arktolid, aromaticin, arteglin A, autumnolid, baileyin, bakkenolid A, budlein A, cynaropikrin, damsín, deoxaelefantopin, desacetoxymatrikarin, desacetyeupaserin, diplofylin, elefantopin, eleganin, encelin, epitulipinolid, eremantolid A, eriolangin, eupachlorin, eupakumin, fantomolin, farinosin, fastigilin B a C, florinelanin, gailardin, geigerin, graminiliatrin, groshemin, helenalin, hiyodorilakton A, hymenoflorin, hymenoxon, chamissonin diacetát, chlorohyssopifolin A, chlororepdiolid, ivalin, izohelenol, kalaxin, kanin, liatrin, linifolin A, ludovicin A, mexikanin E a I, mikrohelenin A a C, molefantin, molefantinin, multigilin, niveusin C, nobilin, onopordopikrin, orizabin, paucin, pleniradin, plenolin, provincialin, radiatin, ridentin, salonitenolidsantamarin,  $\alpha$ -santonin,  $\beta$ -santonin, spikatin, stramonin B, tagitinin F, tamaulipin A, tenulin, tulipinolid, ursiniolid A, vermeerin, vernodalin, viguiestenin, xanthatin (Jahodář, 2004). Podle jedné studie je cytotoxická aktivita laktonů způsobena reakcí  $\alpha,\beta$ -nenasycené karbonylové skupiny s thioley (např. cystein) a tak podporuje hledisko, že laktony inhibují růst nádoru selektivní alkylací biologických makromolekul, které působí jako regulátory růstu (klíčové enzymy kontrolující buněčné dělení). Tím inhibují různé buněčné funkce a nakonec dojde k apoptóze (Fernandes, 2008; Stefanovic, 1985). Tomentosin a inuviskolid z *Inula viscosa* byly testovány na antikarcinogenní aktivitu proti lidským melanomovým buňkám. Výsledky ukázaly, že oba laktony inhibují proliferaci těchto buněk (Rozenblat, 2008). 8-Epi-xanthatin a epoxid 8-epi-xanthatinu jsou xanthanolidy izolované z listů *Xanthium strumarium*, které představují *in vitro* silnou inhibiční aktivitu pro buněčné kultury různých

druhů lidských nádorů. Projevily také silnou inhibici farnesyltransferasy (enzym, který převádí farnesyl isoprenoid na určité proteiny buněčné membrány; inhibitory tohoto enzymu tlumí růst nádorových buněk s minimálním ovlivněním buněk zdravých) (Kim, 2003). Tuto inhibici prokázaly také angeloylkumambrin B a tigloylkumambrin B (Jang, Kwon et al. 1999). Antikarcinogenně působí i kostunolid ze *Saussurea lappa*, který inhibuje angiogenezi (Jeong, 2002). 4 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -epoxy-10 $\alpha$ ,14-dihydroinuvisolid, 2,3-dihydroaromomatin, telekin a ivalin izolované z *Carpesium abrotanoides* projevily cytotoxicitu srovnatelnou s cisplatinou (Lee, 2002). Hemistepsin B, kumambrin B, kostunolid a tulipinolid ukázaly silnou cytotoxickou aktivitu proti lidským rakovinovým buňkám, neaktivnější byl kostunolid. Navíc kumambrin A, hendelin a kostunolid měly mnohem větší aktivitu než referenční látka adriamycin (Jang, 1998). Ixerochinolid (guajanolid) z *Ixeris chinensis* prokázal také silnou cytotoxickou aktivitu proti lidským rakovinovým buňkám (Khalil, 2005). Z hypokretenolidů izolovaných z *Leontodon hispidus* vykazuje výraznou aktivitu 14-hydroxyhypokretenolid, jeho  $\beta$ -D-glukosid nebyl aktivní dokonce ani při vysoké koncentraci a jeho ester 14-hydroxyhypokretenolid- $\beta$ -D-glukosid-4',14''-hydroxyhypokreteroát projevily dokonce mnohem větší cytotoxicitu než porovnávací látka helenalin (Zidorn, 1999). Výraznou cytotoxickou aktivitu mají také hemistepsin a 6-O-(2-methylpropenoyl)-3-hydroxy-4(15),10(14),11(13)-guajatrien-12,8-olid izolované z *Hemisteptia lyrata* (Jang, Yang et al. 1999), stejně jako solstitialin monoacetát a matrikarin (Gurkan, 1998). Ovatifolin acetát izolovaný z *Podanthus ovatifolius* vykazuje kromě cytotoxicity také antineoplastickou aktivitu (Alarcon, 1992). Erioflorin acetát a erioflorin-methakrylát (*Podanthus ovatifolius*) jsou laktony s cytotoxickou aktivitou (Jahodář, 2004), avšak v testu genotoxicity žádnou aktivitu neprokázaly (Cea, 1990). Kumanin projevily jen velmi nízkou cytotoxicitu (Lastra, 2004).

Některé laktony jsou schopné ovlivnit imunitní systém. Příkladem může být arglabin izolovaný z *Artemisia myriantha*, který prokázal imunomodulační vlastnosti (Bottex-Gauthier, 1993), nebo millerenolid s imunopresivními účinky; má také velmi nízkou cytotoxicitu (Omar, 2008).

Dalším příkladem biologických účinků je inhibice ulcerogenní aktivity. Jako droga s antiulcerózním účinkem je v lidovém léčitelství používána *Conyza bonariensis*, která obsahuje

laktony (např. damsín, koronopilin, 3-hydroxydamsín, ambrosín, kumanín a odoratin) (Fusco, 1999). Chlorojanerín, 13-acetylsolstitialin A a solstitialin A jsou laktony, které inhibují ulcerogenní aktivitu způsobenou různými agens (Gurbuz, 2007).

Antihepatotoxickou aktivitu představuje cichotybosid, seskviterpenický glykosid guajanolidového typu (2 $\alpha$ ,6 $\beta$ ,7 $\beta$ ,15-tetrahydroxy-1(10),4(5)-dien-guajan-9 $\alpha$ , 12-olid-7-O- $\beta$ -kaffeoyl-15-O- $\beta$ -D-glukosid). Aktivita je srovnatelná se silymarinem (referenční látka) (Ahmed, 2008).

Budlein A, zaluzanin A, a glaukolidy D a E uvolňují kontrakce hladkého svalstva krysí dělohy indukované chloridem draselným. Zaluzanin A dokázal relaxovat i kontrakce navozené oxytocinem (Van Calsteren, 2008).

Hiyodorilakton A izolovaný z *Pectis trifida* inhiboval při topické aplikaci (v krému) tvorbu melaninu (Yokoyama, 1993). Stejný účinek má i molefantinin. V myším melanomových buňkách tlumil tvorbu melaninu inhibicí tyrosinasy (Hasegawa, 2005).

Laktony jsou také potencionálními bioherbicidy (látky přírodního původu, které mají vliv na růst rostlin). Je pravděpodobné, že pro tento herbicidní účinek jsou nezbytné  $\alpha$ -methylen- $\gamma$ -laktonové nebo jiné  $\alpha,\beta$ -nenasycené uskupení (Cespedes, 2006). Příkladem může být glaukolid B, laktony z *Vernonia fruticulosa* (Barbosa, 2004), nebo trilobolid-6-O-isobutyrat, 1 $\beta$ -acetoxy-4 $\alpha$ ,9 $\alpha$ -dihydroxy-6 $\beta$ -isobutyroxyprostatolid, 1 $\beta$ ,9 $\alpha$ -diacetoxy-4 $\alpha$ -hydroxy-6 $\beta$ -isobutyroxyprostatolid, 1 $\beta$ ,9 $\alpha$ -diacetoxy-4 $\alpha$ -hydroxy-6 $\beta$ -methakryloxyprostatolid, 1 $\beta$ ,4 $\alpha$ -dihydroxy-9 $\alpha$ -tigloyloxy-6 $\beta$ -methylpropanoylprostatolid a 9 $\alpha$ -angeloyloxy-1 $\beta$ ,4 $\alpha$ -dihydroxy-6 $\beta$ -methylpropanoylprostatolid, které byly izolovány z *Wedelia trilobata* (Zhang, 2004). Dehydrozaluzanin C byl v testu regulace růstu rostlin dokonce více aktivní než porovnávací látka, herbicid Logran (Macias, 2000). Isoalantolakton významně inhibuje klíčení některých druhů plevelných rostlin a na druhou stranu neovlivňuje klíčení kulturních rostlin, což naznačuje jeho potencionální využití v zemědělství (Picman, 1988). Jiná studie ukázala poměrně značnou inhibiční schopnost isoalantolaktonu na klíčení semen pšenice. V testu fytotoxicity laktony inhibovaly klíčení semen pšenice v tomto pořadí (od nejaktivnějšího): stizolin >

isoalantolakton >  $\beta$ -santonin > helenin > artemin > artemisinin > gaillardin > tauremisin (Starykh, 1997).

Některé laktony mají prokázáno více aktivit, např. angeloylkumambrin B, tigloylkumambrin B, tulipinolid a kostunolid projevily kromě výše popsaných účinků také silnou inhibici acyl-konezym A:cholesterol acyltransferasy (EC 2.3.1.26) (Jang, Park, Ko, et al., 1999). Inulicin, lakton z *Inula japonica*, představuje celou řadu účinků: stimuluje CNS a hladkou svalovinu střeva, působí protizánětlivě a antiulcerogenně a má diuretický účinek. V nízkých dávkách neovlivňuje srdeční činnost, ale ve vyšších ji může inhibovat; je relativně málo toxický (Belova, 1981). Také helenalin má vícero efektů. Tento cytotoxický lakton s prokázaným protizánětlivým účinkem, byl aktivní v *in vitro* testu na kardiotonickou aktivitu (Itoigawa, 1987). Vulgarin, cytotoxický lakton izolovaný z rodů *Artemisia* a *Achillea* inhibuje apoptózu lidských T-buněk navozenou arsenitanem sodným (Bernard, 2005). Guajanolidy 10-epi-8-deoxykumambrin B, dehydroleukodin a ludartin inhibují aromatasovou aktivitu v lidských placentárních mikrosomech (Blanco, 1997).

#### **4.6. *Leuzea carthamoides* L.**

Parcha saflorová – *Leuzea carthamoides* L. – patří mezi zástupce Asteraceae obsahující mimo jiných látek i seskviterpenové laktony guajanolidového typu.

##### **a) Popis a výskyt**

Parcha saflorová (lidově maraloví kořen), je vytrvalá rostlina s dřevnatějším oddenkem, z něhož vyrůstá několik kořenů a nevětvených lodyh s jednotlivými kulovitými úbory na každém vrcholu. Květy jsou růžovo-fialové, oboupohlavné, plody jsou žebrované nažky s tuhým chmýrem (Opletal, 1997). Vyrůstá až do výšky 150 cm. Pochází z Altaje a jižní Sibiře, kde roste v nadmořské výšce 1200 – 2300 m. Pro značné léčivé účinky je již několik desítek let pěstována i ve střední a jižní Evropě. V tradičním léčitelství na Sibiři byla po staletí používána proti slabosti z přepracování nebo

k rekonvalescenci po nemoci. V minulém století byla hodně využívána ruskými sportovci k regeneraci sil (Kokoška, 2009).



Obr. 6 *Leuzea carthamoides* L. (UK v Praze, Farmaceutická fakulta v Hr. Králové, Botanická zahrada léčivých rostlin)

#### **b) Obsahové látky**

Z kořenů a nati (listů) parchy saflorové bylo postupně izolováno několik různých skupin látek. Hlavními obsahovými látkami jsou ekdysteroidy a fenolické látky (flavonoidy a fenolické kyseliny) doprovázené polyiny (polyacetyleny), seskviterpenovými laktony, triterpenovými glykosidy a terpeny (malé množství silice) (Kokoška, 2009).

Jako jedny z prvních ekdysteroidů byly izolovány inokosteron a 20-hydroxyekdyson, který je nejrozšířenějším ekdysonem ve všech částech rostliny. Během dalších 30 let bylo získáno 50 různých ekdysteroidů. Z kořenů byly dále izolovány např.:  $\beta$ -sitosterol, stigmasterol,  $\Delta^7$ -avenasterol,

kampesterol a cholesterol; ze semen – cholesterol, stigmasterol,  $\beta$ -sitosterol,  $\beta$ -sitostanol (Kokoška, 2009).

Flavonoidy se vyskytují v kořenech, v nati i v květenství (Kolečkář, Opletal et al, 2008). V roce 1998 byla z kořenů izolována látka biogeneticky úzce příbuzná s flavonoidy: (*E*)-3,30-dimethoxy-4,40-dihydroxystilben. Vedle flavonoidů se v rostlině vyskytují také fenolické kyseliny, některé lignany (např. karthamogenin, karthamosid, trachelogenin a trachelosid) a taniny (např. kyselina ellagová vyskytující se jak v kořenech, tak i v nati). Semena obsahují serotoninové fenylypropanoidy, konkrétně: *N*-(*Z*)-feruoylserotonin, *N*-(*Z*)-isoferuoylserotonin, *N*-(*E*)-feruoylserotonin a *N*-(*E*)-isoferuoylserotonin (Kokoška, 2009).

Z kořenů byly také izolovány různé polyacetyleny (např. (*E*)-2-[5-(hept-5-en-1,3-diinyl)-thien-2-yl]-ethan-1,2-diol) (Chobot, 2003) a seskviterpenové laktony (cynaropikrin, repdiolid, chlorojanerin, repensolid = cebellin E a janerin) (Kokoška, 2009).

Triterpenové glykosidy se nacházejí jak v podzemní, tak i v nadzemních částech a jsou to např. rhapontikosidy A, B, C, D, E, F, G, H. Karthamenol a karthamenyl-acetát jsou triterpenoidy izolované z kořenů rostliny (Kokoška, 2009).

*L. carthamoides* obsahuje také silici, jejichž složení není ještě zcela přesně stanoveno (Kokoška, 2009).

### **c) Biologická aktivita**

Z hlediska biologické aktivity skrývá *L. carthamoides* obrovský léčebný potenciál. Různé extrakty i jednotlivé látky poskytují různé farmakologické účinky na různé orgány (mozek, krev, kardiovaskulární a nervový systém) nebo biochemické procesy a fyziologické funkce. *L. carthamoides* je označována jako adaptogen – zvyšuje odolnost organismu proti stresu (poranění, úzkosti, vyčerpání). Experimentální farmakologické a klinické výzkumy provedené během posledních 25 let ukázaly, že extrakt *L. carthamoides* i jednotlivé izolované látky z různých částí rostliny vykazují specifické biologické efekty se značnými adaptogenními vlastnostmi, jako jsou stimulace imunitního

systému, eliminace volných radikálů, zvýšení biosynthesy proteinů a práce schopnosti spolu s výdrží a výkonem a zlepšení kardiovaskulárních funkcí a myšlení (Opletal, 1990; Kokoška, 2009).

Kardiovaskulární systém a krev ovlivňuje *L. carthamoides* významně. Studie prováděná na kočkách potvrdila značný hypotenzivní účinek jejího ethanolového extraktu. Bylo prokázáno, že 20-hydroxyekdyson stimuluje sekreci žluče a upravuje její chemické vlastnosti díky tomu, že snižuje obsah cholesterolu a zvyšuje hladiny žlučových kyselin a bilirubinu. Ethanolový extrakt z kořene prokázal významný antidiabetický efekt – u myši a krys s indukovaným diabetem – snížil hladinu krevní glukosy a zvýšil redukovanou hladinu jaterního glykogenu. Jiná studie ukázala pozitivní efekt extraktu *L. carthamoides* na rheologické vlastnosti krve. Opakované podávání preparátu založeného na extraktu *L. carthamoides* vyvolalo zřetelný antiarytmický účinek. 20-Hydroxyekdyson v opakovaných dávkách zvyšuje obsah erytrocytů a hemoglobinu. Preparát vytvořený z izolovaných flavonoidů (hesperetin, kvercetin, kvercetaletin, luteolin, kempferol, isorhamnetin, chrysanthemín a cyanin) zabraňuje ukládání cholesterolu a triglyceridů v cévách, potlačuje lokální mechanismy aterogeneze a podstatně redukuje projevy aterosklerózy (Kokoška, 2009). Sumární ethanolový extrakt *L. carthamoides* také značně snižuje *in vitro* agregaci trombocytů způsobenou agonisty COL a ADP; flavonoidy (eriodiktyol a patuletin) ovlivňují trombocytární agregaci indikovanou COL a AA (Kolečkář, Brojerová et al, 2008). Pozitivní efekt flavonoidů a 20-hydroxyekdysonu na kardiovaskulární systém a krev byl potvrzen četnými studiemi *in vivo* na zvířecích modelech (Kokoška, 2009).

Několik *in vivo* testů prováděných na krysách a králících ukázalo značný vliv ekdysteroidů, *N*-feruloylserotoninových isomerů a různých extraktů *L. carthamoides* na savčí nervový systém (zvýšení lokomoční aktivity a excitace CNS, zlepšení učení a paměti, prevence destruktivních změn kůry mozkové při mozkové ischemii). Podání ekdystenu králíkům – jako modelovým zvířatům – vyvolalo jasnou aktivaci jejich EEG a probuzení z thiopentalem navozeného spánku. Frakce bohatá na *N*-feruloylserotoniny izolovaná ze semen *L. carthamoides* redukovala u krys indukovaný stres. Co se týká vlivu na CNS, byla provedena pouze jedna humánní studie extraktu *L. carthamoides*. Výsledky



ukázaly, že extrakt *L. carthamoides* upravil depresivní projevy u alkoholiků v depresivním stádiu a u pacientů s GIT bolestí zlepšil zdravotní stav (Kokoška, 2009).

Vysoká antioxidační aktivita methanolového extraktu *L. carthamoides* (způsobená vysokým obsahem polyfenolických látek – flavonoidů a flavonolů) při zhášení DPPH byla prokázána ve studii (Miliauskas, 2005). Tento extrakt byl vyhodnocen jako neúčinnější z testovaných extraktů. Tyto výsledky potvrdila srovnávací studie 88 extraktů čeledí Asteraceae a Cichoriaceae, kde byl opět extrakt *L. carthamoides* vybrán jako nejefektivnější. Antioxidační aktivita byla vyhodnocena pomocí DPPH a FRAP testů a porovnávána s troloxem a kvercetinem (referenční látky). Oba testy vyhodnotily jako neúčinnější antioxidant 6-hydroxykempferol-7-O-(6''-O-acetyl-β-D-glukopyranosid) (Kolečkář, Opletal et al, 2008).

Z imunologického hlediska prokázal extrakt *L. carthamoides* také určité efekty. Frakce (z čerstvých listů *L. carthamoides*) bohatá na polysacharidy zvýšila proliferaci lidských lymfocytů a snížila uvolňování kyslíkových radikálů lidskými granulocyty *in vitro*, což vypovídá o tom, že rostlina obsahuje látky s imunomodulačními vlastnostmi. Jiná studie prokázala, že ekdysteroidy (20-hydroxyekdyson, polypodin B, ajugasteron C, inokosteron, makisteron A, karthamosteron, poststeron, rubrosteron a dihydrorubrosteron) za tuto aktivitu nezodpovídají (Kokoška, 2009).

Některé studie potvrdily protinádorové působení. Např. lipofilní extrakt z kořene *L. carthamoides* byl efektivní proti lidským nádorovým buňkám, zatímco 20-hydroxyekdyson neprokázal žádný účinek, stejně jako vodný, methanolový a chloroformový extrakt z listů (Kokoška, 2009).

Thiofenový polyin, (*E*)-2-[5-(hept-5-en-1,3-diinyl)-thien-2-yl]-ethan-1,2-diol, izolovaný z ethanolického extraktu kořenů *L. carthamoides* vykázal významnou antimykotickou aktivitu (Chobot, 2003). Kromě toho, jiné *in vitro* testy prokázaly inhibiční aktivitu různých sumárních extraktů z kořene nebo nati *L. carthamoides*, nebo izolovaných frakcí proti bakteriím a plísním.

20-Hydroxyekdyson je také základním steroidním hormonem hmyzu (hraje důležitou roli v kontrole růstu, vývoje, metabolismu, metamorfóze a reprodukce), a tak je pravděpodobné, že i některé další ekdysteroidy budou mít na hmyz podobné efekty. Slouží k ochraně rostlin proti požeru,

nebo jako repelenty. Účinek na hmyz mají také dva lignanové glykosidy (trachelosid a karthamosid) a seskviterpenové laktony (chlorojanerin).

Z toxikologického hlediska byla *L. carthamoides* vyhodnocena jako velmi bezpečná rostlina (Kokoška, 2009).

## 5. MATERIÁL A METODY

### 5.1. Chemikálie, rozpouštědla, standardy

#### Chemikálie

Adenosindifosfát (Chrono-Log Co. (Havertown, PA, USA)

2-Amino-2-(hydroxymethyl)propan-1,3-diol puriss. (TRIS) (Sigma-Aldrich)

Arašidonová kyselina (Chrono-Log Co., Havertown, PA, USA)

Citrán sodný 3,8% (Biotika, Slovenská Lupča)

2,2'-Difenyl-1-pikrylhydrazyl radikál (DPPH) (Sigma-Aldrich)

Dipyridamol (izolován z přípravku Curantyl N 75 (Berlin-Chemie)

Chlorid železitý hexahdrát p. a. (Fisher Scientific)

Kolagen (Chrono-Log Co. (Havertown, PA, USA)

Kvercetin (Carl Roth)

Kyselina acetylsalicylová (ČL 2002)

Kyselina chlorovodíková 36% p. a. (Fisher Scientific)

Kyselina sírová 95% p. a. (Fisher Scientific)

Pufr acetátový (300 mM, pH 3.6)

Síran železnatý heptahdrát (Fisher Scientific)

Tri(2-pyridyl)-s-triazin puriss. (TPTZ) (Sigma-Aldrich)

Trolox (Sigma-Aldrich)

Trombin (Chrono-Log Co. (Havertown, PA, USA)

Vanilin č. (Sigma-aldrich)

#### Rozpouštědla

Acetonitril Chromasolv for HPLC, gradient grade (Sigma-Aldrich) (AcCN)

Benzín (ČsL 4)

Diethylether č. (Penta, ČR) (Et<sub>2</sub>O)

Dichlormethan p. a. (Penta, ČR) ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ )  
Dimethylsulfoxid bezvodý purin. (Sigma-Aldrich) (DMSO)  
Ethanol 95% denaturovaný 1 % metanolu (Lihovar Hrobice, ČR) (EtOH)  
Ethyl-acetát č. (Penta, ČR) (EtOAc)  
Chloroform p. a. (Penta, ČR) ( $\text{CHCl}_3$ )  
Chloroform pro NMR deuterovaný (Sigma-Aldrich) ( $\text{CDCl}_3$ )  
Methanol p. a. (Penta, ČR) (MeOH)  
Petrolether pur. , t. v. 30–70 °C (Reachim Bucuresti) (Pe)  
Toluen č. (Penta, ČR) ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_3$ )

### Činidla

Vanilin-kyselina sírová (OPLETAL, 2005)

Roztok 1: 1% roztok vanilinu v ethanolu.

Roztok 2: 95% kyselina sírová.

Těsně před použitím se smíchá 9 dílů roztoku 1 s 1 dílem roztoku 2 (v/v), směsí se postříká chromatografická deska a zahřeje na 100–120 °C až do objevení barevných skvrn.

## **5.2. Příprava chromatografických adsorbentů a sušidel**

*Silikagel L 100/250* (Lachema Brno) použitý pro chromatografii byl připraven z obchodního preparátu – přesítován na potřebnou frakci, vsypán do chromatografické trubice, promyt chloroformem, methanolem a vysušen. Poté byl 4 hodiny aktivován v sušárně při 160 °C ve vrstvě ne vyšší než 2 cm. Po zchlazení byl deaktivován přidávkem 10 % destilované vody a po dobu 1 hodiny ekvilibrován za stálého třepání na karuselu kulového mlýna.

*Silikagelové perly* (sušidlo do exsikátoru) byly vysušeny v horkovzdušné sušárně při 160 °C po dobu 3 hodin.

### **5.3. Destilace rozpouštědel**

Všechna používaná rozpouštědla, která nebyla stupně čistoty p. a. nebo pro HPLC byla před použitím předestilována. Prvních 5 % destilátu bylo odloženo a po destilaci ponechán zbytek kapaliny asi o objemu 10 %.

### **5.4. Sloupcová chromatografie**

Chromatografický sloupec byl připraven nalitím suspenze adsorbentu v rozpouštědle obvyklým způsobem při otevřeném odtokovém kohoutu. Skleněný sloupec byl v dolní části opatřen vatovým filtrem. Na povrch usazeného adsorbentu byl nanesen vysušený roztěr vzorku s adsorbentem. Roztěr vzorku byl připraven zatepla smísením rozpuštěného vzorku s adsorbentem (hmotnostní poměr vzorek + adsorbent 1 : 3) a vysušením na vodní lázni. Dосуšení bylo provedeno ve vakuovém exsikátoru nad perlami silikagelu po dobu 24 hodin (cca 0,66 kPa). Vrstva s dělenou směsí byla přikryta kolečkem filtračního papíru, který byl poté zatížen skleněnými kuličkami.

### **5.5. Odpařování frakcí**

Frakce získané sloupcovou chromatografií byly odpařovány vakuovou destilací při teplotě do 50 °C a tlaku 1,33 kPa v aparatuře s kapilárou nebo na vakuové odparce za použití difuzní membránové vývěvy.

### **5.6. Sušení extraktů, frakcí a izolovaných látek**

Rostlinné extrakty, frakce a izolované látky byly vysušeny bez přístupu světla ve vakuovém exsikátoru za normální teploty a tlaku 0,66 kPa nad silikagelovými perlami po dobu minimálně 12 hodin.

Ztráta sušením byla stanovena obvyklým způsobem (ČL 2005 – Dopln. 2006).

### **5.7. Tenkovrstvá chromatografie (TLC) orientační**

Orientační tenkovrstvá chromatografie byla prováděna na komerčních deskách silikagelu Kieselgel 60 F<sub>254</sub> (Merck AG, Darmstadt, Německo) bez indikátoru i s UV indikátory pro oblast  $\lambda = 254, 366$  nm. Chromatogramy byly vyvíjeny vzestupným způsobem v normálních chromatografických komorách, nasycených parami mobilní fáze, nejdříve za 2 hodiny po nalití eluční soustavy.

### **5.8. Tenkovrstvá chromatografie (TLC) preparační**

Desky Silufol 20 (200 × 200 mm, Kavalier Votice) byly nejprve v chromatografické komoře promyty čistou mobilní fází, odvětrány a takto připraveny k nanášení vzorku. Nanáška činila 0,5 mg látky na 1 cm desky. Chromatogramy byly vyvíjeny v normálních chromatografických komorách nasycených parami mobilní fáze, nejdříve za 2 hodiny po nalití eluční soustavy a pak vysušeny v digestoři. Jednotlivé látky byly pak na adsorbentu detekovány pomocí UV, seškrábány a eluovány z adsorbentu ve chromatografických sloupečcích potřebného objemu. Adsorbent ve sloupcích byl promyt směsí EtOH + CHCl<sub>3</sub> 1 : 1 v poměru 1 : 5 (w/v) a eluáty byly odpařeny obvyklým způsobem.

### **5.9. Měření teploty tání**

Teplota tání izolovaných krystalických látek (nekorigovaná) byla měřena na mikrovýhřevném stolku Boetius. Látky byly předem vysušeny ve vakuovém exsikátoru nad silikagelovými perlami po dobu 24 hodin za normální teploty a tlaku 0,66 kPa.

### **5.10. Preparativní HPLC**

Preparativní HPLC bylo provedeno na Katedře farmaceutické botaniky a ekologie za následujících podmínek:

Přístroj: Merck HPLC Preparative System: Knauer Preparative Pump K-1800, Detector DAD K-2700 (Knauer), Büchi Fraction Collector B-684, Termostat Knauer D-14163)

Kolona: Hibar, LiChrosorb RP18, 7  $\mu\text{m}$ , 250  $\times$  25 mm

Průtok: 12 ml min<sup>-1</sup>

Detekce:  $\lambda = 234$  a 210 nm

Mobilní fáze: 30 % AcCN/70 % vody (v/v), za 20 min 50 % AcCN a dále isokraticky.

### 5.11. Nukleární magnetická rezonance

NMR analýza byla provedena na Katedře anorganické a organické chemie (Farmaceutická fakulta UK, Hradec Králové) na přístroji VARIAN Mercury – Vx BB 300 spectrometer (Varian, Inc. Corporate Headquarters, Palo Alto, USA): <sup>1</sup>H NMR 300 MHz a <sup>13</sup>C NMR 75.46 MHz. Izolované látky byly rozpuštěny v DMSO nebo CDCl<sub>3</sub>.

### 5.12. Hmotnostní spektrofotometrie

Měření bylo provedeno na kapalinovém chromatografu Agilent HP1100 (Agilent, Palo Alto, USA), sestávajícím z vakuové odplyňovací jednotky (model G1322A), kvartérního čerpadla mobilní fáze (G1311A), automatického dávkovače vzorku (G1313A), UV-VIS detektoru s proměnlivou vlnovou délkou (G1314A), fluorescenčního detektoru (G1321A) a hmotnostního detektoru (G1946VL).

Látky byly rozpuštěny ve vodě nebo methanolu. Roztok byl potom sekvenčně dávkován do proudu vody (průtok 0,2 ml min<sup>-1</sup>) a zaveden do hmotnostního detektoru. Nastavení MS detektoru – elektrosprej: tlak sušícího plynu 60 psig, průtok sušícího plynu 12 l min, teplota sušícího plynu 350°C, napětí na kapiláře 6000 V. Hmotnostní detektor: napětí na fragmentoru 0 – 300 V, detekce v modu SCAN (50 – 400 m/z).

### **5.13. Příprava lyofilizovaných rostlinných extraktů**

Rostliny (Tab. 2) byly sbírány na různých místech České Republiky během roku 2001 a 2002. Rostlinný materiál byl usušen (přibližně 5 g) a rozdrobněn v elektrickém mlýnku na směs o velikosti částic přibližně 0,1 mm. 5 g rozdrobněné drogy bylo extrahováno 75 ml ethanolu (70%, w/w) v ultrazvukové lázni Sonorex Super 10P (Bandelin) při stupni 10 po dobu 30 min za laboratorní teploty. Extrakt byl poté zfiltrován a rostlinný materiál znovu promyt 3 × 10 ml ethanolu (70%, w/w). Filtráty byly spojeny, spojený filtrát částečně odpařen (60 °C), ochlazen a přefiltrován přes sloupec čisté křemeliny (Hyflo Super Cel) a následně úplně odpařen na vakuové odparce (60 °C) do sirupovité konzistence. Pomocí kapalného dusíku byl zamrazen a po dobu 3 hod lyofilizován na přístroji FreeZone (fy Labconco, USA). Vysušený extrakt byl převeden do 10 ml lahviček, převrstven argonem a hermeticky uzavřen. Lahvičky byly skladovány bez přístupu světla a při teplotě -23 až -27 °C až do začátku měření.

### **5.14. Metodika měření agregace destiček**

Úroveň agregace destiček byla sledována agregometrem ChronoLog 500Ca spojeným s osobním počítačem. Proces agregace byl vyhodnocován programem Aggro/Link for Windows, verze 4.75. Protože je uvedená metodika využívána pouze na větších klinických pracovištích a agregometr nepatří mezi běžné laboratorní přístroje, jsou v následující části podrobněji popsány principy agregometrie a použitý přístroj.

Destičky adherují za různých podmínek a v přítomnosti rozličných látek. Termín "agregace destiček" vyjadřuje proces adheze jedné destičky ke druhé. Tento jev může být indukován přidávkem látek vyvolávajících agregaci do plazmy obohacené destičkami nebo do plné krve. Průběh agregace destiček závisí na koncentraci vápenatých iontů, fibrinogenu, jednom či více plazmatických faktorech a přítomné agregační látce. Agregace proběhne specificky, v závislosti na typu látky vyvolávající agregaci a na její koncentraci. Pro optickou agregometrii se jako faktory indukující agregaci (agonisté agregace) používají AA, ADP, epinefrin, COL, TR a ristocetin.



Výběr těchto látek má základ v mechanismu srážení. ADP a epinefrin jsou obsaženy v organelách destiček, odtud jsou uvolňovány při tvorbě primární trombocytární zátky a tím podporují další agregaci destiček. COL ale na druhou stranu v destičkách obsažen není, je přítomen v endotelu cév a je považován za první srážecí nebo prokoagulační faktor, se kterým se setkají destičky po cévním poranění. Tím jsou *in vitro* studie reakce destiček na COL velmi významné.

Agregace destiček *in vitro* umožňuje v klinické praxi kontrolu funkce destiček a dovoluje tak najít vhodnou terapii pro pacienty s poškozenou funkcí srážení a poznání dědičných dysfunkcí. Je však také vhodnou metodou, která umožňuje určit, zda látka přidaná k nativním trombocytům před samotným agonistou agregace ovlivňuje jím následně vyvolaný proces agregace. Tedy zda látka působí pro- nebo antiagregačně. Obvykle jsou používány dva základní typy agregačních testů:

– optická agregometrie v PRP

– impedanční agregometrie v plné krvi (Jun, 2005).

### **Optická agregometrie**

Destičky v suspenzi plazmy jsou izolovány ze vzorku plné krve s protisrážlivou úpravou odstředěním při nízkých otáčkách (10 min,  $240 \times g$  za chlazení na  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Tím se získá PRP – což je plazma, ve které jako majoritní krevní elementy převažují trombocyty. Odstředěním při vysokých otáčkách je získána takzvaná PPP, tedy čistá plazma bez krevních elementů. Agregometr Bornova typu nebo optický agregometr je spektrofotometr s fixní vlnovou délkou a s prostorem na vzorky termostatovaným na teplotu  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Protože pro agregaci destiček *in vitro* je nutný jejich vzájemný kontakt, je zajištěno míchání testovaného vzorku během měření magnetickým míchadlem, které se vkládá do kyvety před započítím měření. Vlastní měřicí prostor je u agregometru ChronoLog 500Ca řešen tak, že paprsek infračerveného záření o vlnové délce  $950\text{ nm}$  prochází přes dvě kyvety, z nichž jedna obsahuje PRP (vzorek) a druhá PPP (kontrola). Křemíkové fotodiody detekují záření prošlé přes kyvety se vzorky: PRP je považována za vzorek s 0% transmitancí či agregací a PPP za vzorek se 100% transmitancí či agregací. Každá kyveta má svůj zdroj záření i snímač, principem jde tedy o dvoupaprskový fotometr.

Rozdíl ve výstupním signálu fotodiod pak vypovídá o aktuálním stavu transmitance (neboli agregace) měřeného vzorku, jelikož vznikající agregáty trombocytů kontinuálně zvyšují optickou propustnost vzorku. Stiskem tlačítka na agregometru se nastaví hodnoty pro 0% a 100% transmitanci. Pro testování je nutný početní rozdíl trombocytů mezi testovaným a referenčním vzorkem minimálně  $30 \times 10^9 l^{-1}$  plazmy. V případě že rozdíl transmitance obou vzorků klesne pod hodnotu odpovídající této koncentraci, výstup agregometru upozorní obsluhu na chybu.

Poté co je přidán do PRP agonista agregace a destičky začínají reagovat, nastávají odpovídající změny v transmitanci a jsou kontinuálně zaznamenávány připojeným počítačem. Jakmile destičky prodělají tvarovou změnu jako odpověď na podnět (agonistu, agregační látku), jejich větší rozměr způsobí snížení průchodu světla přes PRP a tím se sníží relativně k PPP aktuální transmitance. Jestliže je dávka látky dostačující k vyvolání vzájemného shlukování destiček a k vytvoření destičkových agregátů, zvýší se naopak průchodnost vzorku pro infračervené záření. Naměřené hodnoty transmitance se postupně blíží k úrovni odpovídající PPP (Jun, 2005).

#### **5.15. Testování rostlinných extraktů, jednotlivých výtřepků a frakcí na antiagregační aktivitu**

Dárci krve pro agregometrii byli nekuřáci, kteří neužívali 10 dní před odběrem žádnou látku ovlivňující funkce destiček. Odběr byl proveden do jednorázové sterilní stříkačky obsahující jako antikoagulační látku 3,8% citran sodný, který neovlivňuje agregační funkce destiček. Výsledný objemový poměr roztoku citrátu a krve byl 1 : 9. Krev byla do 30 min po odběru centrifugována (centrifuga U-32R, Boeco, Hamburg, Germany) 10 min při  $240 \times g$  za laboratorní teploty. Tím byla jako supernatant získána PRP. Po jejím oddělení byla krev dále centrifugována 15 min při  $600 \times g$  za chlazení na  $20 \text{ }^\circ\text{C}$  pro získání PPP.

Po změření počtu destiček v PRP (Oddělení klinické hematologie, 2. interní klinika, Fakultní nemocnice v Hradci Králové) byla následně nastavena koncentrace destiček v PRP s pomocí PPP jako dilučního média na hodnotu  $250 \times 10^9 l^{-1}$ .

Rostlinný extrakt byl před vlastním měřením znovu zhomogenizován skleněnou tyčinkou. Pro testování byl připraven roztok extraktu v DMSO nebo 0,1 M Tris-HCl pufru, pH 7,4 o koncentraci 25 mg ml<sup>-1</sup> PRP (vztaženo na sušinu).

Absorbance PRP byla vzata jako 0% úroveň agregace, absorbance PPP jako úroveň 100%. Do skleněné silikonizované kyvety bylo přeneseno 490 µl PRP. Kyveta byla vložena do temperovaného (37 °C) měřicího prostoru agregometru, obsah byl promícháván magnetickým míchadlem. Po 3 minutách bylo přidáno 10 µl pufrovaného roztoku extraktu (výsledná koncentrace v PRP byla 0,5 mg ml<sup>-1</sup>) nebo samotného pufru (kontrola). Po 5 minutách byl do kyvety přidán jeden z agonistů agregace (AA, výsledná koncentrace v kyvetě 0,5 mM, ADP, výsledná koncentrace byla 10 µM, COL výsledná konc. 2 µg ml<sup>-1</sup> nebo TR výsledná konc. 1 U ml<sup>-1</sup>). Tyto koncentrace byly zvoleny tak, aby u průměrného vzorku zdravé populace lidí vyvolaly v PRP agregaci trombocytů v rozsahu 70 – 99 %. Pokud by byl dárce postižen některou z poruch agregace destiček nebo by užil lék, který ji snižuje, projevil by se to při měření kontrolního vzorku.

Následný proces agregace byl sledován a vyhodnocován po dobu 5 minut s použitím software Aggro/Link (Jun, 2005).

#### **5.16. Statistické hodnocení agregace**

Statistická významnost rozdílů mezi naměřenými hodnotami agregace a kontrolou byla vyhodnocována párovým Studentovým t-testem v programu GraphPad Prism Version 3.02 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Jednotlivá měření byla opakována třikrát. Výše uvedený program byl použit i pro výpočet hodnot IC<sub>50</sub> u měřených látek (Jun, 2005).

#### **5.17. Měření antioxidační aktivity – DPPH test**

Metoda je založena na reakci stabilního fialově zbarveného radikálu DPPH (2,2'-difenyl-1-pikrylhydrazyl radikál) s antioxidantem. Tím dochází ke zhášení DPPH radikálu projevující se

blednutím DPPH a poklesem jeho absorbance měřené při  $\lambda = 525$  nm. Pokles absorbance je úměrný koncentraci antioxidantu ve vzorku. Tato metoda pracuje s programovatelným SIA (sekvenční injekční analýza) systémem. Měření aktivity látek bylo provedeno na počítačem řízeném přístroji FIALab 3000 (FIALab Instruments Inc., Bellevue, WA, USA) vybaveným 2,5ml pístovým čerpadlem, šesticestným přepínacím ventilem, USB2000-UV/VIS spektrofotometrem s LS-1 světelným zdrojem (Ocean Optics, USA) a SMA-Z průtokovou celou. Objem mísící cívky byl 0,6 ml, průměr 0,72 mm (Watrex, Praha, Česká Republika).

Základní roztoky izolovaných látek byly připraveny rozpuštěním 1 mg vzorku v ethanolu (50% v/v) tak, aby výsledná koncentrace byla  $1,0 \text{ mg ml}^{-1}$ . Rozpuštění proběhlo v ultrazvukové lázni při stupni 10 po dobu 10 min za laboratorní teploty. Základní roztoky byly dále naředěny ethanol (50% v/v) na koncentrace  $10 \mu\text{M}$ ,  $50 \mu\text{M}$ ,  $100 \mu\text{M}$ ,  $250 \mu\text{M}$ ,  $500 \mu\text{M}$  a  $750 \mu\text{M}$ . Jako nosný proud byl použit ethanol (50% v/v). Roztok DPPH byl připraven rozpuštěním 3,9 mg DPPH do 100 ml 50% (v/v) etanolu. Pro každou koncentraci vzorku bylo provedeno trojí měření.

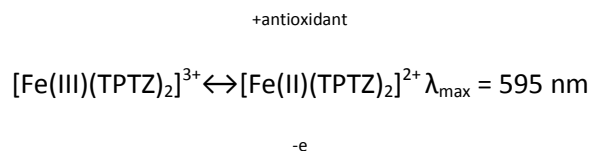
DPPH zhasací aktivita vzorků byla popsána zhasacím indexem (%Q) definovaným jako relativní pokles absorbance DPPH roztoku vyvolaný přidáním antioxidantu:

$$Q = \frac{(1 - A_x)}{A_0} \times 100$$

kde  $A_0$  je absorbance samotného DPPH roztoku bez vzorku a  $A_x$  je absorbance DPPH roztoku po přidání a promíchání se vzorkem. U každého vzorku byla změřena a vypočítána hodnota  $Q$  pro uvedenou koncentraci a sestrojena křivka závislosti  $Q$  na koncentraci vzorku. Výsledná hodnota  $Q$  pro danou koncentraci byla vypočtena jako průměr ze tří provedených měření. Pro výpočet hodnot  $EC_{50}$  byl použit program GraphPad Prism Version 3,02 for Windows (GraphPad Software, San Diego, USA) (Kolečkář, Opletal et al, 2008).

### 5.18. Měření antioxidační aktivity – FRAP test

FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) test je spektrofotometrická metoda založená na schopnosti antioxidantů redukovat  $\text{Fe}^{3+}$  na  $\text{Fe}^{2+}$ . Železnaté ionty tvoří s tri(2-pyridyl)-s-triazinem (TPTZ) modře zbarvený komplex, který je spektrofotometricky detekován při 595 nm.



Měření bylo provedeno na mikrotitračních destičkách s 96 jamkami Brand 400  $\mu\text{l}$  (Fisher Scientific, Pardubice) přístrojem Anthos 2010 (Eugendorf, Rakousko). Pro přípravu FRAP roztoku bylo použito 10 ml acetátového pufru (300 mM, pH 3.6), 1 ml hexahydrátu chloridu železnatého (20 mM) rozpuštěného ve vodě a 1 ml TPTZ (10 mM) rozpuštěného v roztoku chlorovodíku (40 mM). Na mikrotitrační destičky bylo čtyřnásobně pipetováno 25  $\mu\text{l}$  izolované látky (nebo heptahydrátu síranu železnatého) rozpuštěné v methanolu nebo DMSO v koncentračním rozmezí 10 – 200  $\mu\text{M}$ . Do třech jamek byl přidán FRAP roztok (175  $\mu\text{l}$ ) zahřátý na teplotu 37  $^\circ\text{C}$  a do čtvrté jamky acetátový pufr. Do dalších tří jamek bylo pipetováno 25  $\mu\text{l}$  acetátového pufru se 175  $\mu\text{l}$  FRAP roztoku. Absorbance byla monitorována v časových intervalech od 4 do 120 minut. Redukční schopnost testovaných látek v čase  $t$  byla popsána FRAP hodnotou (FRAP hodnota  $t$ ) vypočtenou podle vzorce:

$$\text{FRAP}_{\text{hodnota } t} (\text{M}) = \left( \frac{a_t \text{ test.látka}}{a_t \text{ Fe}^{2+}} \right) \times 10^{-5}$$

kde  $a_t \text{ test.látka}$  je změna absorbance vztažená k testovanému vzorku v čase  $t$  (4. nebo 60. minuta) o výsledné koncentraci 10  $\mu\text{l}$  a  $a_t \text{ Fe}^{2+}$  je změna absorbance vztažená k heptahydrátu síranu železnatého ve stejném čase a stejné koncentraci. Všechna měření byla třikrát opakována. Výpočty byly provedeny v programu SigmaPlot 2002 Verze 8.0 pro Windows (Řeháková, 2009).

## 6. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 6.1. Výsledky antiagregačního screeningu rostlin čeledi Asteraceae

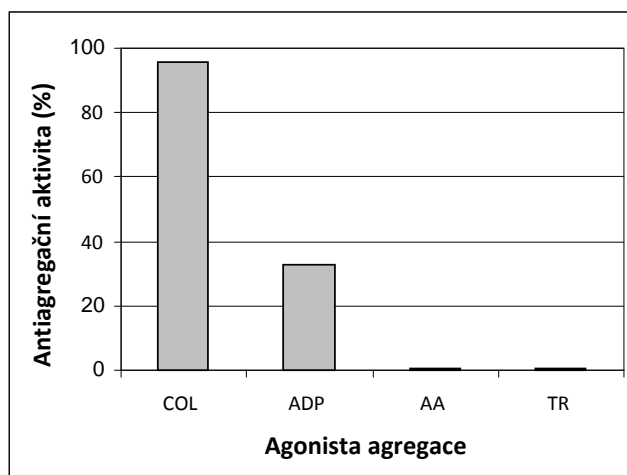
Tab. 2 Antiagregační aktivita testovaných rostlinných extraktů

Název taxonu	Část rostliny	Snížení agregace vyvolané agonistou*			
		AA	ADP	COL	TR
<i>Achillea millefolium</i>	květenství	-	-	-	-
<i>Antennaria dioica</i>	kvetoucí nať	-	-	-	-
<i>Artemisia dracunculus</i>	nať bez květů	-	-	-	-
<i>Artemisia pontica</i>	nať bez květů	-	-	-	-
<i>Bidens tripartita</i>	kvetoucí nať	-	-	-	-
<i>Calendula officinalis</i>	nať bez květů	-	-	-	-
<i>Centaurea jacea</i>	kvetoucí nať	-	-	-	-
<i>Cimicifuga racemosa</i>	kořen	-	-	-	-
<i>Cirsium arvense</i>	kvetoucí nať	-	-	-	-
<i>Cota tinctoria</i>	kvetoucí nať	-	-	-	-
<i>Echinacea purpurea</i>	listy	-	-	-	-
<i>Echinops sphaerocephalus</i>	kvetoucí nať	-	-	-	-
<i>Erigeron canadensis</i>	kvetoucí nať	-	-	-	-
<i>Eupatorium cannabinum</i>	kvetoucí nať	-	-	-	-
<i>Galinsoga parviflora</i>	kvetoucí nať	-	-	-	-
<i>Helianthus annuus</i>	listy	-	-	-	-
<i>Helianthus annuus</i>	květenství	-	-	-	-

\* Pro toto měření byla použita koncentrace suchých extraktů 0,5 mg ml<sup>-1</sup>

Tab. 2 pokračování

Název taxonu	Část rostliny	Snížení agregace vyvolané agonistou*			
		AA	ADP	COL	TR
<i>Hieracium laevigatum</i>	kvetoucí nať	-	-	-	-
<i>Chrysanthemum leucanthemum</i>	kvetoucí nať	-	-	-	-
<i>Inula oculis-christi</i>	kvetoucí nať	-	-	-	-
<i>Inula racemosa</i>	listy	-	-	-	-
<i>Leontodon lapidus</i>	kvetoucí nať	-	-	-	-
<i>Leuzea carthamoides</i>	listy	-	33 ± 6 %	95 ± 5 %	-
<i>Matricaria discoidea</i>	květenství	-	-	-	-
<i>Pyrethrum corymbosum</i>	kvetoucí nať	-	-	-	-
<i>Scorzonera hispanica</i>	kvetoucí nať	-	-	-	-
<i>Senecio fuchsii</i>	kvetoucí nať	-	-	-	-
<i>Senecio vulgaris</i>	kvetoucí nať	-	-	-	-
<i>Solidago virgaurea</i>	kvetoucí nať	-	-	-	-
<i>Sonchus asperus</i>	kvetoucí nať	-	-	-	-
<i>Sonchus oleraceus</i>	kvetoucí nať	-	-	-	-
<i>Taraxacum officinale</i>	květenství	-	-	-	-
<i>Taraxacum officinalis</i>	listy	-	-	-	-
<i>Tragopogon pratensis</i>	nať bez květů	-	-	-	-



Obr. 7 Antiagregační aktivita sumárního extraktu *L. carthamoides*

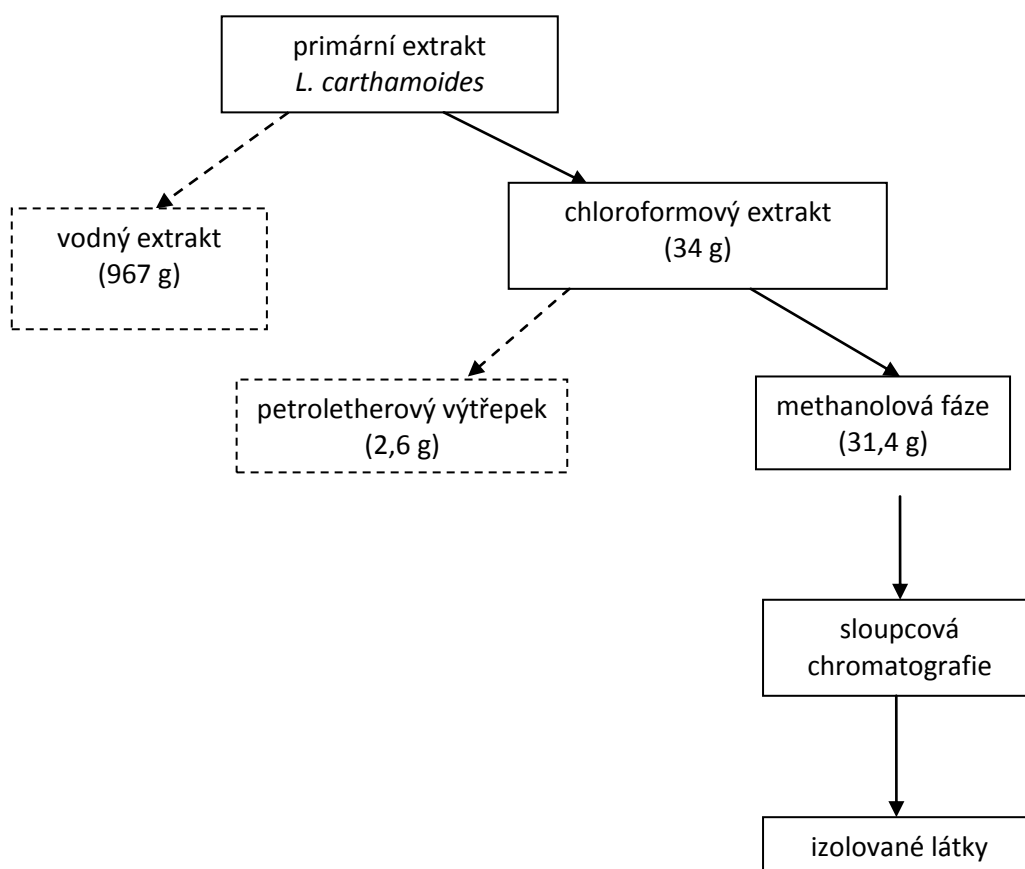
Z testovaných taxonů vyvolal pouze jeden signifikantní snížení agregace trombocytů. Žádná z testovaných rostlin nevykázala proagregační působení, pozorovatelné během inkubace destiček s extraktem do doby před přidáním agonisty agregace. *Leuzea carthamoides* (listy) snížila agregaci navozenou ADP o  $33 \pm 6 \%$  a COL o  $95 \pm 5 \%$ . Protože parcha v experimentu prokázala inhibiční působení na agregaci trombocytů, byla zvolena pro další izolaci antiagregačně účinných látek.

## 6.2. Extrakce listů parchy saflorové

Listy parchy saflorové byly získány od fy Šimáková (Ohnišov, Česká Republika, sběr červen 2002). 10,5 kg suchých rozdrobněných listů bylo vloženo do perkolátoru, zalito 95% ethanolem a po 24 hodinách perkolováno za stálého doplňování ethanolu tak, aby za 2 – 2,5 hod. vyteklo 5 litrů extraktu. 105 l získaného extraktu bylo odpařeno na 4,5 l při teplotě 50 °C na vakuové odparce Laborota 20 Control, Heidolph Německo. K tomuto sytě zelenému viskóznímu extraktu (s velkým obsahem chlorofylu) bylo přidáno stejné množství (4,5 l) horké destilované vody. Extrakt byl zahřán na 80 °C a promíchán. Po zchlazení na 50 °C byl zfiltrován přes vrstvu buničité vaty tak, aby chlorofyl zůstal v nádobě. Chlorofyl v nádobě byl smíchán s 80 °C horkou destilační vodou, promíchán a extrakt přefiltrován.



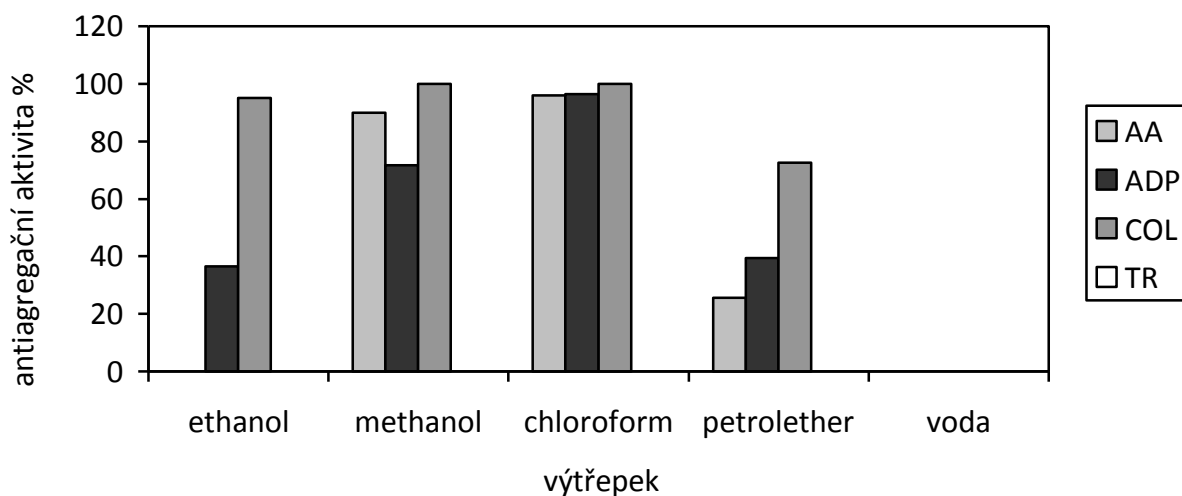
Oba světle hnědé, zakalené filtráty byly spojeny (primární extrakt tvořil celkem 9 l). Primární extrakt byl vytřepán 6 × 2,5 litry chloroformu. Hmotnost odpařeného vodného zbytku byla 9,67 kg, hmotnost chloroformového odparu byla 34 gramů. Chloroformový odparek byl rozpuštěn v 600 ml 80% methanolu (v/v) a vzniklý roztok byl vytřepán 7 × 120 ml petroletheru. Tento nepolární výtřepek (tmavě zelený, velmi viskózní o hmotnosti 2,6 g) byl odstraněn. Methanolvý výtřepek byl odpařen a vysušen za vzniku 31,4 g hnědozeleného odparu.



Obr. 8 Základní postup extrakce a izolace látek z listů *L. carthamoides*

Antiagregační aktivita jednotlivých výtřepků a frakcí byla testována stejným postupem jako u sumárních rostlinných extraktů. Použitá koncentrace frakce pro měření byla 0,25 mg ml<sup>-1</sup> PRP. Jako rozpouštědlo byl zvolen DMSO, ve kterém byly při uvedené koncentraci všechny výtřepky i frakce

rozpuštěné. Výsledný obsah DMSO v květetě byl 5 % (v/v). Pro další zpracování byly vždy vybírány frakce s nejsilnějším antiagregačním účinkem.



Obr. 8 Antiagregační aktivita výtřepků *Leuzea carthamoides* L.

### 6.3. Sloupcová chromatografie přečištěného $\text{CHCl}_3$ výtřepku

Pro sloupcovou chromatografii byl odparek rozpuštěn v dichlormethanu. Roztok byl smísen s 65 g adsorbentu, směs byla vysušena v proudu teplého vzduchu (ca 50 °C) a dosušena ve vakuovém exsikátoru (24 hodin).

Odparek: 31,4 g

Adsorbent: Silikagel L 0,1–0,2 mm, deaktivovaný 10 % vody, 950 g

Dělicí lože: 6 × 76 cm

Vrstva s extraktem: 6 × 5,5 cm

Frakce: 200 ml

Doba toku frakce: 15 – 20 min.

Kontrolní TLC: z každé frakce bylo po důkladném promíchání odebráno 0,25 – 0,50 ml do mikrozkušavky, na vodní lázni bylo při 50 °C v proudu vzduchu odpařeno

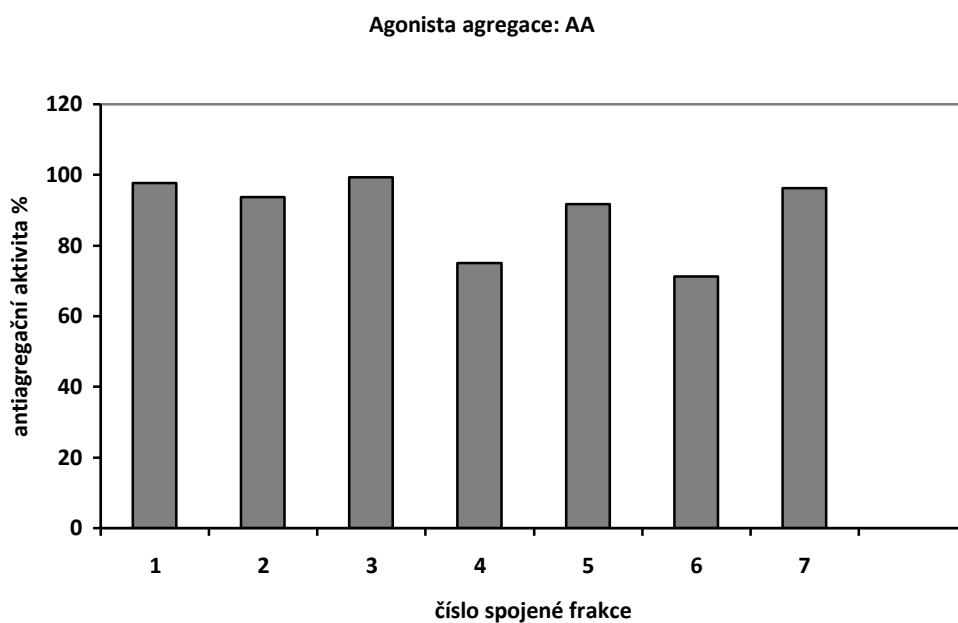
rozpouštědlo, odparek byl rozpuštěn v 1–2 kapkách chloroformu a po zředění 1–2 kapkami ethanolu nanesen na desku TLC:

Kieselgel 60 F<sub>254</sub>, 50x75 mm, vyvíjecí soustava Et<sub>2</sub>O, vyvíjeno jednou, detekce UV λ = 254 a 366 nm, vanilin-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Na základě provedené TLC byly shodné frakce spojeny.

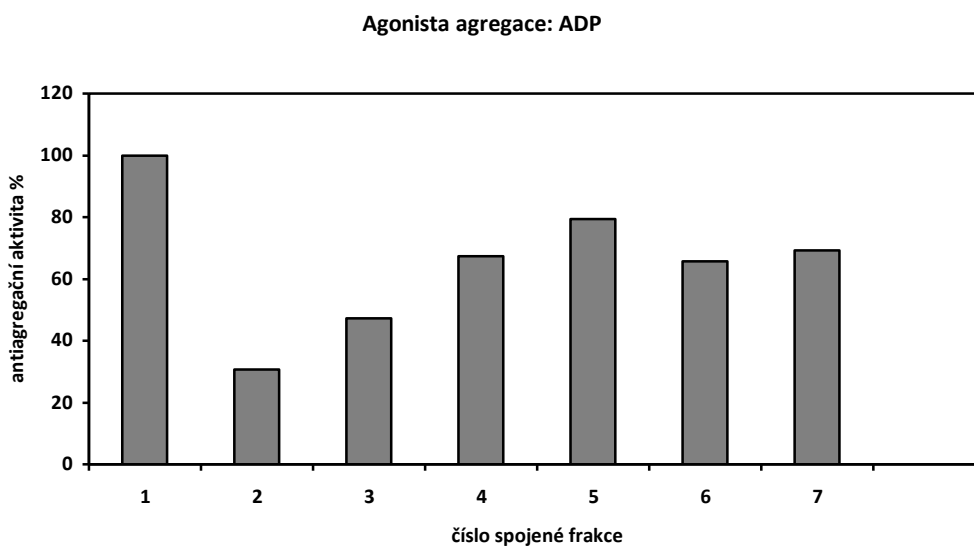
Tab. 3 Výsledky sloupcové chromatografie předčištěného chloroformového výtřepku

Spojené frakce	Frakce	Eluční soustava	Hmotnost odparku (g)	Popis odparku
1 (15–47)	15–20	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> + benzin 3 : 1	0,9814	viskózní, zelenohnědý
	21–29	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>		
	30–31	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>		
	32–36	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> + EtOAc 99 : 1		
	37–40	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> + EtOAc 98 : 2		
	41–47	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> + EtOAc 95 : 5		
2 (48–60)	48–53	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> + EtOAc 95 : 5	0,5671	viskózní, žlutohnědý, s krystaly
	54–60	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> + EtOAc 90 : 10		
3 (61–71)	61–63	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> + EtOAc 90 : 10	0,1079	velmi viskózní, světle hnědý, s náznakem krystalů
	64–71	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> + EtOAc 85 : 15		
4 (72–73)	72–73	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> + EtOAc 85 : 15	0,3318	světle hnědý s velmi drobnými krystaly
5 (74–88)	74–82	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> + EtOAc 85 : 15	7,7011	velmi viskózní, světle hnědý
	83–88	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> + EtOAc 80 : 20		
6 (89–114)	89–97	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> + EtOAc 80 : 20	6,9151	viskózní, zelenohnědý
	98–114	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> + EtOAc 60 : 40		
7 (115–132)	115–118	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> + EtOAc 60 : 40	2,0233	viskózní, zelenohnědý
	118–132	EtOAc		

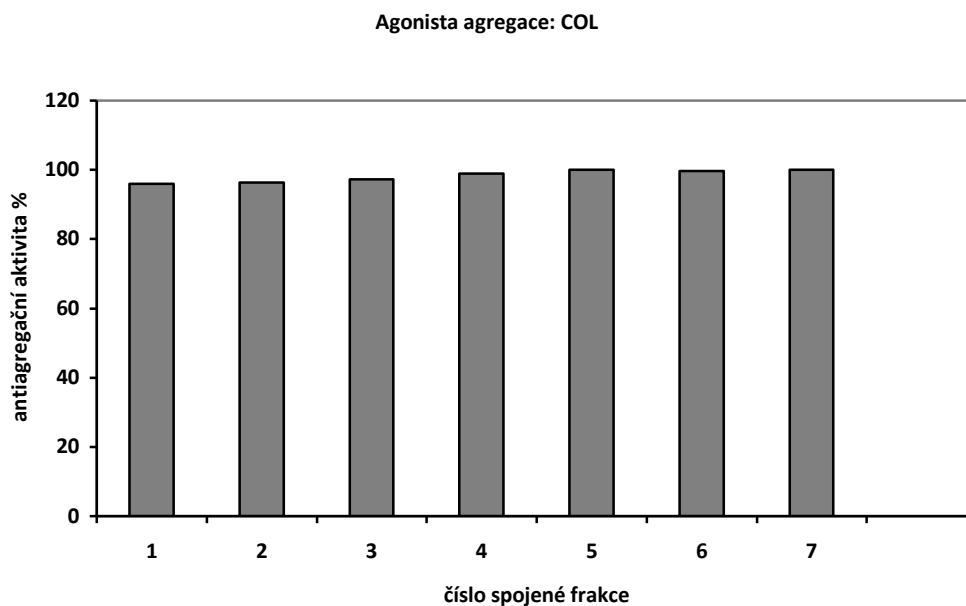
Tímto způsobem bylo získáno 8 spojených frakcí, které byly testovány na antiagregační aktivitu v koncentraci  $250 \mu\text{g ml}^{-1}$  PRP za účelem zjištění neaktivnějšího podílu ze sloupcové chromatografie. V následujících obrázcích (Obr. 9 – 11) je shrnuta antiagregační aktivita spojených frakcí.



Obr. 9 Antiagregační aktivita spojených frakcí 1–7 (AA)



Obr. 10 Antiagregační aktivita spojených frakcí 1–7 (ADP)



Obr. 11 Antiagregační aktivita spojených frakcí 1–7 (COL)

Z uvedených obrázků vyplývá, že všechny frakce byly z hlediska antiagregačního efektu vysoce aktivní u agregace indukované COL a AA. U agregace indukované ADP byly neaktivnější spojené frakce 1 a 5. Žádná z testovaných frakcí neovlivnila agregaci navozenou TR. Jelikož všechny frakce prokázaly poměrně vysokou aktivitu, byly podrobeny další separaci.

#### 6.4. Sloupcová chromatografie spojené frakce 5

Pro sloupcovou chromatografii byl odparek rozpuštěn v chloroformu. Roztok byl smísen s 15 g adsorbentu, směs vysušena v proudu teplého vzduchu (ca 50 °C) a dosušena ve vakuovém exsikátoru (24 hodin).

Odparek: 7,7 g

Adsorbent: silikagel L 0,1–0,2 mm, dezaktivovaný 10 % vody, 370 g

Dělicí lože: 2,4 × 79 cm

Vrstva s extraktem: 2,4 × 3,65 cm

Frakce: 50 ml

Doba toku frakce: 25 – 30 min.

Kontrolní TLC: z každé frakce bylo po důkladném promíchání odebráno 0,25 – 0,50 ml do mikrozskumavky, na vodní lázni bylo při 50 °C v proudu vzduchu odpařeno rozpouštědlo, odparek rozpuštěn v 1 – 2 kapkách chloroformu a po zředění 1 – 2 kapkami ethanolu nanesen na desku TLC:

Kieselgel 60 F<sub>254</sub>, 50 × 75 mm, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>CH<sub>3</sub> + EtOAc 3 : 2, vyvíjeno jednou, detekce UV λ = 254 a 366 nm, vanilin-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Na základě provedené TLC byly shodné frakce spojeny.

Tab. 4 Výsledky sloupcové chromatografie spojené fr. 5

Spoj. fr.	Frakce	Eluční soustava	Hmotnost odparku (g)	Popis odparku
5–1	26–37	CHCl <sub>3</sub>	0,0188	světle hnědý, velmi viskózní
	38–68	CHCl <sub>3</sub> + EtOAc 99 : 1		
5–2	69–75	CHCl <sub>3</sub> + EtOAc 98 : 2	0,1079	světle hnědý s krystaly
	76–81	CHCl <sub>3</sub> + EtOAc 98 : 2		
5–3	82–85	CHCl <sub>3</sub> + EtOAc 98 : 2	0,0751	světle hnědý, velmi viskózní
5–4	86–105	CHCl <sub>3</sub> + EtOAc 98 : 2	4,0264	světle žlutý, řídké viskózní
5–5	106–151	CHCl <sub>3</sub> + EtOAc 98 : 2	3,3464	světle žlutý, velmi viskózní

Pro další zpracování byla vybrána subfrakce 5–2.

### 6.5. Separace frakce 6

Frakce č. 6 byla podrobena preparativní HPLC. Bylo získáno 0,1916 g LC-1 a 0,1546 g LC-2.

### 6.6. Sloupcová chromatografie spojené frakce 7

Pro sloupcovou chromatografii byl odparek rozpuštěn v minimálním objemu chloroformu tak, aby byla frakce zředěna do řídké konzistence. Roztok byl smísen s 5 g adsorbentu, směs byla vysušena v proudu teplého vzduchu (ca 50 °C) a dosušena ve vakuovém exsikátoru (24 hodin).

Odparek: 2,0233 g

Adsorbent: silikagel L 0,1–0,2 mm, deaktivovaný 10 % vody, 430 g

Dělicí lože: 2,65 × 75 cm

Vrstva s extraktem: 2,65 × 5,6 cm

Frakce: 50 ml

Doba toku frakce: 25 – 30 min.

Kontrolní TLC: z každé frakce bylo po důkladném promíchání odebráno 0,25 – 0,50 ml do mikrozkuřavky, na vodní lázni bylo při 50 °C v proudu vzduchu odpařeno rozpouštědlo, odparek byl rozpuštěn v 1 – 2 kapkách chloroformu a po zředění 1 – 2 kapkami ethanolu nanesen na desku TLC:

Kieselgel 60 F<sub>254</sub>, 50 × 75 mm, vyvíjecí soustava: Et<sub>2</sub>O, vyvíjeno jednou, detekce UV λ = 254 a 366 nm, vanilin-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Na základě provedené TLC byly shodné frakce spojeny.

Tab. 5 Výsledky sloupcové chromatografie spojené fr. 7

Spoj. fr.	Frakce	Eluční soustava	Hmotnost odparku (g)	Popis odparku
7-1	1-10	CHCl <sub>3</sub> + EtOAc 9 : 1	0,114	viskózní, tmavěhnědý
7-2	11-15	CHCl <sub>3</sub> + EtOAc 9 : 1	0,1129	viskózní, zelenohnědý
7-3	16-21	CHCl <sub>3</sub> + EtOAc 9 : 1	0,1726	viskózní, zelenohnědý
7-4	21-42	CHCl <sub>3</sub> + EtOAc 9 : 1	1,452	viskózní, hnědý
	43-51	CHCl <sub>3</sub> + EtOAc 8 : 2		
	52-55	CHCl <sub>3</sub> + EtOAc 1 : 1		

Na základě orientační TLC byla podrobena další izolaci pouze subfrakce č. 7-4, protože ostatní subfrakce obsahovaly především látku LC-1 (již izolovanou z předchozí frakce č. 6) a z kvantitativního hlediska byly zastoupeny v malém množství.

### 6.7. Analýza subfrakce 7–4

Subfrakce č. 7–4 byla podstoupena preparativní HPLC. Bylo získáno 0,4639 g LC-3.

### 6.8. Čištění látek LC-1, LC-2, LC-3

Získané látky LC-1, LC-2, LC-3 byly přečištěny pomocí HPLC za podmínek uvedených v kap. 5.10. Přečištěním bylo získáno 0,0335 g LC-1, 0,0713 g LC-2 a 0,2051 g LC-3 čistých bezbarvých viskózních látek sklovitého vzhledu.

### 6.9. Separace a čištění krystalů z frakcí 2, 4 a 5

Separace krystalického podílu z frakce č. 2 byla provedena zředěním odparku směsí  $\text{CHCl}_3$  + EtOH 1 : 1, odsátím krystalické podílů na fritě, krátkým promytím výše uvedenou směsí a následnou rekrystalizací ze směsi  $\text{CHCl}_3$ –EtOH. Po odsátí a vysušení bylo získáno 0,0231 g žluté krystalické látky LC-4 s teplotou tání 224 – 227°C.

Na základě TLC byla zjištěna totožnost látek z krystalických podílů vyloučených ze zahuštěných odparků frakcí č. 4 a č. 5–2. Obě frakce byly směsí dvou látek, po spojení byl sumární odparek dělen pomocí TLC na deskách Silufol. Nanáška činila na 1 cm desky 0,5 mg látky rozpuštěné ve směsi EtOH +  $\text{CHCl}_3$  1 : 1. Každý chromatogram byl vyvíjen v chromatografické komoře jedenkrát. Poté byl absorbent s jednotlivými látkami z desek separován a eluován v chromatografických kolonkách 100 ml směsí EtOH +  $\text{CHCl}_3$  1 : 1 a eluáty odpařeny. Látka LC-5 byla dvakrát rekrystalována ze směsi EtOH– $\text{CHCl}_3$ . Po odsátí a vysušení bylo získáno 0,0378 g nažloutlé krystalické látky LC-5 s teplotou tání 285 – 290 °C. Druhou látku se nepodařilo získat, protože jí bylo vizuálně malé množství a během celého procesu čištění se rozkládala (intenzívně hnědla, její strukturu se nepodařilo určit).



## 7. VÝSLEDKY

### 7.1. Analýza izolovaných látek

Tab. 6 Látky izolované ze suchých listů parchy saflorové

Označení	Název	Frakce	Vzhled a původ	Hmotnost (g)	Zastoupení v listech (%)*
LC-1	cynaropikrin	6	bezbarvá sklovitá	0,0335	$3,4 \times 10^{-5}$
LC-2	chlorojanerin	6	bezbarvá sklovitá	0,0713	$7,3 \times 10^{-5}$
LC-3	repdiolid	7	bezbarvá sklovitá	0,2051	$2,1 \times 10^{-4}$
LC-4	jaceosidin	2	světle žlutá jemně krystalická	0,0231	$2,4 \times 10^{-5}$
LC-5	hispidulin	4, 5	světle žlutá, jemně krystalická	0,0378	$3,9 \times 10^{-5}$

\* přepočteno na sušinu listů, která byla  $92,5 \pm 0,16$  %

## **LC-1**

MS:

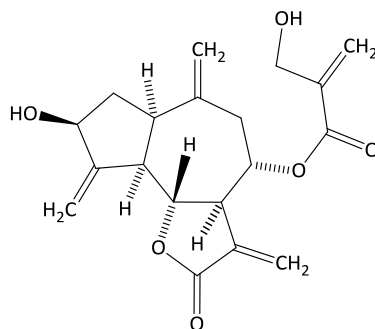
API-ES-MS:  $m/z$  347  $[M + H]^+$

NMR:

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO)  $\delta$  6.17 (1H, bs,  $\text{CH}_2$ , H3'), 6.02–5.97 (1H, m,  $\text{CH}_2$ , H13), 5.90 (1H, bs,  $\text{CH}_2$ , H3'), 5.52–5.47 (1H, m,  $\text{CH}_2$ , H13), 5.30–5.00 (6H, m, CH, H8,  $\text{CH}_2$ , H14, H15, 2 $\times$  OH), 4.82 (1H, bs,  $\text{CH}_2$ , H14), 4.46–4.27 (2H, m, CH, H3, H6), 4.16 (2H, bs,  $\text{CH}_2$ , H4'), 3.27–3.12 (1H, m, CH, H7), 3.00–2.76 (2H, m, CH, H1, H5), 2.70–2.57 (1H, m,  $\text{CH}_2$ , H9), 2.31–2.18 (1H, m,  $\text{CH}_2$ , H9), 1.97–1.82 (1H, m,  $\text{CH}_2$ , H2), 1.73–1.52 (1H, m,  $\text{CH}_2$ , H2) (příl. 1).

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO)  $\delta$  169.1, 165.1, 153.9, 143.2, 141.1, 138.6, 124.4, 121.0, 117.2, 110.6, 79.4, 78.4, 73.9, 72.2, 59.8, 49.8, 46.5, 44.2, 36.5 (příl. 2)

Na základě porovnání MS a NMR analýzy s údaji z literatury (Sang Zin Choi, 2005) bylo zjištěno, že izolovaná látka LC-1 je seskviterpenový lakton **cynaropikrin**.



8-(2-hydroxymethylpropenoyl)-3,8-dihydroxy-4(15),10(14),11(13)-guajatrien-12,6-olid

(1 $\alpha$ , 3 $\beta$ , 5 $\alpha$ , 6 $\alpha$ , 8 $\alpha$ )

## LC-2

MS:

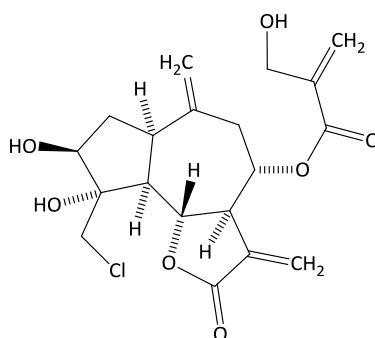
API-ES-MS:  $m/z$  399  $[M + H]^+$

NMR:

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  6.34 (1H, bs,  $\text{CH}_2$ , H3'), 6.21 (1H, d,  $J=3.2$  Hz,  $\text{CH}_2$ , H13), 5.96 (1H, bs,  $\text{CH}_2$ , H3'), 5.62 (1H, d,  $J=3.2$  Hz,  $\text{CH}_2$ , H13), 5.21–5.12 (2H, m, CH, H8,  $\text{CH}_2$ , H14), 4.83 (1H, bs,  $\text{CH}_2$ , H14), 4.74 (1H, dd,  $J=11.0$  Hz,  $J=9.1$  Hz, CH, H6), 4.39 (2H, bs,  $\text{OCH}_2$ , H4'), 4.34 (1H, d,  $J=11.8$  Hz,  $\text{CH}_2$ , H15), 4.18 (1H, d,  $J=5.8$  Hz, CH, H3), 3.96 (1H, d,  $J=11.8$  Hz,  $\text{CH}_2$ , H15), 3.68–3.55 (1H, m, CH, H1), 3.23–3.11 (1H, m, CH, H7), 2.67 (1H, dd,  $J=14.8$  Hz,  $J=4.9$  Hz,  $\text{CH}_2$ , H9), 2.60–2.40 (2H, m,  $\text{CH}_2$ , H2, H9), 2.38–2.28 (1H, m, CH, H5), 1.60 (1H, dd,  $J=14.6$  Hz,  $J=8.0$  Hz,  $\text{CH}_2$ , H2) (příl. 3).

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  168.6, 165.3, 142.1, 139.2, 136.7, 126.8, 122.8, 118.0, 84.5, 77.3, 76.2, 74.1, 62.4, 57.5, 49.9, 47.1, 46.4, 37.7, 35.1 (příl. 4).

Na základě porovnání MS a NMR analýzy s údaji z literatury (Khan Sher Bahadar, 2005; Buděšínský 1994) bylo zjištěno, že izolovaná látka LC-2 je seskviterpenový lakton **chlorojanerin**.



8-(2-hydroxymethylpropenoyl)-15-chloro-3,4,8-trihydroxy-10(14),11(13)-guajadien-12,6-olid

(1 $\alpha$ , 3 $\beta$ , 4 $\alpha$ , 5 $\alpha$ , 6 $\alpha$ , 8 $\alpha$ )

### LC-3

MS:

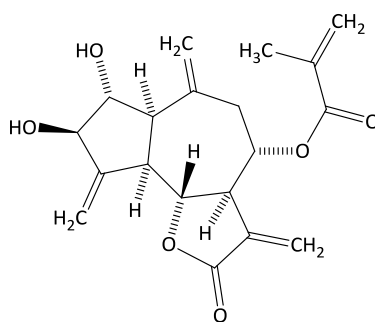
API-ES-MS:  $m/z$  347  $[M + H]^+$

NMR:

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  6.23 (1H, d,  $J=3.2$  Hz,  $\text{CH}_2$ , H3'), 6.21–6.18 (1H, m,  $\text{CH}_2$ , H13), 5.72–5.66 (2H, m,  $\text{CH}_2$ , H13, H3'), 5.61 (1H, d,  $J=2.8$  Hz,  $\text{CH}_2$ , H15), 5.43 (1H, d,  $J=2.8$  Hz,  $\text{CH}_2$ , H15), 5.22 (1H, d,  $J=2.5$  Hz,  $\text{CH}_2$ , H14), 5.12 (1H, dd,  $J=9.9$  Hz,  $J=2.5$  Hz,  $\text{CH}_2$ , H14), 5.02 (1H, bs, CH, H8), 4.35–4.27 (1H, m, CH, H3), 4.25–4.14 (1H, m, CH, H6), 3.78 (1H, dd,  $J=10.4$  Hz,  $J=8.2$  Hz, CH, H2), 3.28–3.15 (1H, m, CH, H7), 3.09–2.96 (1H, m, CH, H1), 2.81 (1H, t,  $J=10.3$  Hz, CH, H5), 2.50 (2H, d,  $J=3.6$  Hz,  $\text{CH}_2$ , H9), 1.99 (3H, bs,  $\text{CH}_3$ , H4') (příl. 5).

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  168.9, 166.4, 147.1, 139.2, 136.9, 135.9, 126.8, 122.8, 120.7, 114.0, 79.1, 78.9, 77.8, 73.4, 51.5, 47.7, 46.4, 35.8, 18.4 (příl. 6).

Na základě porovnání MS a NMR analýzy s údaji z literatury (Singh, 1988; Buděšínský, 1994) bylo zjištěno, že izolovaná látka LC-3 je seskviterpenový lakton **repdolid**.



8-(2-methylpropenoyl)-2,3,8-trihydroxy-4(15),10(14),11(16)-gujatrien-12,6-olid

(1 $\alpha$ , 2 $\beta$ , 3 $\alpha$ , 5 $\alpha$ , 6 $\alpha$ , 8 $\alpha$ )

#### LC-4

MS:

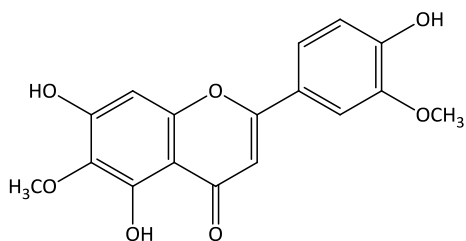
API-ES-MS:  $m/z$  331  $[M + H]^+$

NMR:

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO)  $\delta$  13.08 (1H, bs, OH), 10.69 (1H, bs, OH), 9.97 (1H, bs, OH), 7.58–7.53 (2H, m, H2', H6'), 6.92 (1H, d, overlapped,  $J=9.9$  Hz, H5'), 6.90 (1H, s, H3), 6.61 (1H, s, H8), 3.88 (3H, s, OCH<sub>3</sub>), 3.74 (3H, s, OCH<sub>3</sub>) (příl. 7).

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO)  $\delta$  182.4, 163.9, 157.4, 153.0, 152.6, 150.9, 148.2, 131.5, 121.7, 120.5, 115.9, 110.4, 104.3, 102.9, 94.5, 60.2, 56.1 (příl. 8).

Na základě porovnání NMR a MS analýzy s údaji z literatury (Agrawal 1989; Tan 1990) bylo zjištěno, že izolovaná látka LC-4 je flavonoid **jaceosidin**.



4',5,7-trihydroxy-3',6-dimethoxyflavon

## **LC-5**

MS:

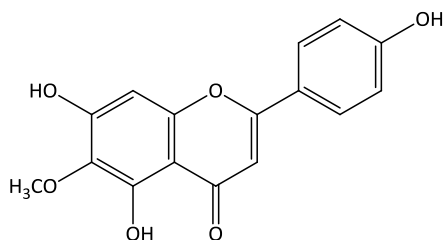
API-ES-MS:  $m/z$  301[M + H]<sup>+</sup>

NMR:

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO)  $\delta$  13.07 (1H, bs, OH), 10.67 (1H, bs, OH), 10.37 (1H, bs, OH), 7.97–7.87 (2H, m, AA', BB', H2', H6'), 6.96–6.86 (2H, m, AA', BB', H3', H5'), 6.78 (1H, s, H3), 6.58 (1H, s, H8), 3.74 (3H, s, OCH<sub>3</sub>) (příl. 9).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO)  $\delta$  182.3, 164.0, 161.4, 157.5, 153.0, 152.6, 131.5, 128.7, 121.4, 116.2, 104.3, 102.6, 94.4, 60.2 (příl. 10).

Na základě porovnání NMR a MS analýzy s údaji z literatury (Agrawal 1989; Tan 1990) bylo zjištěno, že izolovaná látka LC-5 je flavonoid **hispidulin**.



4',5,7-trihydroxy-6-methoxyflavon

## 7.2. Antiagregační aktivita izolovaných látek

Tab. 7 Antiagregační aktivita izolovaných látek

Látka	Antiagregační aktivity (IC <sub>50</sub> , μM)			
	ADP	COL	AA	TR
LC-1 cynaropikrin	336 ± 17	300 ± 33	1050 ± 34	> 1300
LC-2 chlorojanerin	>1300	552 ± 19	> 1300	> 1300
LC-3 repdiolid	630 ± 12	1050 ± 25	490 ± 30	> 1300
LC-4 jaceosidin	1190 ± 31	382 ± 13	136 ± 16	> 1300
LC-5 hispidulin	1060 ± 54	100 ± 24	522 ± 13	> 1300
ASA	-	84,8 ± 11	16,1 ± 1,2	-
dipyridamol	122,5 ± 13	-	-	-

## 7.3. Výsledky antioxidačního DPPH testu

Tab. 8 Antioxidační aktivita izolovaných látek (DPPH test)

Látka	EC <sub>50</sub> (μM)
LC-1 cynaropikrin	> 1000
LC-2 chlorojanerin	> 1000
LC-3 repdiolid	259 ± 14,2
LC-4 jaceosidin	411 ± 17,8
LC-5 hispidulin	769,6 ± 25,7
trolox	27,8 ± 1,7
kvercetin	25,3 ± 1,6

## 7.4. Výsledky antioxidačního FRAP testu

Tab. 9 Antioxidační aktivita izolovaných látek (FRAP test)

Látka	FRAP hodnota 4min (μM)	FRAP hodnota 60 min (μM)
LC-1 cynaropikrin	~ 0	~ 0
LC-2 chlorojanerin	~ 0	~ 0
LC-3 repdiolid	~ 0	~ 0
LC-4 jaceosidin	14,5	39,2
LC-5 hispidulin	1,2	2,6
trolox	21,5	22,2
kvercetin	66,9	98,3

## 8. DISKUSE

Parcha saflorová – *Leuzea carthamoides* DC., Asteraceae (syn. *Rhaponticum carthamoides* (Willd.) Iljin), původní taxon z jižní Sibiře je rostlinou, o níž existuje v literatuře prakticky od poloviny minulého století 293 relevantních publikačních údajů (review, originální práce, patenty); nejvyšší dekádový nárůst publikací je od r. 2001 (114 prací). Tato rostlina byla v 60. letech minulého století označována za adaptogen nejen pro humánní potřebu, ale i pro živočišnou výrobu (Opletal, 1990). Problém zásahu do obecného adaptačního syndromu (hlavní účinnou látkou bývaly uváděny ekdysteroidy) je záležitostí složitou, experimentální modely jsou náročně a sledovat adaptogenní vliv sumárních blíže nedefinovaných extraktů je problémové, a proto byl vůči této rostlině evropský lékařský terén poměrně rezervovaný. Dalším z důvodů byla patrně skutečnost, že většina těchto prací pocházela z bývalého SSSR a zájem o rostlinu proto nijak neupevnily. Postupem doby se však do studia rostliny začaly zapojovat i jiné pracovní týmy a pokládat studium obsahových látek za nosné, což se odrazilo na publikační aktivitě v současnosti.

Dosud existují tři rozsáhlé studie, které rozebírají zevrubně obsahové látky rostliny a jejich biologickou aktivitu (Opletal; 1990; Huang, 2008; Kokoška 2009). Za hlavní obsahové látky jsou v těchto přehledových studiích pokládány ekdysteroidy, flavonoidy, guajanolidy, triterpenové glykosidy, polysacharidy, fenolické kyseliny, lignany a polyiny. Biologické účinky sumárních extraktů z kořenů nebo nati jsou pojaty poměrně široce: adaptogenní, antitumorové, imunostimulační, antihyperlipidemické, antihypercholesterolemické, antidiabetické, celkově posilující (roborační). Je však nutné konstatovat, že biologická aktivita sloučenin, které byly izolovány, je podstatně užší: komplexní biologický účinek extraktů může být způsoben synergickým vlivem jednotlivých sloučenin (což není možné prakticky experimentálně zjistit), a také nedostatkem seriózních farmakologických studií z poslední doby. Jisté však je, že studium biologické aktivity mnohých sloučenin je z toxikologického hlediska nutné (zejména látek typu ekdysteroidů, guajanolidů, polyinů a lignanů), protože rostlina je používána v poměrně široké geografické oblasti a tlak na její využití v ČR se určitě bude zvyšovat.



Jak ukazují údaje za posledních 10 let, tvoří v celém profilu nejvyšší počet publikací práce ruských autorů. Pokud se zmíním jen rámcově o hlavních směrech použití extraktů z různých morfologických částí rostliny, pak musím uvést, že jsou používány nejen jako fytofarmakum, ale také tvoří v širokém měřítku součást doplňků stravy, což bylo možné očekávat, protože nadzemní část této rostliny byla (a zcela určitě je v zemích bývalého SSSR) používána jako bioaktivní stimulant ve výživě hospodářských zvířat (Opletal, 1990). Přípravky jsou doporučovány např. pro zvýšení imunity a pracovní výkonnosti (Slepysheva, 2001), adaptace organismu a jeho posílení (Glyzyn, 2002; Nikolajev 2005), je pokládána za rostlinu vhodnou k preventivnímu použití do klimaticky chladných oblastí (Galambosi, 2003), jako součást přípravků s antioxidačním účinkem (s dalšími látkami z rostlin) (Nyrkova, 2009). Je součástí nealkoholických nápojů (Filonova, 2006), součástí fytotherapeutického prostředku, jehož složky působí významně synergicky v případě kardiovaskulárních potíží a ženských endokrinních problémů (Olalde, 2007), uplatňuje se jako jedna z hlavních součástí bioaktivní aditivní směsi využitelné jako doplněk stravy (Gavrikov, 2002, Pilat, 2003), tvoří součást přípravku pro léčení alkoholizmu (Ponomareva, 2000). Extrakty jsou součástí patentového sdělení přípravku navrženého při mírnění projevů chronického únavového syndromu (Lukašina, 2010) a jako doplněk sportovní výživy pro zvýšení svalové síly (Elistratov, 2010).

Z hlediska vlivu na kardiovaskulární systém byly experimentálně u extraktů zjištěny antiarytmické a kardioprotektivní účinky (Maslov, 2007); obsahové látky extraktu působí ochranně na ischemizovaný krysí mozek (Plotnikov, 2005), rostlina je navržena jako součást herbální směsi pro ovlivňování kardiovaskulárních onemocnění (Losevskoj, 2003) a s dalšími komponentami k úpravě rheologických vlastností krve – snížení její viskozity (Plotnikov, 2002). Existuje návrh složení fytonutraceutické směsi příznivě ovlivňující srdeční činnost (Olalde 2008) a také přípravku k prevenci kardiovaskulárních onemocnění, Alzheimerovy choroby, diabetes mellitus (k regulaci krevní glukosy a ovlivnění inzulinové rezistence) (Mazed 2010). V této souvislosti je velmi zajímavý údaj o biologickém účinku *N*-feruloylserotoninových derivátů (Yamamotová, 2007), u nichž byl zjištěn selektivní účinek proti negativním stresovým faktorům. Dosud existuje sdělení o izolaci těchto látek z nažek

(generativních orgánů) (Harmatha, 2007), není však známo, zda jsou tyto látky přítomny v listech i kořenech. Pokud by byly potvrzeny také v nati a kořenech, byl by to logický příspěvek k adaptogennímu efektu parchy saflorové.

Tento taxon byl vybrán pro další studium sekundárních metabolitů rostlin z čeledi Asteraceae v rámci systematického výzkumu na trombocytární antiagregační a antioxidační aktivitu jako jediný z 32 druhů běžných rostlin této čeledi (léčivých, plevelných a speciálních plodin), které byly k dispozici. Sledování výše uvedené biologické aktivity přispělo k dalšímu poznání rostliny, které bylo na katedře farmaceutické botaniky a ekologie věnováno mnoho pozornosti formou grantů (Opletal, 1994; Sovová, 1994; Sovová, 2001; Rozkot, 2004; Kolečkář, 2005; Rozkot, 2007) a vědeckých konferencí v rámci projektu CADISO (Opletal, 1993; Opletal, 1995; Opletal, 1998).

Látky izolované v této práci patří do skupiny guajanolidů a flavonových aglykonů. Byly získány z listů taxonu pěstovaného v České republice (fy Šimáková, Ohnišov) získaného z osiva, původně importovaného z Ukrajiny (J. Bajer, zahradnictví ADAVO, Velký Osek). Protože jsou popisovány záměny s taxonem *Leuzea rhapontica* (L.) Holub (syn. *Rhaponticum scariosum* L.) – parcha léčivá a existují dva poddruhy a jedna forma: *L. carthamoides* ssp. *eucarthamoides* a *L. carthamoides* ssp. *orientale* a forma *alpinum* (Opletal, 1990), bylo nutné provést verifikaci za pomoci herbářových položek. Na základě této identifikace (L. Opletal, V. Samková) byla konstatováno, že se jedná o *L. carthamoides* s. l., nikoliv ssp. *orientale*, spíše ssp. *eucarthamoides*. S jednoznačností však tento poddruh nemohl být potvrzen, protože nebyly k dispozici herbářové položky původních rostlin rostoucích v jižní Sibiři, při analýze se vycházelo z dostupných exsikátů a popisu a nebylo možné provést genetickou analýzu. Proto je taxon v této práci označen pouze jako *L. carthamoides*.

Extrakt pro izolaci látek byl připraven z listů sbíraných na začátku tvorby květů (červen); v této době jsou listy velmi dobře vyvinuty, neusychají a nežloutnou. Listy byly sušeny při normální teplotě. Po extrakci a předběžném vyčištění jsem dále zpracovávala méně polární chloroformový extrakt (viz kap. 6.2). Tzv. vodný extrakt obsahoval polární látky (flavonoidní glykosidy, převážnou část ekdysteroidů, organické kyseliny ad.) a byl náplní doktorské práce mimo rámec této studie. Po

odstranění nežádoucích lipofilních podílů z chloroformového extraktu (tuky, kutikulární vosky, nízkomolekulární těkavé terpeny) bylo možné předpokládat výskyt méně polárních a středně polárních sloučenin. Protože v nati parchy saflorové nebyly dosud nikdy nalezeny polyiny, předpokládala jsem na základě literatury (Kokoška 2009) výskyt pouze guajanolidů, derivátů *N*-feruloylserotoninu a lignanů. Je nutné konstatovat, že přítomnost flavonových aglykonů ve chloroformovém výtřepku není překvapením: ačkoliv lze tyto látky z rostlinných extraktů získat výtřepáním ethyl-acetátem (a oddělit je tak od flavonoidních glykosidů), je zde nutné vzít v úvahu, že v primárním extraktu je řada sloučenin, které mohou působit solubilizačně ve smyslu přechodu těchto látek do chloroformu (tento jev je ve fytochemii zcela běžný). Obsah těchto flavonových glykosidů ve výtřepku bývá však nízký; lze předpokládat, že látky zůstaly v převážné většině v polárním vodném extraktu. Naopak guajanolidy jsou látky méně až středně polární a je nepochybné, že převážná část těchto sloučenin byla získána do chloroformového extraktu.

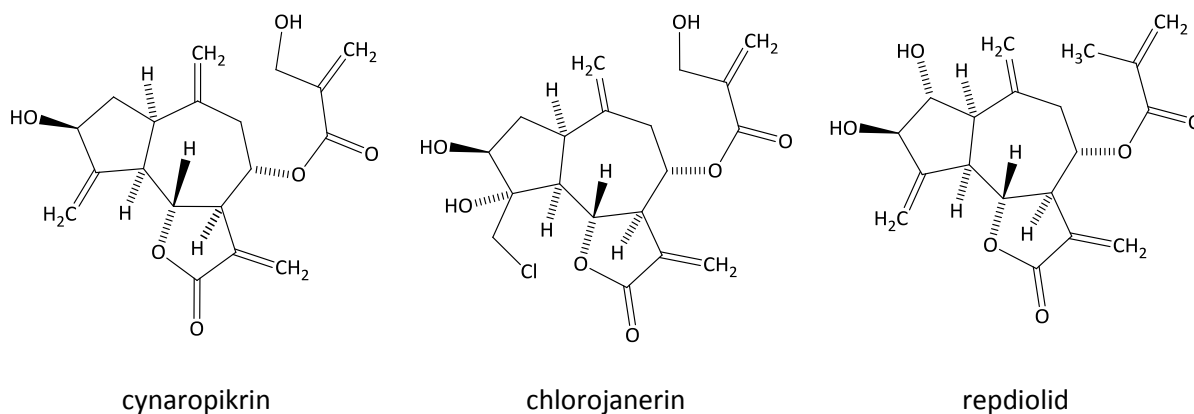
U všech získaných látek (LC-1 (cynaropikrin), LC-2 (chlorojanerin), LC-3 (repdiolid), LC-4 (jaceosidin) a LC-5 (hispidulin)) není potřebné provádět bližší rozbor spektrálních charakteristik (MS,  $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$ ), protože se jedná o látky známé, jejich charakteristiky byly porovnány s literárními údaji a nalezena shoda. Obsah těchto látek v suchých listech byl zjištěn výpočtem jako velmi nízký: pohybuje se řádově mezi  $10^{-4}$  až  $10^{-5}$  % (viz tab. 6). Tyto údaje jsou však velmi informativní, nelze je brát zcela jednoznačně, protože izolace si nikdy neklade za cíl kvantitativní hledisko; látky mohou být přítomny ještě v jiných frakcích (viz kap. 6.3). Rovněž je nutné vzít v úvahu, že žádný z literárních pramenů nedefinuje přesně použitý taxon a také je potřeba mít na paměti klimatické podmínky, v nichž se rostlina vyskytovala. Otázkou zůstává, proč se při této studii nepodařilo izolovat cebellin E a janerin, ačkoliv byly látky polskými autory z nadzemní části *L. carthamoides* izolovány už v minulém století (Nowak, 1988). Jedním z vysvětlení je to, že uvedené látky nemusely vykazat antiagregační aktivitu a tak zůstaly při izolaci nepovšimnuty.

Stanovení obsahu cynaropikrinu (LC-1) v souvislosti s vypracováním postupu superkritické fluidní extrakce v rostlinném materiálu pěstovaném v oblasti Ohnišova (ovšem v roce 2006 poskytlo

hodnotu 0,046 % cynaropikrinu v listech (Sovová, 2008). Chlorojanerin (LC-2) a repdiolid (LC-3) stanovovány nebyly, nejsou o jejich obsahu v různých surovinách údaje ani v literatuře a tak nelze v této věci provést jednoznačný závěr. V této chvíli však takový závěr není potřebný, protože izolovaných látek bylo dostatečné množství pro provedení příslušných biologických testů, které poskytly odpověď na otázku proagregační, antiagregační aktivity a antioxidační.

Antiagregační aktivita guajanolidů nebyla dosud studována; v případě čeledi Asteraceae chybí dosud významná přehledná práce na téma biosyntézy, výskytu a biologické aktivity guajanolidů, tak jak to bylo zpracováno např. pro čeleď Apiaceae (Drew, 2009). Obecně lze říci, že trombocytárně antiagregační účinek seskviterpenových laktonů jakékoliv struktury nebyl dosud příliš studován. Antitrombocytární aktivitu vykazuje např. vernolepin (*Vernonia amygdalina*), lakton strukturně blízký eudesmanolidům (Laekeman, 1982), látka má zajímavou antiagregační aktivitu při použití agonistů AA a ADP (Laekeman, 1983). Antiagregační aktivitu a snížení uvolňování látek z granul (5-HT) vykazuje také extrakt z řimbaby obecné (*Tanacetum parthenium*) (Heptinstall, 1998); tento účinek je patrně navozen parthenolidem, ovšem extrakt obsahuje ještě další (minoritní) seskviterpeny a tak není možné udělat jednoznačný závěr o jejich vlivu. Helenalin H a 11 $\alpha$ ,13-dihydrohelenalin z prhy horské (*Arnica montana*) inhibují agregaci navozenou COL, tvorbu tromboxanu a 5-HT; inhibiční aktivita obou látek nastává v důsledku interace se sulfhydrylovými skupinami trombocytů a je spojena se snížením aktivity fosfolipasy A2 (Schroeder, 1990). Laktony melikofyllony A, B a C (*Melicope triphylla*) vykazaly silnou inhibiční aktivitu, byly aktivní vůči AA a COL (destičky potkana) (Su, 1998), bakkenolidy izolované z kořenů *Petasites formosanus* vykazaly inhibiční aktivitu vůči PAF (bakkenolidy G, H) deisobutyrylbakkenolid H vůči AA a COL na podobném modelu jako v předešlém případě (Wu, 1999). Nelze snad už pokládat za zajímavost (na základě faktů z literatury uvedených v této práci), že převážná část laktonů, které disponují antiagregační aktivitou, má zároveň protizánětlivé, někdy tzv. protirevmatické účinky (Willuhn, 1996; Heptinstall, 1998; Thastrup, 1987; Arakawa, 2008). Zcela jednoznačně se jedná o zásah do metabolismu AA; např. v případě helenalinu bylo zjištěno, že tento lakton má vliv na aktivitu 5-LOX a leukotrien C(4) synthasy (Tornhamre 2001).

Při sledování inhibice agregace ( $IC_{50}$ ) byly výsledky následující: cynaropikrin (LC-1)  $336 \pm 17 \mu\text{M}$  pro ADP,  $300 \pm 33 \mu\text{M}$  pro COL,  $1050 \pm 34 \mu\text{M}$  pro AA, agregaci indukovanou TR cynaropikrin neovlivnil; chlorojanerin  $552 \pm 19 \mu\text{M}$  pro COL, agregaci indukovanou TR, ADP, AA chlorojanerin neovlivnil; repdiolid  $630 \pm 12 \mu\text{M}$  pro ADP,  $1050 \pm 25 \mu\text{M}$  pro COL,  $490 \pm 30 \mu\text{M}$  pro AA, agregaci indukovanou TR repdiolid neovlivnil. Agregaci navozenou ADP nejvíce ovlivnil cynaropikrin, v porovnání s dipyridamolem ( $122,5 \pm 13 \mu\text{M}$ ) u něhož byla  $IC_{50}$  přibližně 2,7× vyšší. Lze tedy konstatovat, že nejúčinnější látkou z hlediska antiagregačního je cynaropikrin: ADP je prakticky nejmohutnějším stimulatorem shlukování krevních destiček při agregačním procesu a blokování tohoto agonisty může být terapeuticky velmi úspěšné jako v případě dipyridamolu. Dipyridamol inhibuje kromě řady dalších účinků fosfodiesterasy, které za normálních podmínek ovlivňují hladinu cAMP (zvyšují buněčnou hladinu cAMP a blokují trombocytární odpověď na ADP) a/nebo cGMP (přináší ještě doplňkovou výhodu, je-li současně přítomen NO nebo statiny). Dochází tedy k inhibici vychytávání adenosinu v trombocytech, erytrocytech i endoteliálních buňkách.



Žádný z izolovaných laktonů neovlivnil změnu metabolismu destičkových fosfolipidů ve smyslu uvolnění AA, která by pod vlivem enzymů denzního tubulárního systému navodila vznik endoperoxidů a  $TXA_2$  s velkou pravděpodobností proagregačního působení.

Podle vlivu na metabolismus AA lze s jistou dávkou opatrnosti říci, že jistý (ovšem slabý) protizánětlivý účinek by mohl vykazat repdiolid. To je ovšem teoretická úvaha, protože sledování

protizánětlivého efektu látek musí experimentálně zahrnovat mnohem širší spektrum účinků, než je pouhé sledování vlivu na metabolismus AA, navíc v omezeném rozsahu.

Při posuzování antioxidační aktivity (DPPH test) se ukázalo, že cynaropikrin a chlorojanerin byly prakticky neúčinné ( $EC_{50} > 1000 \mu\text{M}$ ) při porovnání s troloxem ( $EC_{50} 27,8 \pm 1,7 \mu\text{M}$ ) a kvercetinem ( $EC_{50} 25,3 \pm 1,6 \mu\text{M}$ ), zatímco repdiolid byl významně aktivnější ( $EC_{50} 259 \pm 14,2 \mu\text{M}$ ). Z tohoto porovnání je však zřejmé, že biologická aktivita repdiolidu je spíše formální, protože je prakticky 10× nižší než v případě standardů. Přitom musíme vzít také v úvahu, že ani jeden z izolovaných laktonů nebyl antioxidačně účinný ve FRAP testu.

Seskviterpenové laktony typu guajanolidů se v zástupcích čeledi Asteraceae vyskytují běžně. V literatuře nejsou dosud žádné relevantní údaje o antiagregační aktivitě těchto látek; vztah mezi strukturou a účinkem nelze proto zodpovědně vyvodit, ani se o ně pokusit.

Patrně nejčastější látkou této strukturní skupiny je cynaropikrin. Jeho hlavním zdrojem jsou listy artyčoku zeleninového (*Cynara scolymus* L., Asteraceae). Suchá komerční droga obsahuje seskviterpenových laktonů 0 až 4 %, z toho 43–87 % tvoří cynaropikrin s číslem hořkosti ca 400 000 (listová droga s běžným obsahem 1 % cynaropikrinu má číslo hořkosti 11 5000). Látka se významně podílí na choleretickém a digestivním účinku (Glasl 2007; Blaschek, 2009), snižuje hladinu sérových triglyceridů (Yoshikawa, 2006). Je také popisována spasmolytická aktivita (Emendoerfer, 2005). Cynaropikrin patří do skupiny látek s významně hořkou chutí (Rodgers, 2006); jeho deriváty jsou sledovány z hlediska vztahu struktura-hořkost (Scotti, 2007). Má poměrně široké cytotoxické účinky, např. proti buňkám sarkomu S-180 a Ehrlichově karcinomu (Zong, 1994), vykazuje *in vitro* cytotoxickou aktivitu vůči buněčným liniím maligních nádorů melanomu (SK-MEL), epidermoidním (KB), (BT-549) a ovariálním buňkám (SK-OV-3) (Muhammad, 2003). Působí dále proti lidským kancerózním buňkám SK-OV-3, LOX-IMVI, A549, MCF-7, PC-3, a HCT-15 (Ha, 2003) – v případě MCF-7 je tato aktivita však slabá (Li, 2005), buňkám U937, Eo1-1 a Jurkat T (Cho, 2004). Kromě cytotoxického účinku byl prokázán také efekt chemoprotektivní (Kang, 2007).

Z dalších antiinvazních účinků vykazuje *in vitro* zajímavý účinek proti trypomastigotům *Trypanosoma cruzi* (Schinor 2004) a působí jako hmyzí deterrenční látka (proti škůdcům *Trichlorepis glaberrima*, *Diacrisia obliqua*, *Philosamia ricini*) (Bhattacharyya, 1995), rovněž tak proti běžným typům skladištních škůdců (*Sitophilus granarius*, *Trogoderma granarium* a *Tribolium confusum*) (Cis, 2006). Cynaropikrin se ukázal také jako silný ireverzibilní inhibitor bakteriálního enzymu MurA (Bachelier, 2006).

Látka má protizánětlivý účinek působí na TNF- $\alpha$ , uvolňování NO a proliferaci lymfocytů; bylo zjištěno, že může participovat na zánětlivé odpovědi inhibicí tvorby prozánětlivých mediátorů a proliferací lymfocytů a jejich inhibičním efektem v důsledku reakce se sulfhydrylovými skupinami cílových proteinů (Cho, 2000).

Velmi zajímavý je inhibiční účinek na NF- $\kappa$ B aktivaci, využitelný nejen ve farmacii, ale i kosmetice (Okamoto 2006, Tsuboi, 2007, Iddamalghoda 2009) a to v souvislosti s ochranou před UVB zářením.

Chlorojanerin má velmi podobně jako cynaropikrin *in vitro* cytotoxickou aktivitu vůči buněčným liniím maligních nádorů melanomu (SK-MEL), epidermoidních buněk (KB), (BT-549) a ovariálních buňkách (SK-OV-3) (Muhammad, 2003). Je rovněž aktivní proti běžným typům skladištních škůdců (*Sitophilus granarius*, *Trogoderma granarium* a *Tribolium confusum*) (Cis, 2006).

Repdiolid nebyl do této doby podroben žádným biologickým testům; tak jako v předešlých obou případech u něj byla nalezena určitá aktivita proti hmyzím škůdcům (*Sitophilus granarius*, *Trogoderma granarium*, *Tribolium confusum*) (Cis, 2006).

Flavonoidy jsou jednou z nejrozšířenějších skupin sekundárních metabolitů rostlin; od roku 2000 bylo publikováno přes 2500 přehledných článků, za 7 měsíců roku 2010 je to relevantních 102 článků. Jejich biologický účinek jak *in vitro*, tak zejména *in vivo* je široký a přesahovalo by téma této práce jej uvádět, zmíním se pouze o základních oblastech, ve kterých tyto látky mohou najít uplatnění, zejména díky svým účinkům antioxidačním (chemoprotektivním), antineoplastickým, antiinvazním

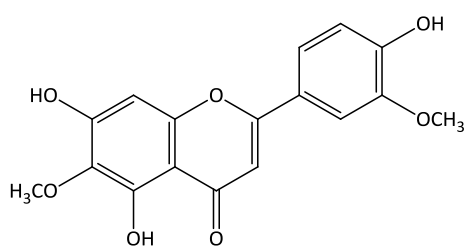
(ve smyslu mikrobiálních a protozoálních agens), antiflogistickým, antiulcerózním, antihistaminovým, neuroprotektivním (při ovlivňování ethylizmu), antiaterogenním ad. Flavonoidní látky širokého strukturního spektra zasahují značnou měrou do metabolismu enzymů (což je jeden z jejich hlavních mechanismů účinků), působí např. na enzymovou rodinu cytochromu P450 (Androutopoulos, 2010), mají vliv na metalloproteinasy (Rashidi, 2010) a fungují jako inhibitory fosfodiesteras (ovlivňujících právě dilataci cév, relaxaci hladkého svalstva, působících antidepresivně, antitromboticky, protizánětlivě, zvyšujících kognitivní aktivitu) (Rahimi, 2010). Uplatňuje se také jejich vliv na modulaci ABC transportérů (P-glycoprotein, MRP2, BCRP) (Alvarez, 2010). Rozhodujícím faktorem této skupiny látek je však jejich biologická dostupnost: ačkoliv jsou to látky polární (polyfenoly), je jejich rozpustnost v biologických tekutinách lidského organismu poměrně nízká. Jsou proto hledány cesty pro zvýšení rozpustnosti, resp. biologické dostupnosti, jako je např. uvedení do formy fytosomů (Pandey, 2010), nebo tvorba nanočástic (Leonarduzzi, 2010), aj. S flavonoidy se člověk každodenně běžně setkává ve formě zeleniny a ovoce a jejich příjem za den dosahuje někdy až 1 gram, nebo i více (v případě extrémních diet). Na tomto místě je vhodné připomenout např. jablka, čaj, kakao, sóju, z léčiv flavonoidy citrusových plodů (hlavně rutin), jinan dvoulaločný aj.

Flavonoidy vykazují antiaterogenní vlastnosti: konzumace ovoce a zeleniny ve větším množství může snížit riziko vývoje kardiovaskulárních onemocnění, chrání cévní endotel, snižují oxidaci LDL, snižují krevní tlak, upravují dyslipidemii, zasahují do metabolismu LOX, COX, synthas NO aj. (Gross, 2004; Harnafi, 2007; Mulvihill, 2010). Tyto součásti potravního řetězce jsou v poslední době podrobeny kritickým studiím formou kontrolovaných potravních intervenčních studií týkajících se vlivu na trombocytární agregaci (např. Ostertag, 2010). Studie jsou však velmi náročné na provedení, sledování parametrů resorpce látek, stanovení jejich obsahu, protože trávení potravy je složitý multifaktoriální jev, a proto nemusí být výsledky někdy přesvědčivé (nutno však říci, že dvojitě, placebem zaslepené studie některých běžných látek, jako jsou tokoferoly a  $\beta$ -karoten, které byly prováděny s cílem jednoznačného prokázání jejich „vitamínového“ účinku, poskytly zčásti také nepřesvědčivé výsledky). U flavonových aglykonů kvercetin, luteolinu a apigeninu z olivových plodů

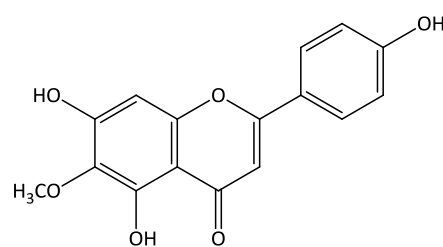


bylo zjištěno, že snižují trombocytární agregaci u člověka; zásah do metabolismu cAMP a cGMP-fosfodiesteras je jedním z mechanismů jejich účinku (Dell'Agli, 2008). U kvercetinu, který je patrně nejrozšířenějším flavonovým aglykonem a dalších flavonoidních aglykonů bylo v rámci studia inhibice trombocytární agregace zjištěn účinek na cAMP-fosfodiesterasu. Ukázalo se, že antiagregační účinek klesá, je-li dvojná vazba na C-2 a C-3 nasycena, chybí-li v poloze C-4 karbonyl, nebyla-li provedena na C-3 glykosylace a zvýší-li se substituce hydroxylovými skupinami na skeletu (Beretz, 1982). Antiagregační aktivitu mají také glykosidy na bázi flavonového aglykonu kempferolu (Fattorusso, 2001).

Jaceosidin, LC-4 (4',5,7-trihydroxy-3',6-dimethoxyflavon) a hispidulin, LC-5 (4',5,7-trihydroxy-6-methoxyflavon), které byly v této práci izolovány, jsou známé flavonové aglykony známé déle než 30 let, z nadzemní části parchy saflorové však byly izolovány poprvé.



jaceosidin



hispidulin

Z hlediska antiagregační aktivity vykazaly oba aglykony následující výsledky (tab. 7, tab. 8): při použití agonisty ADP bylo  $IC_{50} > 1000 \mu M$  (jaceosidin  $1190 \pm 31 \mu M$ , hispidulin  $1060 \pm 54 \mu M$ , dipyridamol  $122,5 \pm 13$ ), jedná se o nevýznamný efekt. Při použití COL a aplikaci jaceosidinu byla odezva nevýznamná ( $IC_{50} 382 \pm 13 \mu M$ ), podstatně významnější byla v případě hispidulinu ( $IC_{50} 100 \pm 24 \mu M$ ) v porovnání s ASA ( $IC_{50} 84,8 \pm 11 \mu M$ ). Slabý účinek při použití AA ( $IC_{50} 16,1 \pm 1,2 \mu M$ ) se projevil u jaceosidinu ( $IC_{50} 136 \pm 16 \mu M$ ), v případě hispidulinu byl nevýznamný ( $IC_{50} 522 \pm 13 \mu M$ ). Při použití TR nemá smyslu u obou látek o antiagregační aktivitě hovořit ( $IC_{50} > 1000 \mu M$ ).

Při posuzování antioxidační aktivity (DPPH test) byly oba flavonové aglykony (jaceosidin,  $EC_{50} 411 \pm 16,8 \mu M$ ; hispidulin,  $EC_{50} 796,6 \pm 25,3 \mu M$ ) rovněž málo aktivní v porovnání se standardními látkami troloxem ( $EC_{50} 27,8 \pm 1,7 \mu M$ ) a kvercetinem ( $EC_{50} 25,3 \pm 1,6 \mu M$ ). V případě antioxidačního

FRAP testu vykázal nejvyšší hodnotu jaceosidin (39,2  $\mu\text{M}$  po 60min. expozici) v porovnání se standardy za stejnou dobu expozice troloxem (22,2  $\mu\text{M}$ ) a kvercetinem (98,3  $\mu\text{M}$ ).

Jak antiagregační, tak antioxidační aktivity jsou z hlediska vztahu struktury a účinku u těchto dvou látek těžko interpretovatelné, protože v literatuře scházejí údaje o látkách podobné struktury a jejich biologické aktivitě.

Jaceosidin izolovaný z květenství některých zástupců rodu *Arnica* vykázal cytotoxickou aktivitu vůči liniím kancerózních buněk GLC4 ( $\text{IC}_{50}$  0,44  $\mu\text{M}$ ) a COLO 320 ( $\text{IC}_{50}$  1,0  $\mu\text{M}$ ). Vůči jaceosidinu (a dalším flavonoidům) byly buňky COLO 320 citlivější než vůči GLC4 (Woerdenbag, 1994). Jaceosidin byl izolován především z nadzemní části některých zástupců rodu *Artemisia*; jako složka polyfenolové směsi z *Artemisia sublessingiana* Poljakov se s největší pravděpodobností podílí na cytotoxickém účinku vůči buňkám Ehrlichova karcinomu a adenokarcinomu 755 (Ryakhovskaya, 1987). Látka (izolovaná z *Artemisia copa*) vykazuje protizánětlivou aktivitu. Slabě inhibuje produkci NO, aktivitu COX-2 v dávce závislé na koncentraci ( $\text{IC}_{50}$  2,8  $\mu\text{M}$ ) (Moscatelli, 2006). Antioxidační a protizánětlivá aktivita jaceosidinu (*Artemisia princeps* cv. Sajabal) se projevila inhibicí LDL oxidace mediované  $\text{Cu}^{2+}$  ( $\text{IC}_{50}$  10,2  $\mu\text{M}$ ) v thiobartiturovém testu podobně jako oxidace LDL pod vlivem makrofágu. Inhiboval také NF- $\kappa\text{B}$  aktivitu, tvorbu NO a tlumil expresi iNOS v makrofágu RAW264.7 po indukci lipopolysacharidem (Kim, 2008).

Aglykon hispidulin vykazuje inhibiční aktivitu na cAMP-fosfodiesterasu; při této studii se ukázalo, že *O*-methylované flavony mají vyšší aktivitu než hydroxyflavony (Nikaido, 1988); vztahu mezi strukturou a cAMP inhibičním účinkem za pomoci  $^{13}\text{C}$  NMR byla věnována širší studie (Sakamoto, 1989). Také vztahu mezi strukturou a antioxidační aktivitou flavonů a dalších typů flavonoidních látek (QSAR) byly věnovány přehledné studie (Khusbaktova, 1996; Rasulev, 2005). Antioxidační účinek bývá spojován s účinkem chemoprotektivním: ten je často označován jako účinek „hepatoprotektivní“ (i když tento pojem může být pokládán za sporný): hispidulin izolovaný z *Plantago depressa* vykázal hepatoprotektivní aktivitu (poškození  $\text{CCl}_4$ ) za předpokladu, že hepatocyty byly před aplikací halogenovaného uhlovodíku inkubovány s flavonem (Wu, 2006).

Chemoprotektivně na játra působí také glykosid hispidulin 7-*O*-neohesperidosid (nadzemní část *Cirsium japonicum* var. *ussuriense*): tlumí peroxidaci lipidů k níž dochází po aplikaci etanolu (Park, 2004). Hispidulin (izolovaný z nadzemní části *Scutellaria barbata* (také z chloroformové frakce) vykázal cytotoxický efekt na linii buněk Bel-7402 (indukce apoptózy) (Yu, 2007). Látka (získaná z glandulárních trichomů *Tithonia diversifolia*) má také herbivorní a protipožerovou aktivitu vůči babočkovitému motýlu *Chlosyne lacinia* (Ambrosio, 2008).

Zcela závěrem shrnuji, že chloroformová frakce z listů parchy saflorové pěstované komerčně v ČR, sbíraných v období tvorby květů, která obsahovala 3 dříve známé guajanolidy a 2 známé, ale z této rostliny dosud neizolované flavonové aglykony, nevykazuje proagregační ani prooxidační aktivitu, která by byla v použitých testech pozorovatelná, ale naopak částečnou aktivitu antioxidační a antiagregační; není tedy z tohoto pohledu toxická z hlediska poškození kardiovaskulárního systému, naopak může působit protektivně. V této chvíli (až do celkového zhodnocení polárního, vodného extrakčního zbytku; u flavonoidů z něho izolovaných byla v první fázi zjištěna rovněž antiagregační aktivita (Kolečkář, Brojerová, 2008)) lze předběžně souhlasit s názorem některých autorů (Kokoška, 2009), že je to bezpečná rostlina.

## 9. SOUHRN

Rostliny čeledi Asteraceae byly testovány na proagregační a antiagregační aktivitu pomocí optické agregometrie. Z testovaných zástupců byla v *in vitro* testech na lidských trombocytech antiagregačně aktivní pouze druh *Leuzea carthamoides* (listy) z celkového počtu 32 sledovaných taxonů. U některých rostlin bylo navíc hodnoceno více částí (nať, květ apod.). Extrakt z listů *Leuzea carthamoides* snížil při koncentraci 0,5 mg ml<sup>-1</sup> agregaci navozenou ADP o 33 ± 6 % a COL o 95 ± 5 %. Žádný z testovaných taxonů nevykázal proagregační působení.

Z ethanolového extraktu připraveného z 10,5 kg sušených listů parchy saflorové byl po předběžném vyčištění nejaktivnější chloroformový výtřepek. Po jeho rozdělení sloupcovou chromatografií na 7 sumárních frakcí bylo zjištěno, že všechny frakce byly z hlediska antiagregačního efektu vysoce aktivní u agregace indukované COL a AA. U agregace indukované ADP byly nejaktivnější spojené frakce 1 a 5. Z frakcí 1 a 3, které obsahovaly podle TLC velké množství látek, se nepodařilo pro jejich malé množství izolovat žádnou látku. Ostatní frakce byly podrobeny další separaci.

Z frakce 2 bylo rekrystalizací získáno 0,0231 g nažloutlé krystalické látky, nazvané LC-4 (jaceosidin). Z frakcí 4 a 5 bylo rekrystalizací získáno 0,0378 g nažloutlé krystalické látky LC-5 (hispidulin). Z frakce 6 bylo preparativní HPLC získáno 0,1916 g LC-1 (cynaropikrin) a 0,1546 g LC-2 (chlorojanerin). Z frakce 7 bylo získáno 0,4639 g LC-3 (repdiolid).

U látek byla zjištěna inhibice agregace (IC<sub>50</sub>) s těmito výsledky: cynaropikrin 336 ± 17 μM pro ADP, 300 ± 33 μM pro COL, 1050 ± 34 μM pro AA, agregaci indukovanou TR cynaropikrin neovlivnil; chlorojanerin 552 ± 19 μM pro COL, agregaci indukovanou TR, ADP, AA chlorojanerin neovlivnil; repdiolid 630 ± 12 μM pro ADP, 1050 ± 25 μM pro COL, 490 ± 30 μM pro AA, agregaci indukovanou TR repdiolid neovlivnil; jaceosidin 1190 ± 31 μM pro ADP, 382 ± 13 μM pro COL, 136 ± 16 μM pro AA, agregaci indukovanou TR jaceosidin v neovlivnil; hispidulin 1060 ± 54 μM pro ADP, 100 ± 24 μM pro COL, 522 ± 13 μM pro AA, agregaci indukovanou TR hispidulin neovlivnil. Agregaci navozenou ADP nejvíce ovlivnil cynaropikrin, v porovnání s dipyridamolem (122,5 ± 13 μM) byla IC<sub>50</sub> přibližně 2,7× vyšší. Agregaci navozenou AA nejvíce ovlivnil jaceosidin, v porovnání s ASA (84,8 ± 11 μM) byla IC<sub>50</sub>

přibližně 8,4 × větší. Agregace navozená COL byla nejvíce ovlivněna hispidulinem, v porovnání s ASA ( $84,8 \pm 11 \mu\text{M}$ ) byla  $\text{EC}_{50}$  přibližně 1,2x vyšší.

Při posuzování antioxidační aktivity (DPPH test) se ukázalo, že seskviterpenové laktony cynaropikrin a chlorojanerin byly prakticky neúčinné ( $\text{EC}_{50} > 1000 \mu\text{M}$ ), zatímco repdiolid byl významně aktivnější ( $\text{EC}_{50} 259 \pm 14,2 \mu\text{M}$ ). Oba flavonové aglykony jaceosidin ( $\text{EC}_{50} 411 \pm 17,8 \mu\text{M}$ ) a hispidulin ( $\text{EC}_{50} 796,6 \pm 25,7 \mu\text{M}$ ) byly rovněž málo aktivní v porovnání se standardními látkami troloxem ( $\text{EC}_{50} 27,8 \pm 1,7 \mu\text{M}$ ) a kvercetinem ( $\text{EC}_{50} 25,3 \pm 1,6 \mu\text{M}$ ).

V případě antioxidačního FRAP testu vykázal nejvyšší hodnotu jaceosidin ( $39,2 \mu\text{M}$  po 60min. expozici) v porovnání se standardy za stejnou dobu expozice troloxem ( $22,2 \mu\text{M}$ ) a kvercetinem ( $98,3 \mu\text{M}$ ).

## 10. ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra: farmaceutické botaniky a ekologie

Kandidát: mgr. Eliška ŠTEJNAROVÁ

Školitel: doc. RNDr. Lubomír OPLETAL, CSc.

Název disertační práce: **Vliv obsahových látek vybraných taxonů vyšších rostlin na trombocytární agregaci**

V rámci systematického výzkumu sekundárních metabolitů rostlin z čeledi Asteraceae na trombocytární antiagregační a antioxidační aktivitu byly testovány sumární extrakty z 32 druhů této taxonomické jednotky. Antiagregační aktivita byla hodnocena *in vitro* na lidských trombocytech v plazmě bohaté na destičky. Primární použitá koncentrace extraktů byla  $500 \mu\text{g ml}^{-1}$ , jako agonisté agregace byly použity kyselina arašidonová (AA), adenosindifosfát (ADP), kolagen (COL) a trombin (TR). Z testovaných rostlin byla antiagregačně aktivní pouze *Leuzea carthamoides* (listy), inhibovala agregaci vyvolanou ADP o  $33 \pm 6 \%$  a COL o  $95 \pm 5 \%$ . Žádný z testovaných taxonů nevykázal proagregační působení. Z 10,5 kg sušených listů parchy saflorové byly sekvenčně připraveny extrakty; z neaktivnějšího, chloroformového extraktu bylo sloupcovou a tenkovrstvou chromatografií izolováno 5 látek: LC-1 (cynaropikrin), LC-2 (chlorojanerin), LC-3 (repiolid), LC-4 (jaceosidin), LC-5 (hispidulin). Antiagregační aktivita látek ( $IC_{50}$ ) byla následující: LC-1:  $336 \pm 17 \mu\text{M}$  – ADP,  $300 \pm 33 \mu\text{M}$  – COL,  $1050 \pm 34 \mu\text{M}$  – AA, agregace TR neovlivněna; LC-2:  $552 \pm 19 \mu\text{M}$  – COL, agregace TR, ADP, AA neovlivněna; LC-3:  $630 \pm 12 \mu\text{M}$  – ADP,  $1050 \pm 25 \mu\text{M}$  – COL,  $490 \pm 30 \mu\text{M}$  – AA, agregaci indukovanou TR repiolid neovlivnil; LC-4:  $1190 \pm 31 \mu\text{M}$  – ADP,  $382 \pm 13 \mu\text{M}$  – COL,  $136 \pm 16 \mu\text{M}$  – AA, agregace TR neovlivněna; LC-5:  $1060 \pm 54 \mu\text{M}$  – ADP,  $100 \pm 24 \mu\text{M}$  – COL,  $522 \pm 13 \mu\text{M}$  – AA, agregace TR neovlivněna. V testech na antioxidační aktivitu (DPPH) byly LC-1 a LC-2 prakticky neúčinné ( $EC_{50} > 1000 \mu\text{M}$ ), zatímco LC-3 byl významně aktivnější ( $EC_{50} 259 \pm 14,2 \mu\text{M}$ ). Oba flavonoidy byly v porovnání se standardy rovněž málo účinné: LC-4 ( $EC_{50} 411 \pm 17,8 \mu\text{M}$ ) a LC-5 ( $EC_{50} 796,6 \pm 25,7 \mu\text{M}$ ), trolox ( $EC_{50} 27,8 \pm 1,7 \mu\text{M}$ ), kvercetin ( $EC_{50} 25,3 \pm 1,6 \mu\text{M}$ ). V případě FRAP

testu vykazala nejvyšší hodnotu LC-4 (39,2  $\mu\text{M}$  po 60min. expozici) v porovnání se standardy: troloxem (22,2  $\mu\text{M}$ ) a kvercetinem (98,3  $\mu\text{M}$ ).

Klíčová slova: antiagregační aktivita, DPPH test, FRAP test, Asteraceae, *Leuzea carthamoides*, cynaropikrin, chlorojanerin, repdiolid, jaceosidin, hispidulin.

## 11. ABSTRACT

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department: Pharmaceutical Botany and Ecology

Candidate: Mgr. Eliška ŠTEJNAROVÁ

Supervisor: Doc. RNDr. Lubomír OPLETAL, CSc.

Title of doctoral thesis: **The Influence of Compounds from Selected Higher Plant Taxons on Platelet**

### **Aggregation**

As a part of phytochemical study of secondary metabolites of plants from family Asteraceae, 32 species from this taxonomical unit were tested for platelet aggregation and antioxidant activity. Platelet aggregation was evaluated *in vitro* on human thrombocytes in platelet rich plasma. The primary used concentration of extracts was  $500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , arachidonic acid (AA), adenosine diphosphate (ADP), collagen (COL), and thrombin (TR) were used as agonists. Out of the tested species, *Leuzea carthamoides* (leaves) was the only species which exhibited antiplatelet activity, the extract inhibited platelet aggregation induced by ADP and COL by  $33 \pm 6 \%$  and  $95 \pm 5 \%$ , respectively. None of the tested taxons showed proaggregatory effect. From 10.5 kg of dried leaves of *L. carthamoide* the extracts were prepared sequentially; five compounds: LC-1 (cynaropicrine), LC-2 (chlorojanerin), LC-3 (repiolid), LC-4 (jaceosidin), LC-5 (hispidulin) were isolated from the most active extract (chloroform) by column and thin layer chromatography. The antiplatelet activity of compounds ( $\text{IC}_{50}$ ) was for LC-1:  $336 \pm 17 \mu\text{M}$  – ADP,  $300 \pm 33 \mu\text{M}$  – COL,  $1050 \pm 34 \mu\text{M}$  – AA, aggregation induced by TR was not affected; for LC-2:  $552 \pm 19 \mu\text{M}$  – COL, aggregation induced by TR, ADP, AA was not affected; for LC-3:  $630 \pm 12 \mu\text{M}$  – ADP,  $1050 \pm 25 \mu\text{M}$  – COL,  $490 \pm 30 \mu\text{M}$  – AA, aggregation induced by TR was not affected by repiolid; for LC-4:  $1190 \pm 31 \mu\text{M}$  – ADP,  $382 \pm 13 \mu\text{M}$  – COL,  $136 \pm 16 \mu\text{M}$  – AA, aggregation induced by TR was not affected; for LC-5:  $1060 \pm 54 \mu\text{M}$  – ADP,  $100 \pm 24 \mu\text{M}$  – COL,  $522 \pm 13 \mu\text{M}$  – AA, aggregation induced by TR was not affected. Compounds LC-1 and LC-2 were practically inactive in DPPH radical scavenging assay ( $\text{EC}_{50} > 1000 \mu\text{M}$ ), while LC-3 was



significantly more active ( $EC_{50} 259 \pm 14.2 \mu\text{M}$ ). Both flavonoids were also less active in comparison with standard antioxidants: LC-4 ( $EC_{50} 411 \pm 17.8 \mu\text{M}$ ) and LC-5 ( $EC_{50} 796.6 \pm 25.7 \mu\text{M}$ ), trolox ( $EC_{50} 27.8 \pm 1.7 \mu\text{M}$ ), quercetin ( $EC_{50} 25.3 \pm 1.6 \mu\text{M}$ ). In case of FRAP test the highest value showed LC-4 (39.2  $\mu\text{M}$  after 60 mins exposition) in comparison with standards: trolox (22.2  $\mu\text{M}$ ) and quercetin (98.3  $\mu\text{M}$ ).

Key words: Antiplatelet activity, DPPH assay, FRAP test, Asteraceae, *Leuzea carthamoides*, cynaropicrine, chlorojanerin, repdiolid, jaceosidin, hispidulin.

## 12. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

---: Ginkgolide B. *Drugs of the Future* 1997, vol. 22(7), 791.

---: Ginkgolide B. *Drugs of the Future* 2000, vol. 25(7), 753-755.

AGRAWAL, P. K., THAKUR, R. S., BANSAL, M. C.: Flavonoids. In: Agrawal, P. K. (ed.), *Carbon-13 NMR of Flavonoids*. Elsevier, Amsterdam 1989, s. 95–182.

AHMED, B., KHAN, S., MASOOD, M. H., SIDDIQUE, A. H.: Anti-hepatotoxic activity of cichotyboside, a sesquiterpene glycoside from the seeds of *Cichorium intybus*. *Journal of Asian Natural Products Research* 2008, vol. 10(3), s. 218–223.

ALARCON, M., EIGERT, G., DUK, S., GARCIA, M., A.: Genotoxic effects of ovatifolin acetate, a sesquiterpene lactone isolated from *Podanthus ovatifolius* Lag. (Compositae). *Revista Internacional de Contaminacion Ambiental* 1992, vol. 8(2), s. 73–76; *Chem. Abstr.* 1993, vol. 119, 62568.

ALARCON, R., VACCARINI, C., SOSA, V.: Cytotoxic activity of extracts and sesquiterpene lactones from *Stachycephalum argentinum*. *Molecules [Electronic Publication]*, 2000, vol. 5(3), s. 433–434.

AL-HARBI, M., M., QURESHI, S., AHMED, M., M., RAZA, M., MIANA, G., A., SHAH, A., H.: Studies on the anti-inflammatory, antipyretic and analgesic activities of santonin. *Japanese Journal of Pharmacology* 1994, vol. 64(3), s. 135–139.

ALVAREZ, A. I., REAL, R., PEREZ, M., MENDOZA, G., PRIETO, J. G., MERINO, G.: Modulation of the activity of ABC transporters (P-glycoprotein, MRP2, BCRP) by flavonoids and drug response. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2010, vol. 99(2), s. 598–617.

AMBROSIO, S. R., OKI, Y., HELENO, V. C. G., CHAVES, J. S., NASCIMENTO, P. G. B. D., LICHSTON, J. E., CONSTANTINO, M. G., VARANDA, E. M., DA COSTA, F. B.: Constituents of glandular trichomes of *Tithonia diversifolia*: Relationships to herbivory and antifeedant activity. *Phytochemistry* 2008, vol. 69(10), 2052–2060.

ANDROUTSOPOULOS, V. P., PAPAKYRIAKOU, A., VOURLIOMIS, D., TSATSAKIS, A. M., SPANDIDOS, D. A.: *Pharmacology & Therapeutics* 2010, vol. 126(1), s. 9–20.

- ARAKAWA, N. S., SCHORR, K., AMBROSIO, S. R., MERFORT, I., DA COSTA, F. B.: Further sesquiterpene lactones from *Viguiera robusta* and the potential anti-inflammatory activity of a heliangolide: inhibition of human neutrophil elastase repase. *Zeitschrift fuer Naturforschung, C: Journal of Biosciences* 2008, vol. 63(7/8), 533–538.
- AREGULLIN, M., RODRIGUEZ, E.: Sesquiterpene lactone sequestration by the tortoise beetle *Physonota arizonae* (Cassidinae). *Revista de la Sociedad Quimica de Mexico* 2003, vol. 47(2), s. 143–145; *Chem. Abstr.* 2003, vol. 140, 214405.
- ARNASON, J. T., PHILOGENE, B. J. R., DUVAL, F., McLACHLAN, D., PICMAN, A. K., TOWERS, G. H. N., BALZA, F.: Effects of sesquiterpene lactones on development of *Aedes atropalpus* and relation to partition coefficient. *Journal of Natural Products* 1985, vol. 48(4), s. 581–584.
- AZCONA, C., PATINO, A., RAMOS, M., RUZA, E., RAGGIO, S., ALONSO, L.: Obesity in children. *Revista de medicina de la Universidad de Navarra* 2000, vol. 44(4), s. 29–44; PubMed ID: 11341054
- BACHELIER, A., MAYER, R., KLEIN, C. D.: Sesquiterpene lactones are potent and irreversible inhibitors of the antibacterial target enzyme MurA. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2006, vol. 16(21), 5605–5609.
- BARBOSA, L. C. A., COSTA, A. V., PILO-VELOSO, D. LOPES, J. L. C., HERNANDEZ-TERRONES, M. G., KING-DIAZ, B., LOTINA.HENNSEN, B.: Phytogrowth-inhibitory lactones derivative of glaucolide B. *Zeitschrift fuer Naturforschung, C: Journal of Biosciences*, 2004, vol. 59(11/12), s. 803–810.
- BELOVA, L. F., BAGINSKAIA, A. I., TRUMPE, T. E., SOKOLOV, S. I., RYBALKO, K. S.: Pharmacological properties of inulicin, a sesquiterpene lactone from Japanese inula. *Farmakologii i Toksikologii*, 1981, vol. 44(4), s. 463–467.
- BERETZ, A., CAZENAVE, J. P., ANTON, R.: Inhibition of aggregation and secretion of human platelets by quercetin and other flavonoids: structure-activity relationships. *Agents and Actions* 1982, vol. 12(3), s. 382–387; *Chem. Abstr.* 1982, vol. 97, 84775.
- BERGER, I., PASSREITER, C. M., CACERES, A., KUBELKA, W.: Antiprotozoal activity of *Neurolaena lobata*. *Phytotherapy Research* 2001, vol. 15(4), s. 327–330.

- BERNARD, P.: Composition comprising a sesquiterpene lactone for preventing or treating diseases resulting from a cell death process. Fr. Demande 2005, FR 2861293 A1 20050429; Chem. Abstr. 2005, vol. 142, 397665.
- BETLEJEWSKI, S.: Social diseases, civilization diseases or lifestyle diseases? *Wiadomosci lekarskie* (Warsaw), 2007, 60(9–10), s. 489–492.
- BHATTACHARYYA, P. R., BARUA, N. C., GHOSH, A. C.: Cynaropicrin from *Trichlorepis glaberrima*: a potential insect feeding deterrent compound. *Industrial Crops and Products* 1995, vol. 4(4), s. 291–294.
- BJORNTORP, P., HOLM, G., ROSMOND, R., FOLKOW, B.: Hypertension and the metabolic syndrome: closely related central origin? *Blood Pressure* 2000, vol. 9(2–3), s. 71–82.
- BLANCO, J. G., GIL, R. R., ALVAREZ, C. I., PATRITO, L. C., GENTI-RAIMONDI, S. FLURY, A.: A novel activity for a group of sesquiterpene lactones: inhibition of aromatase. *FEBS Letters* 1997, vol. 409(3), s. 396–400.
- BLASCHEK, W., HILGENFELDT, U., HOLZGRABE, U., REICHLING, J., RUTH, P., SCHULTZ, V.: HAGERROM 2009. *Hagers Enzyklopädie der Arzneistoffe und Drogen*. Springer, Heidelberg 2009 (Programmversion 9.2).
- BORKOSKY, S., PONCE DE LEON, S., JUAREZ, G., SIERRA, M. G., BARDON, A.: Molluscicidal sesquiterpene lactones from species of the tribe Vernonieae (Compositae). *Chemistry & Biodiversity* 2009, vol. 6(4), s. 513–519.
- BOTTEX-GAUTHIER, C., VIDAL, D., PICOT, F., POTIER, P., MENICHINI, F., APPENDINO, G.: In vitro biological activities of arglabin, a sesquiterpene lactone from the Chinese herb *Artemisia myriantha* Wall. (Asteraceae) *Biotechnology Therapeutics* 1993, vol. 4(1–2), s. 77–98.
- BRAQUER, P.: The ginkgolides: potent platelet-activating factor antagonists isolated from *Ginkgo biloba* L. *Chemistry, pharmacology and clinical applications*. *Drugs of the Future* 1987, vol. 12(7), 643–699.

- BUDESINSKY, M., NOWAK, G., RYCHLEWSKA, U., HODGSON, D. J., SAMAN, D., DANIEWSKI, W. M. DROZDZ, B., HOLUB, M.: Structure of sesquiterpenic lactones of some species of subtribe Centaureinae Dumort. Collection of Czechoslovak Chemical Communications 1994, vol. 59(5), s. 1175–1202.
- BURIM, R. V., CANALLE, R., LOPES, J. L. C., TAKAHASHI, C. S.: Genotoxic action of the sesquiterpene lactone glaucolide B on mammalian cells in vitro and in vivo. Genetics and Molecular Biology, 1999, vol. 22(3), s. 401–406.
- CAFARCHIA, C., DE LAURENTIS, N., MILILO, M. A., LOSACCO, V., PUCCINI V.: Fungistatic activity of a sesquiterpene lactone (tomentosin) isolated from fresh *Inula viscosa* (Asteraceae) flowers from the Puglia region. Parassitologia 2001, vol. 43(3), s. 117–121.
- CAMACHO, P., PITALE, S., ABRAIRA, C.: Beneficial and detrimental effects of intensive glycemic control, with emphasis on type 2 diabetes mellitus. Drugs & Aging 2000, vol. 17(6), s. 463–476.
- CARTAGENA, E., COLOM, O. A., NESKE, A., VALDEZ, J. C., BARDON, A.: Effects of plant lactones on the production of biofilm of *Pseudomonas aeruginosa*. Chemical & Pharmaceutical Bulletin, 2007, vol. 55(1), s. 22–25.
- CARTAGENA, E., MONTANARO, S., BARDON, A.: Improvement of the antibacterial activity of sesquiterpene lactones. Revista Latinoamericana de Quimica, 2008, vol. 36(2), s. 43–51; Chem. Abstr. 2009, vol. 151, 567132.
- CASTRO, V., RUNGELER, P., MURILLO, R., HERNANDEZ, E., MORA, G., PAHL, H., L., MERFORT, I.: Phytochemical and biological studies of Costa Rican Asteraceae III. Study of sesquiterpene lactones from *Milleria quinqueflora* on their anti-inflammatory activity using the transcription factor NF- $\kappa$ B as a molecular target. Phytochemistry 2000, vol. 53(2), s. 257–263.
- CEA, G., ALARCON, M., WEIGERT, G., SEPULVEDA, R.: Genotoxic effects of erioflorin acetate and erioflorin methacrylate: sesquiterpene lactones isolated from *Podanthus ovatifolius* Lag. (Compositae). Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology. 1990, vol. 44(1), s. 19–28.

- CESPEDES, C. L., MARIN, J. C., DOMINGUEZ, M., AVILA, J. G., SERRATO, B.: Plant growth inhibitory activities by secondary metabolites isolated from Latin American flora. *Advances in Phytomedicine*, 2006, vol. 2(Lead Molecules from Natural Products), s. 373–410.
- CESPEDES, C. L., RAMIREZ-APAN, T., UCHIDA, A., CALDERON, J. S., HOENENISEN, M., SILVA, M.: Anti-inflammatory activity of ovatifolin. *Revista Latinoamericana de Quimica* 2000, vol. 28(3), s. 125–130; *Chem. Abstr.* 2001, vol. 136, 63763.
- CIS, J., NOWAK, G., KISIEL, W.: Antifeedant properties and chemotaxonomic implications of sesquiterpene lactones and syringin from *Rhaponticum pulchrum*. *Biochemical Systematics and Ecology* 2006, vol. 34(12), s. 862–867.
- CONTI, A.: Oncology in neuroimmunomodulation. What progress has been made? *Annals of the New York Academy of Sciences* 2000, vol. 917, s. 68–83.
- CUTLAN, A. R., BONILLA, L. E., SIMON, J. E., ERWIN, J. E.: Intra-specific variability of feverfew: correlations between parthenolide, morphological traits and seed origin. *Planta Medica* 2000, vol. 66(7), s. 612–617.
- ČL 2005 – Dopln. 2006: Český lékopis 2005 – Doplněk 2006. Grada Publ., Praha 2006.
- DE MAGALHAES, P. M., PEREIRA, B., SARTORATTO, A., DE OLIVEIRA, J., DEBRUNNER, N.: New hybrid lines of the antimalarial species *Artemisia annua* L.. *Acta Horticulturae*, (Second World Congress on Medicinal and Aromatic Plants for Human Welfare, 1997), 1999, vol. 502, s. 377–381.
- DELL'AGLI, M., MASCHI, O., GALLI, G. V., FAGNANI, R., DAL CERRO, E., CARUSO, D., BOSISIO, E.: Inhibition of platelet aggregation by olive oil phenols via cAMP-phosphodiesterase. *British Journal of Nutrition* 2008, vol. 99(5), s. 945–951.
- DREW, D. P., KRICHAU, N., REICHWALD, K., SIMONSEN, H. T.: Guaianolides in Apiaceae: Perspectives on pharmacology and biosynthesis. *Phytochemistry Reviews* 2009, vol. 8(3), s. 581–599.
- DUPUY, O. A., MURILLO, R., BONILLA, J. A.: Sesquiterpene lactones of the plants *Viguiera sylvatica* and *Decachaeta thieleana* (Asteraceae) modulate nitric oxide production and phagocytosis of

- macrophages cell line RAW. *Revista de Biologia Tropical* 2008, vol. 56(3), s. 1063–1073; PubMed ID 19419028.
- ELISTRATOV, D. G.: Dietary supplement. RU 2390270 (2010); Chem. Abstr. 2010, 653219.
- EMENDOERFER, F., EMENDOERFER, F., BELLATO, F., NOLDIN, V. F., CECHINEL-FILHO, V., YUNES, R. A., DELLE MONACHE, F. C., ALCIBIA, M.: Antispasmodic activity of fractions and cynaropicrin from *Cynara scolymus* on guinea-pig ileum. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 2005, vol. 28(5), s. 902–904.
- ESKIN, N. A. M., SNAIT, T.: *Dictionary of Nutraceuticals and Functional Foods*. Taylor and Francis/CRC, Boca Raton 2006.
- FATTORUSSO, E., LANZOTTI, V., TAGLIALATELA-SCAFATI, O., CICALA, C.: The flavonoids of leek, *Allium porrum*. *Phytochemistry* 2001, vol. 57(4), s. 565–569.
- FERNANDES, M. B., SCOTTI, M. T., FERREIRA, M. J. P., EMERENCIANO, V. P.: Use of self-organizing maps and molecular descriptors to predict the cytotoxic activity of sesquiterpene lactones. *Journal of Medicinal Chemistry* 2008, vol. 43(10), s. 2197–2205.
- FERREIRA, J. F. S., JANICK, J.: Production and detection of artemisinin from *Artemisia annua*. *Acta Horticulturae*, (International Symposium on Medicinal and Aromatic Plants, 1994), 1995, vol. 390, s. 41–49.
- FILONOVA, G. L., KOMRAKOVA, N. A., SOBOLEVA, O. A., NIKIFOROVA, E. V., STRELKOV, V. N., KIRIMLEEVA, T. I., KRASHENINNIKOV, V. L., BEZGIN, V. M., POSTNIKOV, S. V., FEDOROVA, O. V., NAGORNYKH, YU. V.: Non-alcoholic beverage comprising plant concentrate, and its preparation method. RU 2279837 (2006); Chem. Abstr. 2006, 700419.
- FOURNET, A., MUNOZ, V., ROBLLOT, F., HOCQUEMILLER, R., CAVE, A., GANTIER, J. CH.: Antiprotozoal activity of dehydrozaluzanin C, a sesquiterpene lactone isolated from *Munnozia maronii* (Asteraceae). *Phytotherapy Research*, 1993, vol. 7(2), s. 111–115.

- FRUSCIANTE, L., BARONE, A., CARPUTO, D., ERCOLANO, M. R., DELLA ROCCA, F., ESPOSITO, S.: Evaluation and use of plant biodiversity for food and pharmaceuticals. *Fitoterapia* 2000, vol. 71(Suppl. 1), S66–S72.
- FUSCO, M. R., DE RUIZ, R. E. L., RUIZ, R. O.: Flavonoids and sesquiterpene lactones from *Conyza bonariensis* (L.) Cronquist (Asteraceae). *Acta Farmaceutica Bonaerense* 1999, vol. 18(4), s. 295–298; *Chem. Abstr.* 2000, vol. 133, 161788.
- GALAMBOSI, B., VARGA, E., HAJDU, ZS.: *Leuzea carthamoides* DC.: a tonic plant for cold climate: description, chemistry and cultivation: a review, in: *Recent Progress in Medicinal Plants* (SINGH, V. K., GOVIL, J. N., eds), vol. 7, s. 483–502; *Chem. Abstr.* 2008, 291579.
- GANNONG, W. F.: *Přehled lékařské fyziologie*. 20. vyd., Galén, Praha 2005.
- GAVRIKOV, S. R., DOBRYAKOV, YU. I.: Method for preparing bioactive food additive. RU 2177700 (2002); *Chem. Abstr.* 2004, 1106920.
- GERBER, B.: Breast cancer and environment: possibilities of prevention. *Gynaekologie* 2002, vol. 35(6), s. 561–569.
- GESZPRYCH, A., WEGLARZ, Z.: Composition of essential oil from underground and aboveground organs of *Rhaponticum carthamoides* (Willd.). *Ilijin. Herba Polonica*, 2002, vol. 48(4), s. 188–192.
- GIESBRECHT, A. M., DAVINO, S. C., NASSIS, C. Z., YOUNG, M. C. M., LOPES, J. L. C., RPDRIGUES, D. C., VICHNEWSKI, W., NASI, A. M. T. T., DIAS, D. A., LOPES, J. N. C.: Antimicrobial activity of sesquiterpene lactones. *Quimica Nova* 1990, vol. 13(4), s. 312–314.
- GLASL, S., TSENDAYUSH, D., BATCHIMEG, U., HOLEC, N., WURM, E., KLETTER, C., GUNBILIG, D., DAARIIMAA, K., NARANTUYA, S., THALHAMMER, T.: Choloretic effects of the mongolian medicinal plant *Saussurea amara* in the isolated perfused rat liver. *Planta Medica* 2007, vol. 73(1), 59–66.
- GLYZIN, V. I., SOKOL'SKAYA, T. A., KOLKHIR, V. K., VAL, E. V., GROMAKOVA, A. I., GRINENKO, N. A., KANDYBKA, N. E.: A mixture having improved adaptability and for strengthening body constitution. RU 2187326 (2002); *Chem. Abstr.* 2009, 1423300.



- GOPFERT, J. C., MACNEVIN, G., RO, D. K., SPRING, O.: Identification, functional characterization and developmental regulation of sesquiterpene synthases from sunflower capitata glandular trichomes. *BMC Plant Biology* 2009, vol. 9, s. 86.
- GOULDEN, V., WILKINSON, S. M.: Patch testing for Compositae Allergy: The British Journal of Dermatology 1998, vol. 138(6), s. 1018–1021.
- GROSS, M.: Flavonoids and Cardiovascular Disease. *Pharmaceutical Biology* 2004, vol. 42 (Suppl.), s. 21–35.
- GUILLET, G., HARMATHA, J., WADDELL, T. G., PHILOGENE, B. J. R., ARNASON, J. T.: Synergistic insecticidal mode of action between sesquiterpene lactones and a phototoxin,  $\alpha$ -terthienyl, *Photochemistry and Photobiology* 2000, vol. 71(2), s. 111–115.
- GURBUZ, I., YESILADA, E.: Evaluation of the anti-ulcerogenic effect of sesquiterpene lactones from *Centaurea solstitialis* L. ssp. *solstitialis* by using various in vivo and biochemical techniques. *Journal of Ethnopharmacology* 2007, vol. 112(2), s. 284–291.
- GURKAN, E., SARIOGLU, I., OKSOZ, S.: Cytotoxicity assay of some plants from Asteraceae. *Fitoterapia* 1998, vol. 69(1), s. 81–82.
- HA, T. J., JANG, D. S., LEE, J. R., LEE, K. D., LEE, J., HWANG, S. W., JUNG, H. J., NAM, S. H., PARK, K. H., YANG, M. S.: Cytotoxic effects of sesquiterpene lactones from the flowers of *Hemisteptia lyrata* B. *Archives of Pharmacal Research* 2003, vol. 26(11), s. 925–928.
- HÄNSEL, R., STICHER, O.: *Pharmakognosie – Phytopharmazie*, 7. vyd., Springer, Berlin 2004.
- HARMATHA, J., BUDESINSKY, M., VOKAC, K., PAVLIK, M., GRUNER, K., LAUDOVA, V.: Lignan glucosides and serotonin phenylpropanoids from the seeds of *Leuzea carthamoides*. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications* 2007, vol. 72(3), s. 334–336.
- HARNAFI, H., AMRANI, S.: Flavonoids as potent phytochemicals in cardiovascular diseases prevention. *Pharmacognosy Reviews* 2007, vol. 1(2), s. 193–202; *Chem. Abstr.* 2008, vol. 149, 214840.

- HASEGAWA, K., ZOKOKAWA, Y., UMISHIO, K., MAEDA, N.: Skin-lightening agents containing germacrane sesquiterpene lactones and cosmetics containing them. *Jpn Kokai Tokkyo Koho*, 2005, JP 2005002050 A 20050106; *Chem. Abstr.* 2005, vol. 142, 99995.
- HAUSEN, B. M., BREUER, J., WEGLEWSKI, J., RUECKER, G.:  $\alpha$ -Peroxyachifolid and other new sensitizing sesquiterpene lactone from yarrow (*Achillea millefolium* L., Compositae). *Contact Dermatitis* 1991, vol. 24(4), s. 274–280.
- HAUSEN, B. M., OSMUNDSEN, P. E.: Contact allergy to parthenolide in *Tanacetum parthenium* (L.) Schulz-Bip. (Feverfew, Asteraceae) and cross-reactions to related sesquiterpene lactones containing Compositae species. *Acta Dermato-Venerologica* 1983, vol. 63(4), s. 308–314.
- HAUSEN, B. M., SCHMALLE, H. W.: Structure-activity aspects of 4 allergenic sesquiterpene lactones lacking the exocyclic  $\alpha$ -methylene at the lactone ring. *Contact Dermatitis* 1985, vol. 13(5), s. 329–332.
- HEPTINSTALL, S., AWANG, D. V. C.: Feverfew: a review of its history, its biological and medicinal properties, and the status of commercial preparations of the herb. *ACS Symposium Series* 1998, 691(Phytomedicines of Europe), s. 158–175.
- HUANG, M.-F., LI, N., JIA, X.-G.: Progress in studies of *Rhaponticum carthamoides*. *Shenyang Yaoke Daxue Xuebao* 2008, vol. 25(7), s. 586–592; *Chem. Abstr.* 2008, 1014863.
- CHO, J. Y., BAIK, K. U., JUNG, J. H., PARK, M. H.: In vitro anti-inflammatory effects of cynaropicrin, a sesquiterpene lactone, from *Saussurea lappa*. *European Journal of Pharmacology* 2000, vol. 398(3), 399–407.
- CHO, J. Y., KIM, A. R., JUNG, J. H., CHUN, T., RHEE, M. H., YOO, E. S.: Cytotoxic and pro-apoptotic activities of cynaropicrin, a sesquiterpene lactone, on the viability of leukocyte cancer cell lines. *European Journal of Pharmacology* 2004, vol. 492(2–3), s. 85–94.
- CHOBOT, V., BUCHTA, V., JAHODÁŘOVÁ, H., POUR, M., OPLETAL, L., JAHODÁŘ, L., HARANT, P. Antifungal activity of a thiophene polyine from *Leuzea carthamoides*. *Fitoterapia* 2003, vol. 74(3), s. 288–290.

- CHRISTENSEN, L. P., JAKOBSEN, H. B., PAULSEN, E., HODAL, L., ANDERSEN, K. E.: Airborn Compositae dermatitis: Monoterpenes and no parthenolide are released from flowering *Tanacetum parthenium* (feverfew) plants. *Archives of Dermatological Research* 1999, vol. 291(7/8), s. 425–431.
- IDDAMALGODA, A., TANAKA, K., ITO, K., KOJIMA, H.: A new approach to anti-aging skin care: the importance of controlling mast cell tryptase and NF- $\kappa$ B activity during the skin aging process. *SOFW Journal* 2009, vol. 135(6), s. 32, 34–38; *Chem. Abstr.* 2009, vol. 151, 536388.
- ICHIKAWA, H., NAIR, M. S., TAKADA, Y., SHEEJA, D. B. A., KUMAR, M. A. S., OOMMEN, V., AGGARWAL, B. B.: Isodeoxyelephantopin, a Novel Sesquiterpene Lactone, Potentiates Apoptosis, Inhibits Invasion, and Abolishes Osteoclastogenesis through Suppression of Nuclear Factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) Activation and NF- $\kappa$ B-Regulated Gene Expression. *Clinical Cancer Research* 2006, vol. 12(19), s. 5910–5918.
- ISMAN, M., B.: Toxicity and tolerance of sesquiterpene lactones in the migratory grasshopper, *Melanoplus sanguinipes* (Acrididae). *Pesticide Biochemistry and Physiology* 1985, vol. 24(3), s. 348–354.
- ITOIGAWA, M., TAKEYA, K., FURUKAWA, H., ITO, K.: Mode of cardiotoxic action of helenalin, a sesquiterpene lactone, on guinea pig ventricular myocardium. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 1987, vol. 9(2), s. 193–201.
- JAHODÁŘ, L.: Rostlinné jedy, in.: HRDINA, V., HRDINA, R., JAHODÁŘ, L., MARTINEC, Z., MĚRKA, V.: *Přírodní toxiny a jedy*, kap. 4., s. 22–90, Galén-Karolinum, Praha 2004.
- JANG, D. S., KWON, B. M., YANG, M. S.: Biological activities of sesquiterpene lactones isolated from several Compositae plants. Part 2. FPTase inhibitory activity. *Saengyak Hakhoechi*, 1999, vol. 30(1), s. 70–73; *Chem. Abstr.* 1999, vol. 131, 223167.
- JANG, D. S., PARK, K. H., KIM, H. M., HONG, D. H., CHUN, H. K., KHO, Y. H., YANG, M. S.: Biological activities of sesquiterpene lactones isolated from several Compositae plants. Part 1. Cytotoxicity

- against cancer cell lines. *Saengyak Hakhoechi* 1998, vol. 29(3), s. 243–247; *Chem. Abstr.* 1998, vol. 130, 60720.
- JANG, D. S., PARK, K. H., KO, H. L., LEE, H. S., KWON, B. M., YANG, M. S.: Biological activities of sesquiterpene lactones isolated from several Compositae plants. Part 3. Inhibitory activity on nitric oxide release and ACAT. *Saengyak Hakhoechi* 1999, vol. 30(1), s. 74–78; *Chem. Abstr.* 1999, vol. 131, 223168.
- JANG, D. S., YANG, M. S., HA, T. J., PARK, K. H.: Hemistepsins with cytotoxic activity from *Hemisteptia lyrata*. *Planta Medica* 1999, vol. 65(8), s. 765–766.
- JAWAD, A. L. M., DHAHIR, A. B. J., HUSSAIN, A. M.: Preliminary studies on the antimicrobial activity of sesquiterpene lactones extracted from Iraqi Compositae. Part I. *Journal of Biological Sciences Research* 1985, vol. 16(1), s. 5–18.
- JEONG, S. J., ITOKAQA, T., SHIBUYA, M., KUWANO, M., ONO, M., HIGUCHI, R., MIYAMOTO, T.: Costunolide, a sesquiterpene lactones from *Saussurea lappa*, inhibits the VEGFR KDR/Flk-1 signaling pathway. *Cancer Letters (Shannon)* 2002, vol. 187(1–2), s. 129–133.
- JOVANOVIC, M., POLJACKI, M.: Compositae dermatitis. *Medicinski Pregled* 2003, vol. 56(1–2), s. 43–49.
- JUN, D.: Látky přírodního původu ovlivňující trombocytární agregaci u člověka (in vitro). *Doktorská disertační práce, Universita obrany Brno, Fakulta vojenského zdravotnictví v Hradci Králové*, 2005.
- KANASHIRO, A., KABEYA L. M., GRAEL, C. F. F., JORDAO, C. O., AZZOLINI, A. E. C. S., LOPES, J. L. C., LUCISANO-VALIM, Y. M.: Sesquiterpene lactones from *Lychnophora pohlii*: neutrophil chemiluminescence inhibition and free radical scavenger activity. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 2006, vol. 58(6), s. 853–858.
- KANG, K., LEE, H. J., KIM, CH. Y., LEE, S. B., TUNSAG, J., BATSUREN, D., NHO, CH. W.: The chemopreventive effects of *Saussurea salicifolia* through induction of apoptosis and phase II detoxification enzyme. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 2007, vol. 30(12), s. 2352–2359.

- KARIOTI, A., SKALTSA, H., LINDEN, A., PEROZZO, R., BRUN, R., TASDEMIR, D.: Anthecularin: A Novel Sesquiterpene Lactone from *Anthemis auriculata* with Antiprotozoal Activity. *Journal of Organic Chemistry* 2007, vol. 72(21), s. 8103–8106.
- KHALIL, A. T., SHEN, Y. CH., GUH, J. H., CHENG, S. Y.: Two new sesquiterpene lactones from *Ixeris chinensis*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 2005, vol. 53(1), s. 15–17.
- KHAN, S. B., AZHAR, U. H., PERVEEN, S., AFZA, N., MALIK, A., NAWAZ, S. A., SHAH, M. R., CHOUDHARY, M. I.: *Archives of Pharmacal Research* 2005, vol. 28(2), s. 172–176.
- KHUSHBAKTOVA, Z. A., YUSUPOVA, S. M., ZAMARAEVA, M. V., TADZHIBAEVA, E. T., SYROV, V. N., BATIROV, E. KH., YULDASHEV, M. P.: Structure-antioxidant activity relationships of some flavonoids from Central Asian plants. *Khimiya Prirodnikh Soedinenii* 1996(3), s. 350–356.
- KIM, M.-J., HAN, J.-M., JIN, Y.-Y., BAEK, N.-I., BANG, M.-H., CHUNG, H.-G., CHOI, M.-S., LEE, K.-T., SOK, D.-E., JEONG, T.-S.: In vitro antioxidant and anti-inflammatory activities of jaceosidin from *Artemisia princeps* Pampanini cv. Sajabal. *Archives of Pharmacal Research* 2008, vol. 31(4), s. 429–437.
- KIM, Y. S., KIM, J. S., PARK, S. H., CHOI S. U., LEE, CH. O., KIM, S. K., KIM, Y. K., KIM, S. H., RYU, S. Y.: Two cytotoxic sesquiterpene lactones from the leaves of *Xanthium strumarium* and their in vitro inhibitory activity on farnesyltransferase. *Planta Medica* 2003, vol. 69(4), s. 375–377.
- KOKOŠKA, L., JANOVSÁ, D.: Chemistry and pharmacology of *Rhaponticum carthamoides*: a review, *Phytochemistry* 2009, vol. 70(7), s. 842–855.
- KOLEČKÁŘ, V., BROJEROVÁ, E., KUBÍKOVÁ, K., OPLETAL, L.: Screening přírodních látek na antioxidační a trombocytárně antiagregační aktivitu. IGA UK č. 124/2005/B-BIO/FaF.
- KOLEČKÁŘ, V., BROJEROVÁ, E., ŘEHÁKOVÁ, Z., KUBÍKOVÁ, K., ČERVENKA, F., KUČA, K., JUN, D., HRONEK, M., OPLETALOVÁ, V., OPLETAL, L.: In vitro antiplatelet activity of flavonoids from *Leuzea carthamoides*. *Drug and Chemical Toxicology* 2008, vol. 31(1), s. 27–35.
- KOLEČKÁŘ, V., OPLETAL, L., BROJEROVÁ, E., ŘEHÁKOVÁ, Z., ČERVENKA, F., KUBÍKOVÁ, K., KUČA, K., JUN, D., POLÁŠEK, M., KUNEŠ, J., JAHODÁŘ, L.: Evaluation of natural antioxidants of *Leuzea*

- carthamoides as a result of a screening study of 88 plant extracts from the European Asteraceae and Cichoriaceae. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* 2008, 23(2), s. 218–224.
- KOUKOULITSA, C., SKALTSA, H., CRUCIANI, G. A. E., YALCIN, I.: Prediction of the pharmacokinetic properties of sesquiterpene lactones isolated from several Greek *Centaurea* sp., using the VolSurf procedure. *QSAR and Molecular Modelling in Rational Design of Bioactive Molecules, Proceedings of the European Symposium on Structure-Activity Relationships (QSAR) and Molecular Modelling, 15th, Istanbul, Sept. 5–10, 2004*, s. 117–118; *Chem. Abstr.* 2006, vol. 146, 287591.
- LAEKEMAN, G. M., DE CLERCK, F., HERMAN, A. G., TOTTE, J., VLIETINCK, A.: Vernolepin and platelet aggregation: further studies on the mechanism of action. *Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Therapie* 1982, vol. 260(2), 284–286.
- LAEKEMAN, G. M., MERTENS, J., TOTTE, J., BULT, H., VLIETINCK, A. J., HERMAN, A. G.: Isolation and pharmacological characterization of vernolepin. *Journal of Natural Products* 1983, vol. 46(2), s. 161–169.
- LANDAU, I., MUELLER-SCHARER, H., WARD, P., I.: Influence of cnicin, a sesquiterpene lactone of *Centaurea maculosa* (Asteraceae), on specialist and generalist insect herbivores. *Journal of Chemical Ecology* 1994, vol. 20(4), s. 929–942.
- LASTRA, A. L., RAMIREZ, T. O., SALAZAR, L., MARTINEZ, M., TRUJILLO-FERRARA, J.: The ambrosanolide cumenin inhibits macrophage nitric oxide synthesis: some structural considerations. *Journal of Ethnopharmacology* 2004, vol. 95(2–3), s. 221–227.
- LEE, J. S., MIN, B. S., LEE, S. M., NA, M. K., KWON, B. M., LEE, CH. O., KIM, Y. H., BAE, K. H.: Cytotoxic sesquiterpene lactones from *Carpesium abrotanoides*. *Planta Medica* 2002, vol. 68(8), s. 745–747.
- LEONARDUZZI, G., TESTA, G., SOTTERO, B., GAMBA, P., POLI, G.: Design and development of nanovehicle-based delivery systems for preventive or therapeutic supplementation with flavonoids. *Current Medicinal Chemistry* 2010, vol. 17(1), s. 74–95.
- LI, X., QIAN, P., LIU, Z., ZHAO, Y., XU, G., TAO, D., ZHAO, Q., SUN, H.: Sesquiterpenoids from *Cynara scolymus*. *Heterocycles* 2005, vol. 65(2), 287–291.

- LIN, F., HASEGAWA, M., KODAMA, O.: Purification and identification of antimicrobial sesquiterpene lactones from yacon (*Smallanthus sonchifolius*) leaves. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 2003, vol. 67(10), s. 2154–2159.
- LOSEVSKOI, V. P., LOSEVSKAYA, P. YA.: A herbal composition for the treatment of vascular diseases. RU 2199334 (2003); Chem. Abstr. 2004, 1109072.
- LUKASHINA, T. V., SOKOL'SKAYA, T. A., MINEEVA, M. F., KOLKHIR, V. K., KREPKOVA, L. V., GROMAKOVA, A. I., VAL, E. V., KALINICHENKO, K. Y., TOKHTABAEVA, G. M., ROGOV, A. V.: Drug stabinorm for treating chronic fatigue syndrome. RU 2390348 (2010); Chem. Abstr. 2010, 653844.
- LÜLLMAN, H., MOHR, K., FEHLING, M.: *Farmakologie a toxikologie*. 1.vyd., Grada Publishing, Praha 2002.
- LUNDH K., GRUVBERGER, B., MOELLER, H., PERSSON, L., HINSEN, M., ZIMMERSON, E., SVENSSON, A., BRUZE, M.: Patch testing with thin-layer chromatograms of chamomile tea in patients allergic to sesquiterpene lactones. *Contact Dermatitis* 2007, vol. 57(4), s. 218–223.
- LUNDH K., HINSEN, M., GRUVBERGER, B., MOELLER, H., SVENSSON, A., BRUZE, M.: Contact allergy to herbal teas derived from Asteraceae plants. *Contact dermatitis* 2006, vol. 54(4), s. 196–201.
- MACIAS, F. A., GALINDO, J. C. G., MOLINILLO, J. M. G., CASTELLANO, D.: Natural products as "allelochemicals". 10. Dehydrozaluzanin C: a potent plant growth regulator with potential use as a natural herbicide template. *Phytochemistry* 2000, vol. 54(2), s. 165–171.
- MARLES, R. J., KAMINSKI, J., ARNASON, J. T., PAZOS-SANO, L., HEPTINSTALL, S., FISHER, N. H., CROMPTON, C. W., KINDACK, D. G., AWANG, D. V. C.: A Bioassay for inhibition of serotonin release from bovine platelets. *Journal of Natural Products* 1992, vol. 55(8), s. 1044–1056.
- MARTIN, L. F., ROBINSON, A., MOORE, B. J.: Socioeconomic issues affecting the treatment of obesity in the new millenium. *PharmacoEconomics* 2000, vol. 18(4), s. 335–353.
- MARTÍNKOVÁ, J., CHROBÁK, L.: *Hemostáza a její ovlivnění farmaky*. 3. vyd., Univerzita Karlova v Praze, Praha 1990.

- MASAKI, O.: Food and drink, quasi drug and pharmaceutical composition for promoting hair growth, and method for promoting hair growth. PCT Int. Appl., 2008, WO 2008075466 A1 20080626; Chem. Abstr. 2008, vol. 149, 52772.
- MASLOV, L. N., GUZAROVA, N. V.: Cardioprotective and antiarrhythmic properties of preparations from *Leuzea carthamoides*, *Aralia mandshurica*, and *Eleutherococcus senticosus*. Eksperimental'naya i Klinicheskaya Farmakologiya 2007, vol. 70, s. 48–54; Chem. Abstr. 2008, 191315.
- MAZED, M. A., MAZED, S.: Nutritional supplement for the prevention of cardiovascular disease, Alzheimer's disease, diabetes, and regulation and reduction of blood sugar and insulin resistance. US 20100021533; Chem. Abstr. 2010, vol. 152, 200066.
- MERFORT, I.: Inflammation inhibiting substances from nature. Bioforum 2002, vol. 25(3), s. 138–140.
- MILIAUSKAS, G., VAN BEEK, T. A., DE WAARD, P., VENSKUTONIS, R. P., SUDHOOLTER, E. J. R.: Identification of Radical Scavenging Compounds in *Rhaponticum carthamoides* by Means of LC-DAD-SPE-NMR. Journal of Natural Products 2005, vol. 68, s. 168–172.
- MOSCATELLI, V., HNATYSZYN, O., ACEVEDO, C., MEGIAS, J., ALCARAZ, M. J., FERRARO, G.: Flavonoids from *Artemisia copa* with anti-inflammatory activity. Planta Medica 2006, vol. 72(1), s. 72–74.
- MUHAMMAD, I., TAKAMATSU, S., MOSSA, J. S., EL-FERALY, F. S., WALKER, L. A., CLARK, A. M.: Cytotoxic sesquiterpene lactones from *Centaurothamnus maximus* and *Vicoa pentanem*. Phytotherapy Research 2003, vol. 17(2), s. 168–173.
- MULVIHILL, E. E., HUFF, M. W.: Antiatherogenic properties of flavonoids: implications for cardiovascular health. The Canadian Journal of Cardiology 2010, vol. 26 Suppl A, s. 17A–21A.
- MUNGARULIRE, J.: A phytochemical investigation of medicinal plants of the Compositae from Rwanda. Herba Hungarica 1990, vol. 29(3), s. 73–78.
- MURRAY, R., K.: Harperova Biochemie, H & H, Praha 2002.



- NAWROT, J., BLOSZYK, E., GRABARCZYK, H., DROZDZ, B., DANIEWSKI, W. M., HOLUB, M.: Sesquiterpene lactones. Part 28. Further evaluation of feeding deterrence of sesquiterpene lactones to storage pests. *Prace Naukowe Instytutu Ochrony Roślin* 1983, vol. 25(1), s. 91–98.
- NAWROT, J., BLOSZYK, E., HARMATHY, J., NOVOTNÝ, L., DROZDZ, B.: Action of antifeedants of plant origin on beetles infesting stored products. *Acta Entomologica Bohemoslovaca* 1986, vol. 83(5), s. 327–335.
- NDOM, J. C., MBAFOR, J. T., WANSI, J. D., KAMDEM, A. W., MEVAA, L. M., VARDAMIDES, J. C., TOUKAM, F., PEGYEMB, D., NGANDO, T. M., LAATSCH, H.: Sesquiterpene lactones from *Crepis cameroonica* (Asteraceae). *Natural Product Research, Part A: Structure and Synthesis* 2006, vol. 20(5), s. 435–442.
- NIKAIDO, T., OHMOTO, T., SANKAWA, U., TOMIMORI, T., MIYAICHI, Y., IMOTO, Y.: Inhibitors of cAMP phosphodiesterase in medicinal plants. Part XIII. Inhibition of adenosine 3',5'-cyclic monophosphate phosphodiesterase by flavonoids. II. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* (1988), 36(2), 654–61.
- NIKOLAEV, S. M., PAR'EVA, K. V., IVANOVA, I. K., SHANTANOVA, L. N., NIKOLAEVA, I. G., NIKOLAEVA, G. G.: Method for preparing preparation with adaptogen activity. RU 2259840 (2005); *Chem. Abstr.* 2005, 987842.
- NOWAK, G., HOLUB, M., BUDESINSKY, M.: Sesquiterpene lactones. XXXIV. Guaianolides in the genus *Leuzea* DC.. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 1988, vol. 57(1), 157–163.
- NYRKOVA, L. E.: A herbal preparation containing antioxidant component derived from plants. RU 2155062 (2000); *Chem. Abstr.* 2009, 1366922.
- OCZELIK, B., GURBUZ, I., KARAOGLU, T., YESILADA, E.: Antiviral and antimicrobial activities of three sesquiterpene lactones from *Centaurea solstitialis* L. ssp. *Solstitialis*. *Microbiological Research* 2009, vol. 164(5), s. 545–552.

- OKAMOTO, H., TANAKA, K., KOJIMA, H.: NF- $\kappa$ B activation inhibitors containing cynaropicrin derivatives, and cosmetics and pharmaceuticals containing the same. JP 2006206532 (2006); Chem. Abstr. 2006, vol. 145, 217784.
- OLALDE, R., JOSE, A.: Synergistic phytoceutical compositions for treatment of circulatory disorders, feminine endocrine disorders, and dermal disorders. US 20070104728 (2007); Chem. Abstr. 2007, 511859.
- OLALDE, R., JOSE, A.: Cardiac phyto-nutraceutical synergistic composition. US 20080267938 (2008); Chem. Abstr. 2008, vol. 149, 478807.
- OMAR, A., DUPUY, L., MURILLO, R., JOSE, A., BONILLA, V.: Millerenolide induces suppressive activity on human peripheral blood mononuclear cells. Revista Medica de Chile 2008, vol. 136(1), s. 64–72; Chem. Abstr. 2008, vol. 151, 48804.
- ONO, M., ODA, E., TANAKA, T., IIDA, Y., YAMASAKI, T., MASUOKA, CH., IKEDA, T., NOHARA, T.: DPPH radical-scavenging effect on some constituents from the aerial parts of *Lippia triphylla*. Journal of Natural Medicines 2008, vol. 62(1), s. 101–106.
- OPLETAL, L. (ed.): CADISO-PHYPO: Sborník přednášek konference CADISO 92: Kardiovaskulární onemocnění a stabilita organismu – fytoterapeutické aspekty, Hradec Králové 1992, Farmaceutická fakulta UK, Hradec Králové 1993.
- OPLETAL, L. (ed.): Sborník přednášek symposia CADISO 94: Kardiovaskulární onemocnění a stabilita organismu (fytotherapeutické aspekty) a pracovního dne NUTRIMENTA I: Potravní aditiva a jejich vztah k prevenci chorob kardiovaskulárního systému, Hradec Králové 1994, Farmaceutická fakulta UK, Hradec Králové 1995.
- OPLETAL, L. (ed.): Sborník přednášek symposia CADISO 98: Kardiovaskulární onemocnění a stabilita organismu (fytotherapeutické aspekty) a pracovního dne NUTRIMENTA II: Potravní aditiva a jejich vztah k prevenci chorob kardiovaskulárního systému, Hradec Králové 1998, Farmaceutická fakulta UK, Hradec Králové 1998.

- OPLETAL, L., ČEŘOVSKÝ, J., DVOŘÁK, J., HOFBAUER, J.: Studium možností využití parchy saflorové v živočišné výrobě, v potravinářství a ve farmacii. GAČR 507/94/0584.
- OPLETAL, L., OPLETALOVÁ, V.: Adaptogeny rostlinného původu. Pokroky ve farmacii č. 10, Avicenum, Praha 1990.
- OPLETAL, L., SOVOVÁ, M., DITTRICH, M., SOLICH, P., DVOŘÁK, J., KRÁTKÝ, F., ČEŘOVSKÝ, J., HOFBAUER, J.: Fytoterapeutické aspekty onemocnění oběhového systému. 6. *Leuzea carthamoides* (Willd.) DC.: Stav výzkumu a možnosti využití taxonu. Česká a Slovenská Farmacie 1997, vol. 46(6), s. 247–255.
- OPLETAL, L.: Osobní sdělení (2005).
- OSTERTAG, L. M., O'KENNEDY, N., KROON, P. A., DUTHIE, G. G., DE ROOS, B.: Impact of dietary polyphenols on human platelet function—a critical review of controlled dietary intervention studies. *Molecular Nutrition & Food Research* 2010, vol. 54(1), s. 60–81.
- PANDEY, S., PATEL, K.: Phytosomes: technical revolution in phytomedicine. *International Journal of PharmTech Research* 2010, vol. 2(1), s. 627–631.
- PARK, J. CH. L., HUR, J. M., PARK, J. G., KIM, S. CH., PARK, J. R., CHOI, S. H., CHOI, J. W.: Effects of methanol extract of *Cirsium japonicum* var. *ussuriense* and its principle, hispidulin-7-O-neohesperidoside on hepatic alcohol-metabolizing enzymes and lipid peroxidation in ethanol-treated rats. *Phytotherapy Research* 2004, vol. 18(1), 19–24.
- PAULSEN, E., ANDERSEN, K. E., HAUSEN, B. M.: Sensitization and cross-reaction patterns in Danish Composite-allergic patients. *Contact Dermatitis* 2001, vol. 45(4), s. 197–204.
- PAULSEN, E., ANDERSEN, K., BRANDAO, F. M., BRUYNZEEL, D. P., DUCOMBS, G., FROSCH, P. J., GOSENS, A., LAHTI, A., MENNE, T., SHAW, T.: Routine patch testing with the sesquiterpene lactone mix in Europe: a 2-year experience: a multicenter study of the EEC DRG. *Contact Dermatitis* 1999, vol. 40(2), s. 72–76.
- PAULSEN, E., CHRISTENSEN, L. P., ANDERSEN, K. E.: Compositae dermatitis from airborne parthenolide. *British Journal of Dermatology* 2007, vol. 156(3), s. 510–515.

- PERRY, I. J.: Dietary salt intake and cerebrovascular damage. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases* 2000, vol. 10(4), s. 229–235.
- PICMAN, A., K.: Effect of isosalantolactone on germination of selected weeds and crop plants. *Phytoprotection* 1988, vol. 69(2), s. 65–71.
- PILAT, T. L.: A bioactive additive. RU 2207148 (2003); Chem. Abstr. 2004, 1109932.
- PLÁTENÍK, J.: Volné radikály, antioxidanty a stárnutí. *Interní Medicína* 2009, vol. 11(1), s. 30–33.
- PLOTNIKOV, M. B., ALIEV, O. I., VASIL'EV, A. S., MASLOV, M. YU., KRASNOV, E. A.: Agent having blood rheology activity, and its preparation method. RU 2191027 (2002); Chem. Abstr. 2004, 1108022.
- PLOTNIKOV, M. B., LOGVINOV, S. V., PUGACHENKO, N. V., MASLOV, M. YU., ALIEV, O. I., VASIL'EV, A. S., SUSLOV, N. I., POTAPOV, A. V.: Cerebroprotector activity of *Rhaponticum carthamoides* extract in rats with brain ischemia. *Eksperimental'naya i Klinicheskaya Farmakologiya* 2005, vol. 68(4), 19–23; Chem. Abstr. 2005, 1089069.
- PONOMAREVA, A. G., MEDVEDEV, V. M.: A method for the treatment of alcoholism. RU 2146939 (2000); Chem. Abstr. 2004, 1096830.
- RAHIMI, R., GHIASI, S., AZIMI, H., FAKHARI, S., ABDOLLAHI, M.: A review of the herbal phosphodiesterase inhibitors, Future perspective of new drugs. *Cytokine+* (2010), 49(2), s. 123–129.
- RASHIDI, M.-R., NAZEMIYEH, H.: Inhibitory effects of flavonoids on molybdenum hydroxylases activity. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology* 2010, vol. 6(2), 133–152.
- RASULEV, B. F., ABDULLAEV, N. D., SYROV, V. N., LESZCZYNSKI, J.: A Quantitative Structure-Activity Relationship (QSAR) study of the antioxidant activity of flavonoids. *QSAR & Combinatorial Science* 2005, vol. 24(9), s. 1056–1065.
- RAVUSSIN, E., BOUCHARD, C.: Human genomics and obesity: finding appropriate drug targets. *European Journal of Pharmacology* 2000, vol. 410(2/3), s. 131–145.

- REIDER, N., KOMERICKI, P., HASEN, B. M., FRITSCH, P., ABERER, W.: The seamy side of natural medicines: contact sensitization to arnica (*Arnica montana* L.) and marigold (*Calendula officinalis* L.). *Contact dermatitis* 2001, vol. 45(5), s. 269–272.
- RIOS, J. L., BAS, E., RECIO, M. C.: Effects of natural products on contact dermatitis. *Current Medicinal Chemistry: Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents* 2005, vol. 4(1), s. 65–80.
- RO, D. K., PARADISE, E. M., QUELLET, M., FISHER, K. J., NEWMAN, K. L., NDUNGU, J. M., HO, K. A., EACHUS, R. A., HAM, T. S., KIRBY, J.: Production of the antimalarial drug precursor artemisinic acid in engineered yeast. *Nature* 2006, vol. 440(7086), s. 940–943.
- RODGERS, S., GLEN, R. C., BENDER, A.: Characterizing bitterness: Identification of key structural features and development of a classification model. *Journal of Chemical Information and Modeling* 2006, vol. 46(2), s. 569–576; *Chem. Abstr.* 2006, vol. 144, 252986.
- RODRIGUEZ, E.: Insect feeding deterrents from semiarid and arid land plants *ACS Symposium Series*, vol. 276, (Bioregulation of Pest Control), 1985, s. 447–453.
- ROZENBLAT, S., GROSSMAN, S., BERGMAN, M., GOTTLIEB, H., COHEN, Y., DOVRAT, S.: Induction of G2/M arrest and apoptosis by sesquiterpene lactones in human melanoma cell lines. *Biochemical Pharmacology* 2008, vol. 75(2), s. 369–382.
- ROZKOT, M., ČECHOVÁ, M., OPLETAL, L., SMOLA, J.: Stanovení biologických a manažerských parametrů pro vysokou úroveň užítkovosti prasat. *NAZV č. 71284/2007*.
- ROZKOT., M., ŘÍHA, J., OPLETAL, L.: Využití biologicky aktivních látek přírodního původu ke zvýšení účinnosti řízené reprodukce prasat. *NAZV 1G46085*.
- RYAKHOVSKAYA, T. V., SAPKO, O. A., MANADILOVA, A. M., USHBAEVA, G. G., BOKAEVA, S. S.: Polyphenols of sagebrush and biological activity of its phenolic komplex. *F.E.C.S. International Conference of Chemistry and Biotechnology of Biological Active Natural Products, [Proc.]*, 3rd 1987(4), 380–384.

- ŘEHÁKOVÁ, Z. Vyhledávání biologicky aktivních rostlinných sekundárních metabolitů: testy antioxidační a antiagregační aktivity. Doktorská disertační práce, Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hr. Králové, 2009.
- SABANERO, M., QUIJANO, L., RIOS, T., TREJO, R.: Encelin: a fungal growth inhibitor. *Planta Medica* 1995, vol. 61(2), s. 185–186.
- SAKAMOTO, Y., OHMOTO, T., NIKAIIDO, T., KOIKE, K., TOMIMORI, T., MIYAICHI, Y., SHIRATAKI, Y., MONACHE, F. D., BOTTA, B.: On the relationship between the chemical structure and the cyclic AMP phosphodiesterase inhibitory activity of flavonoids as studied by carbon-13 NMR. *Bulletin of the Chemical Society of Japan* 1989, vol. 62(8), 2450–2454; *Chem. Abstr.* 1990, vol. 112, 98250.
- SANG, Z. C., SANG, U. C., KANG, R. L.: Cytotoxic sesquiterpene lactones from *Saussurea calcicola*. *Archives of Pharmacal Research* 2005, vol. 28 (10), s. 1142–146.
- SCOTTI, L., SCOTTI, M. T., ISHIKI, H. M., FERREIRA, M. J. P., EMERENCIANO, V. P., MENEZES, C. M. DE S., FERREIRA, E. I.: Quantitative elucidation of the structure–bitterness relationship of cynaropicrin and grosheimin derivatives. *Food Chemistry* 2007, vol. 105(1), s. 77–83.
- SCHINELLA, G. R., GINER, R. M., DEL CARMEN RECIO, M., DE BUSCHIAZZO, P. M., RIOS, J. L., MANEZ, S.: Anti-inflammatory effects of South American *Tanacetum vulgare*. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 1998, vol. 50(9), s. 1069–1074.
- SCHINOR, E. C., SALVADOR, M. J., ITO, I. Y., DE ALBUQUERQUE, S., DIAS, D. A.: Trypanocidal and antimicrobial activities of *Moquinia kingii*. *Phytomedicine* 2004, vol. 11(2–3), s. 224–229.
- SCHMIDT, T., J.: Structure-activity relationships of sesquiterpene lactones. *Studies in Natural Products Chemistry (Bioactive Natural Products (Part M))*, 2006, vol. 33, s. 309–392.
- SCHNALL, P., BELKIC, K., LANDSBERGIS, P., BAKER, D.: Why the workplace and cardiovascular disease? *Occupational Medicine (Philadelphia)* 2000, vol. 15(1), s. 1–6.
- SCHORR, K., MERFORT, I., DA COSTA, F. B.: A novel dimeric melampolide and further terpenoids from *Smallanthus sonchifolius* (Asteraceae) and the inhibition of the transcription factor NF- $\kappa$ B. *Natural Product Communications* 2007, vol. 2(4), s. 367–374.

- SCHROEDER, H., LOESCHE, W., STROBACH, H., LEVEN, W., WILLUHN, G., TILL, U., SCHROER, K.: Helenalin and 11 $\alpha$ ,13-dihydrohelenalin, two constituents from *Arnica montana* L., inhibit human platelet function via thiol-dependent pathways. *Thrombosis Research* 1990, vol. 57(6), 839–845.
- SCHWANITZ, H. J., DREIER, M., EICHELBERG, D.: Aero-genic contact dermatitis. *Zeitschrift fuer Hautkrankheiten* 1988, vol. 63(4), s. 70–72.
- SCHWELA, D.: Air pollution and health in urban areas. *Reviews on environmental health* 2000, vol. 15(1–2), s. 13–42.
- SIEDLE, B., GUSTAVSSON, L., JOHANSSON, S., MURILLO, R., CASTRO, V., BOHLIN, L., MERFORT, I.: The effect of sesquiterpene lactones on the release of human neutrophil elastase. *Biochemical Pharmacology* 2003, vol. 65(5), s. 897–903.
- SILBERNAGL, S., DESPOPOULOS, A.: *Atlas fyziologie člověka*. 2. vyd., Grada-Avicenum, Praha 1993.
- SIMONNET, X., QUENNOZ, M., CARLEN, C. New *Artemisia annua* hybrids with high artemisinin kontent. *Acta Horticulturae*, (Proceedings of the International Symposium on Asia Plants with Unique Horticultural Potential, 2006), 2008, vol. 769, s. 371–373.
- SINGH, P., BHALA, M.: Guaianolides from *Saussurea candicans*. *Phytochemistry* 1988, vol. 27(4), s. 1203–1205.
- SLACANIN, I., VARGAS, D., MARSTON, A., HOSTETTMANN, K.: Determination of molluscicidal sesquiterpene lactones from *Ambrosia maritima* (Compositae). *Journal of Chromatography* 1988, vol. 457, s. 325–331.
- SLEPYSHEVA, I. A.: A preparation for improving immunity and work capacity. RU 2163137 (2001), *Chem. Abstr.* 2009, 1467748.
- SOVOVÁ, H., OPLETAL, L.: Superkritická extrakce rostlinných materiálů využitelných při léčbě a prevenci nemocí srdce a cév. GAČR 203/01/0550.
- SOVOVÁ, M., JAHODÁŘ, L., OPLETAL, L., PIRNER, J., MUŽÍK, M., SVOBODOVÁ, D.: Studium rostlin se zaměřením na nescifickou odolnost organismu. IGA UK, č. 279/1994.

- SOVOVÁ H., OPLETAL L., SAJFRTOVÁ M., BÁRTLOVÁ M.: Supercritical fluid extraction of cynaropicrin and 20-hydroxyecdysone from *Leuzea carthamoides* DC. *Journal of Separation Science* 2008, vol. 31, s. 1387–1392.
- STARYKH, V. V., KONOVALOV, D., A.: Phytotoxic activity of some sesquiterpene lactones isolated from species of Asteraceae. *Rastitel'nye Resursy* 1997, vol. 33(4), s. 17–27.
- STEFANI, R., SCHORR, K., TURETA, J. M., VICHNEWSKI, W., MERFORT, I., DA COSTA, F. B.: Sesquiterpene lactones from *Dimerostemma* species (Asteraceae) and in vitro potential anti-inflammatory activities. *Zeitschrift fuer Naturforschung, C: Journal of Biosciences* 2006, vol. 61(9/10), s. 647–652.
- STEFANOVIC, M., MLADENOVIC, S., DERMANOVIC, M., RISTIC, N.: Sesquiterpene lactones from the domestic plant species *Tanacetum parthenium* L. (Compositae). *Journal of the Serbian Chemical Society* 1985, vol. 50(9–10), s. 435–441.
- STEFANOVIC, M., RISTIC, N., VUKMIROVIC, M.: Biological activities of sesquiterpene lactones. Investigations of microbial activities of lactones isolated from the Yugoslav plant species of the genus *Tanacetum* L. [*Chrysanthemum* (fam. Compositae)]. *Bulletin – Academie Serbe des Sciences et des Arts, Classe des Sciences Mathematiques et Naturelles: Sciences Naturelles*, 1988, vol. 28, s. 23–40; *Chem. Abstr.* 1990, vol. 112, 52162.
- STINGENI, L., AGEA, E., LISI, P., SPINOZZI, F.: T-lymphocyte cytokine profiles in compositae airborne dermatitis. *The British Journal of Dermatology* 1999, vol. 141(4), s. 689–693.
- SU, T.-L., LIN, F.-W., TENG, CH.-M., CHEN, K.-T., WU, T.-S.: Antiplatelet aggregation principles from the stem and root bark of *Melicope triphylla*. *Phytotherapy Research* 1998, 12(Suppl. 1, Second International Symposium on Natural Drugs, 1997), S74–S76.
- SUCHOPÁR, J. (ed.): *Remedia compendium*. 2. vyd., Panax, Praha 1997.
- SUCHOPÁR, J. (ed.): *Remedia compendium*. 3. vyd., Panax, Praha 1999.
- SULSEN, V. P., FRANK, F. M., CAZORLA S. I., ANESINI, C. A., MALCHIODI, E. L., FREIXA, B., VILA, R., MUSCHIETTI, L. V., MARTINO, V. S.: Trypanocidal and leishmanicidal activities of sesquiterpene



- lactones from *Ambrosia tenuifolia* Sprengel (Asteraceae). *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2008, vol. 52(7), s. 2415–2419.
- ŠTÍPEK, S.: *Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a nemoci*. Grada, Praha 2000.
- TAN, R. X., JAKUPOVIC, J., JIA, Z. J.: Aromatic constituents from *Vladimiria souliei*. *Planta Medica* 1990, vol. 56, 475–477.
- THASTRUP, O., LINNEBJERG, H., BJERRUM, P., J., KNUDSEN, J., B., CHRISTENSEN, S., B.: The inflammatory and tumor-promoting sesquiterpene lactone, thapsigargin, activates platelets by selective mobilization of calcium as shown by protein phosphorylations. *Biochim Biophys Acta* 1987 vol. 927(1), s. 65-73.
- TORNHAMRE, S., SCHMIDT, T. J., NASMAN-GLASER, B., ERICSSON, I., LINDGREN, J. A.: Inhibitory effects of helenalin and related compounds on 5-lipoxygenase and leukotriene C(4) synthase in human blood cells. *Biochemical Pharmacology* 2001, vol. 62(7), 903–911.
- TROJAN, S., HRACHOVINA, V., MAREŠOVÁ, D., ŠLAPETOVÁ, V., TRÁVNÍČKOVÁ, E.: *Nárys fyziologie člověka – sešit 1 B., 1. vyd., Karolinum, Praha 1994.*
- TSUBOI, M.: Good health-care effect of Biobenefit F. *Food Style* 21 2007, vol. 11(6), s. 54–56; *Chem. Abstr.* 2007, vol. 148, 214055.
- VAN CALSTEREN, M., R., JANKOWSKI, CH. K., REYES-CHILPA, R., JIMENEZ-ESTRADA, M., CAMPOS, M. G., ZARAZUA-LOZADA, A., OROPEZA, M., LESAGE, D.: X-ray and high-resolution <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR of smooth muscle relaxant sesquiterpene lactones. *Canadian Journal of Chemistry* 2008, vol. 86(12), s. 1077–1084.
- VAN KLINK, J., BECKER, H., ANDERSSON, S., BOLAND, W.: Biosynthesis of anthecotuloide, an irregular sesquiterpene lactone from *Anthemis cotula* L. (Asteraceae) via a non-farnesyl diphosphate route. *Organic & Biomolecular Chemistry* 2003, vol. 1(9), s. 1503–1508.
- VONGVANICH, N., KITTA KOOP, P., CHAROENCHAI, P., INTAMAS, S., SRIKLUNG, K., THEBTARANONTH, Y.: Antiplasmodial, antimycobacterial, and cytotoxic principles from *Camchaya calcarea*. *Planta Medica* 2006, vol. 72(15), s. 1427–1430.

- WAGNER, S., ARCE, R., MURILLO, R., TERFLOTH, L., GASTEIGER, J., MERFORT, I.: Neural Networks as Valuable Tools To Differentiate between Sesquiterpene lactones Inhibitory Activity on Serotonin Release and on NF- $\kappa$ B. *Journal of Medicinal Chemistry* 2008, vol. 51(5), s. 1324–1332.
- WANG, H., WU, T., YAN, M., LIU, G., LI, P., ZHANG, X., Q., YE, W., C., ZHANG, L., Y.: Sesquiterpenes from *Ainsliaea fragrans* and their inhibitory activities against cyclooxygenases-1 and 2. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 2009, vol. 57(6), s. 597–599.
- WILLIAMSON, E. M., OKPAKO, D. T., EVANS, F. J.: Selection, Preparation and Pharmacological Evaluation of Plant Material vol. 1, John Wiley & Sons, 1996.
- WILLUHN, G.: Arnica flowers: Pharmacology, toxicology and analytics of the sesquiterpene lactones as their main active substances. Book of Abstracts, 212th ACS National Meeting, Orlando, FL, August 25–29 (1996), AGFD–104.
- WISDOM, CH. S., SMILEY, J. T., RODRIGUEZ, E.: Toxicity and deterrence of sesquiterpene lactones and chromenes to the corn earworm (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Economic Entomology* 1983, vol. 76(5), s. 993–998.
- WOERDENBAG, H. J., MERFORT, I., PASSREITER, C. M., SCHMIDT, T. J., WILLUHN, G., VAN UDEN, W., PRAS, N., KAMPINGA, H. H., KONINGS, A. W. T.: Cytotoxicity of flavonoids and sesquiterpene lactones from Arnica species against the GLC4 and the COLO 320 cell lines. *Planta Medica* 1994, vol. 60(5), 434–437.
- WU, F.-H., LIANG, J.-Y., CHEN, R., WANG, Q.-Z., LI, W.-G.: Chemical constituents and hepatoprotective activity of *Plantago depressa*. *Zhongguo Tianran Yaowu* 2006, vol. 4(6), s. 435–439; *Chem. Abstr.* 2007, vol. 147, 113794.
- WU, T.-S., KAO, M.-S., WU, P.-L., LIN, F.-W., SHI, L.-S., TENG, CH.-M.: Antiplatelet principles from the root of *Petasites formosanus*. *Phytochemistry* 1999, vol. 52(5), s. 901–905.
- YAMAMOTOVÁ, A., POMETLOVÁ, M., HARMATHA, J., RAŠKOVÁ, H., ROKYTA, R.: The selective effect of N-feruloylserotonins isolated from *Leuzea carthamoides* on nociception and anxiety in rats. *Journal of Ethnopharmacology* 2007, vol. 112(2), s. 368–374.

- YIN, H. Q., HUA, H. M., FU, H. W., QI, X. L., LI, W., SHA, Y., PEI, Y. H.: A new sesquiterpene lactones with sulfonic acid group from *Saussurea lappa*. *Journal of Asian Natural Products Research* 2007, vol. 9(6–8), s. 579–582.
- YOKOYAMA, K., MATSUGAMI, M., KOISO, I., KATAGIRI, T., OONUKE, K.: Topical preparations from plant extracts containing sesquiterpene lactones. *Kokai Tokkyo Koho*, 1993, JP 05306231 A 19931119; *Chem. Abstr.* 1994, vol. 120, 200171.
- YOSHIKAWA, M.: Search for biofunctional molecules from medicinal fous. *Kagaku Kogyo* 2006, vol. 57(10), s. 740–745; *Chem. Abstr.* 2006, vol. 146, 499926.
- YU, J., LIU, H., LEI, J., TAN, W., HU, X., ZOU, G.: Antitumor activity of chloroform fraction of *Scutellaria barbata* and its active constituents. *Phytotherapy Research* 2007, vol. 21(9), s. 817–822.
- ZHANG, Y., LIU, M., LING, T., WEI, X.: Allelopathic Sesquiterpene Lactone from *Wedelia trilobita*. *Redai Yaredai Zhiwu Xuebao* 2004, vol. 12(6), s. 533–537; *Chem. Abstr.* 2004, vol. 143, 282559.
- ZIDORN, CH., STUPPNER, H., TIEFENTHALER, M., KONWALINKA, G.: Cytotoxic Activities of Hypocretenolides from *Leontodon hispidus*. *Journal of Natural Products* 1999, vol. 62(7), s. 984–987.
- ZONG, Y., YU, M., HUANG, L., CHANG, Y., WANG, Y., CHE, CH.-T.: Studies of Tibetan medicinal plants. II. Antitumor activity of *Saussurea eopygmaea*. *International Journal of Pharmacognosy* 1994, vol. 32(3), 284–293.

### 13. SEZNAM AUTORSKÝCH A SPOLUAUTORSKÝCH PRACÍ

#### Původní práce

KOLEČKÁŘ, V., OPLETAL, L., BROJEROVÁ, E., ŘEHÁKOVÁ, Z., ČERVENKA, F., KUBÍKOVÁ, K., KUČA, K., JUN, D., POLÁŠEK, M., KUNEŠ, J., JAHODÁŘ, L.: Evaluation of natural antioxidants of *Leuzea carthamoides* as a result of a screening study of 88 plant extracts from the European Asteraceae and Cichoriaceae. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* 2008, vol. 23(2), s. 218–24. (IF = 1,421).

KOLEČKÁŘ, V., BROJEROVÁ, E., ŘEHÁKOVÁ, Z., KUBÍKOVÁ, K., ČERVENKA, F., KUČA, K., JUN, D., HRONEK, M., OPLETALOVA, V., OPLETAL, L.: In vitro antiplatelet activity of flavonoids from *Leuzea carthamoides*. *Drug Chemical Toxicology* 2008, vol. 31(1), s. 27–35. (IF = 1,409).

KOLEČKÁŘ, V., BROJEROVÁ, E., OPLETAL, L., JUN, D., KUČA, K. Antioxidanty, volné radikály, mechanismus působení a využití při terapii yperitem navozených poškození. *Česká a Slovenská Farmacie* 2007, vol. 56(2), s. 73–76. (IF = 0).

JAMPÍLEK, J., BROJEROVÁ, E., DOLEŽAL, M., KUNEŠ, J., JUN, D.: Preparation and antiplatelet activity of glycidic acid derivatives. *Chemical Papers* 2008, vol. 62(3), s. 281–287.

#### Původní práce odeslané do tisku:

BROJEROVA, E., OPLETAL, L., KOLECKAR, V., JUN, D., REHAKOVA, Z., KUBIKOVA, K., HRONEK, M., DOHNAL, V., KUNES, J., JAHODAR, L., KUČA, K.: Antiplatelet Activity of Some Sesquiterpene Lactones and Flavonoids from Aerial Parts of *Leuzea carthamoides* (Willd.) DC.. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* 2010.

KOLEČKÁŘ, V., OPLETAL, L., MACÁKOVÁ, K., ŘEHÁKOVÁ, Z., BROJEROVÁ, E., KUČA, K., JUN, D., JAHODÁŘ, L. Proanthocyanidiny a jejich antioxidační aktivita, *Chem. Listy* 2010.

Plakátová sdělení (souhrny)

BROJEROVÁ, E., KOLEČKÁŘ, V., JUN, D., OPLETAL, L., JAHODÁŘ, L. Antiplatelet activity of plants of the families Asteroideae and Cichorioideae, Abstr. Pap. of the 1<sup>st</sup> International mediterranean Pharmacy Congress, October 28–31, 2005 Mersin (Turkey). *Journal of Science and Technology*, 2005, vol. 1, s. 124.

KOLEČKÁŘ, V., OPLETAL, L., BROJEROVÁ, E., POLÁŠEK, M., JAHODÁŘ, L., JUN, D., *Leuzea carthamoides* as a prospective antioxidation active taxon of family Asteroideae. Abstr. Pap. of the 1<sup>st</sup> International mediterranean Pharmacy Congress, October 28–31, 2005 Mersin (Turkey). *Journal of Science and Technology*, 2005, vol. 1, s. 124.

KOLEČKÁŘ, V., BROJEROVÁ, E., JUN, D., OPLETAL, L., JAHODÁŘ, L., POLÁŠEK, M., HRONEK, M. Antioxidační a trombocytárně antiagregační aktivita látek taxonu *Leuzea carthamoides*. *Sborník referátů 34. konference Syntéza a analýza léčiv*, 12.–14. září 2005, Brno, s. 79.

KOLEČKÁŘ, V., OPLETAL, L., BROJEROVÁ, E., POLÁŠEK, M., JAHODÁŘ, L., JUN, D. Antioxidační aktivita rostlin čeledí Asteroideae a Cichorioideae: screeningová studie využívající SIA a on-line HPLC metody. *Hradecký den léčivých rostlin, Hradec Králové, Česká a Slovenská Farmacie* 2005, vol. 54(5), s. 243.

ŘEHÁKOVÁ, Z., JAHODÁŘ, L., BROJEROVÁ, E., KOLEČKÁŘ, V., KARLÍČKOVÁ, J.: Antiagregační a antioxidační aktivita latexu získaného z *Croton lechleri* (Euphorbiaceae). *Hradecký den léčivých rostlin, Hradec Králové. Česká a Slovenská Farmacie* 2005, vol. 54(5), s. 243.

KOLEČKÁŘ, V., BROJEROVÁ, E., OPLETAL, L., ŘEHÁKOVÁ, Z., KUBÍKOVÁ, K., ČERVENKA, F., KUNEŠ, J., JUN, D., JAHODÁŘ, L., POLÁŠEK, M.: Antioxidative and antiaggregating flavonoids from *Leuzea carthamoides*. Book of Abstracts: DPhG Jahrestagung – Joint Meeting, October 4–7, 2006, Marburg, p. 104.

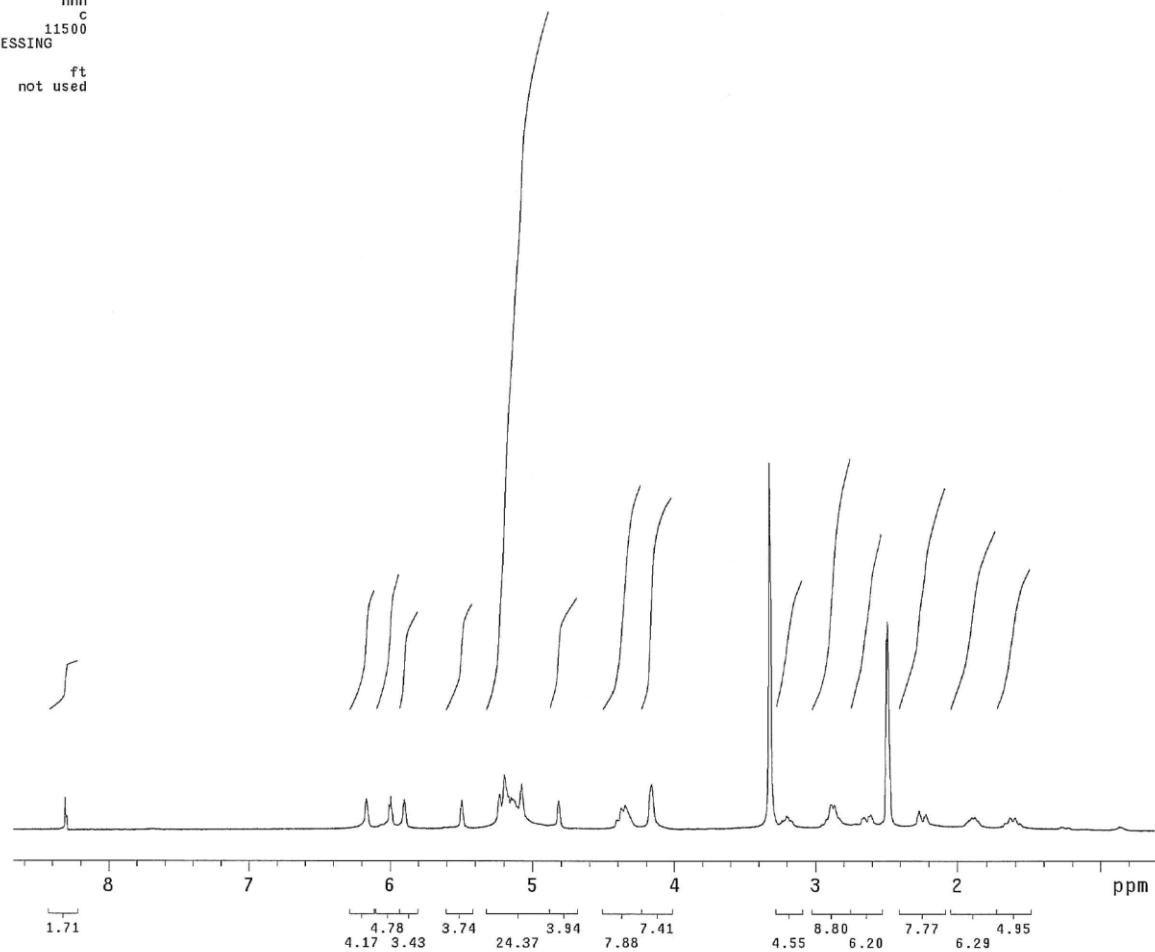
ČERVENKA, F., ŘEHÁKOVÁ, Z., BROJEROVÁ, E., KOLEČKÁŘ, V., VYTLAČILOVÁ, J., JAHODÁŘ, L. *Evolvulus alsinoides* – Phytochemical analysis. Book of Abstr.: DPhG Jahrestagung – Joint Meeting, October 4–7, 2006, Marburg, s. 106.

## 14. PŘÍLOHY

```

cynaropicrin
exp7 std1h
SAMPLE          DEC. & VT
date    Feb 16 2007  dfrq    300.076
solvent  DMSO      dn       H1
file    /export/home/~ dpwr    37
vnmr1/Dp1eta1/cyna~ dof     0
ropicrin_H.fid     dm       nnn
ACQUISITION      dmm       c
sfrq    300.076  dmf      11500
IN      H1
PROCESSING
at      1.998  wfile
np      17884  proc     ft
sw      4500.5  fn      not used
fb      2600
bs      16     werr
tpwr    54     wexp
pw      7.0    wbs
d1      5.000  wnt
tof     0
nt      16
ct      16
alock   n
gain    not used
FLAGS
il      n
in      n
dp      y
DISPLAY
sp      184.3
wp      2419.9
vs      61
sc      0
wc      200
hzmm    12.10
is      2437.50
rfl     1448.2
rfp     747.2
th      20
ins     100.000
nm      cdc  ph

```



Příl. 1 <sup>1</sup>H NMR spektrum LC-1 (cynaropikrin)

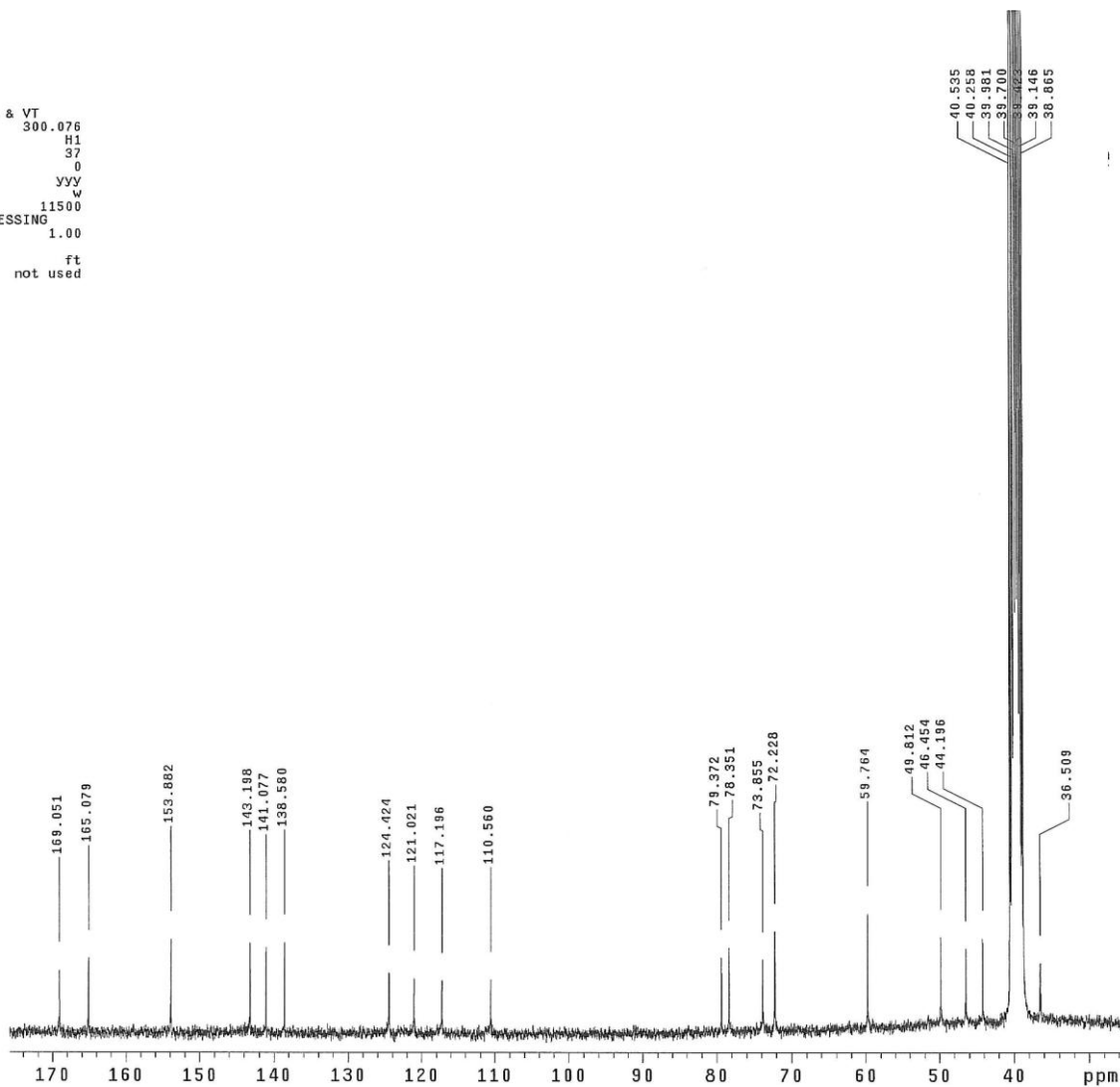


```

cynaropicrin
exp7 std13c

SAMPLE          DEC. & VT
date   Feb 16 2007  dfrq   300.076
solvent DMSO          dn     H1
file   /export/home/~ dpr    37
nmr1/0pletal/cyna~ dof     0
ropicrin_C.fid   dm     VVY
ACQUISITION      dmm     w
sfrq   75.461      dmf   11500
tn      C13        PROCESSING
at      1.815      lb     1.00
np      68106      wfile
sw      18761.7    proc   ft
fb      10400     fn     not used
bs      16
tpwr    50        werr
pw      16.2      wexp
d1      5.000     wbs
tof     0         wnt
nt      40000
ct      33616
alock   s
gain    not used
FLAGS
il      n
ln      n
dp      Y
DISPLAY
sp      1904.5
wp      11365.3
vs      1764
sc      0
wc      200
hzmm    56.83
is      500.00
rfl     4838.2
rfp     2995.5
th      s
lms     100.000
nm      no ph

```

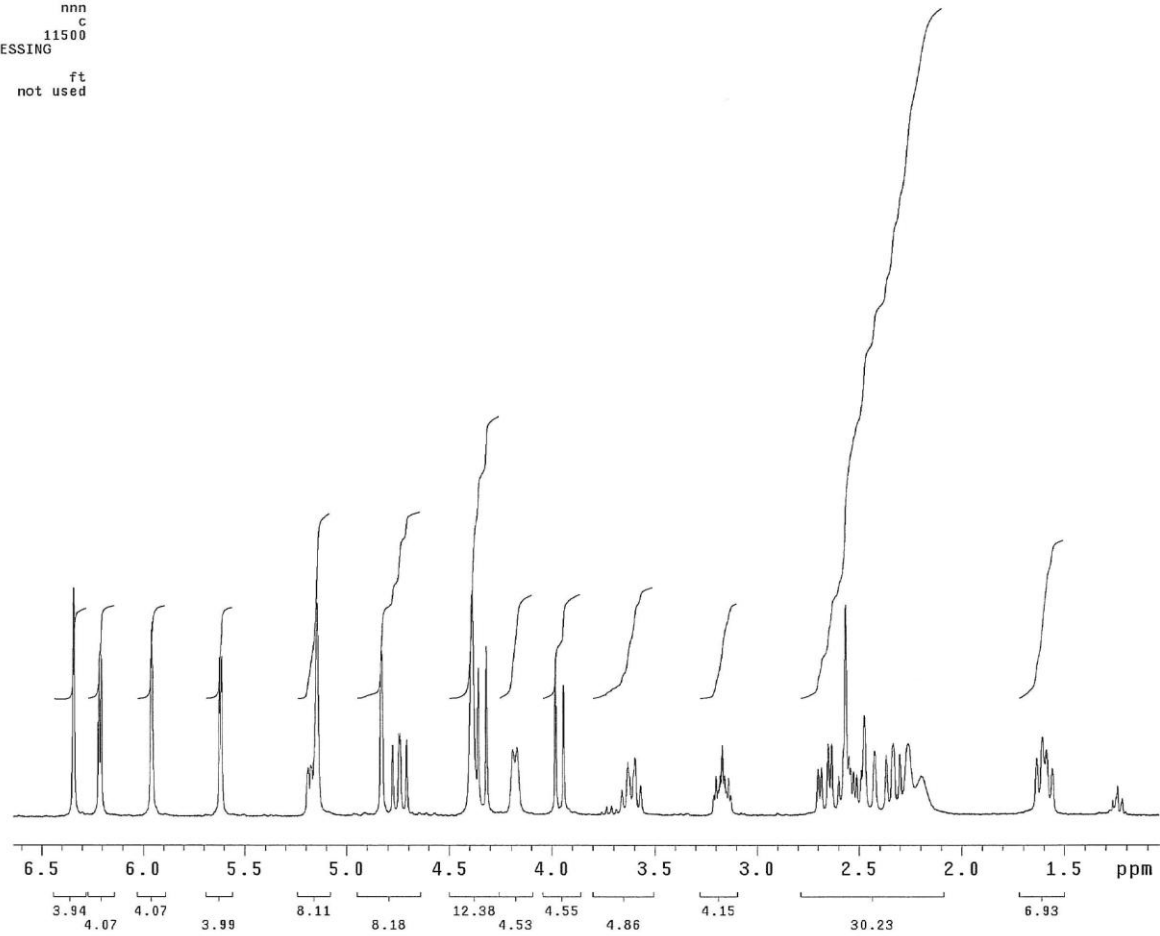


Příl. 2 <sup>13</sup>C NMR spektrum LC-1 (cynaropikrin)

```

chlorojanerin
exp7 std1h
SAMPLE          DEC. & VT
date Mar 8 2007 dfrq 300.074
solvent CDC13   dn      H1
file /export/home/~ dpwr 37
vnmr1/Op1eta1/Elis~ dof 0
kaBrojerova-II-VII~ dm   nnn
-H.fid          dmm   c
ACQUISITION    dmf 11500
sfrq 300.074    PROCESSING
tn      H1      wtfile
at      1.998   proc   ft
np      17984   fn     not used
sw      4500.5
fb      2600   werr
bs      16    wexp
tpwr    54    wbs
pw      7.0   wnt
d1      5.000
tof      0
nt      16
ct      16
alock   n
gain    not used
        FLAGS
il      n
in      n
dp      y
DISPLAY
sp      312.8
wp      1679.5
vs      64
sc      0
wc      200
hzmm    8.40
is      1475.09
rfl     2882.7
rfp     2178.5
th      20
ins     100.000
nm      cdc ph

```



Příl. 3 <sup>1</sup>H NMR spektrum LC-2 (chlorojanerin)

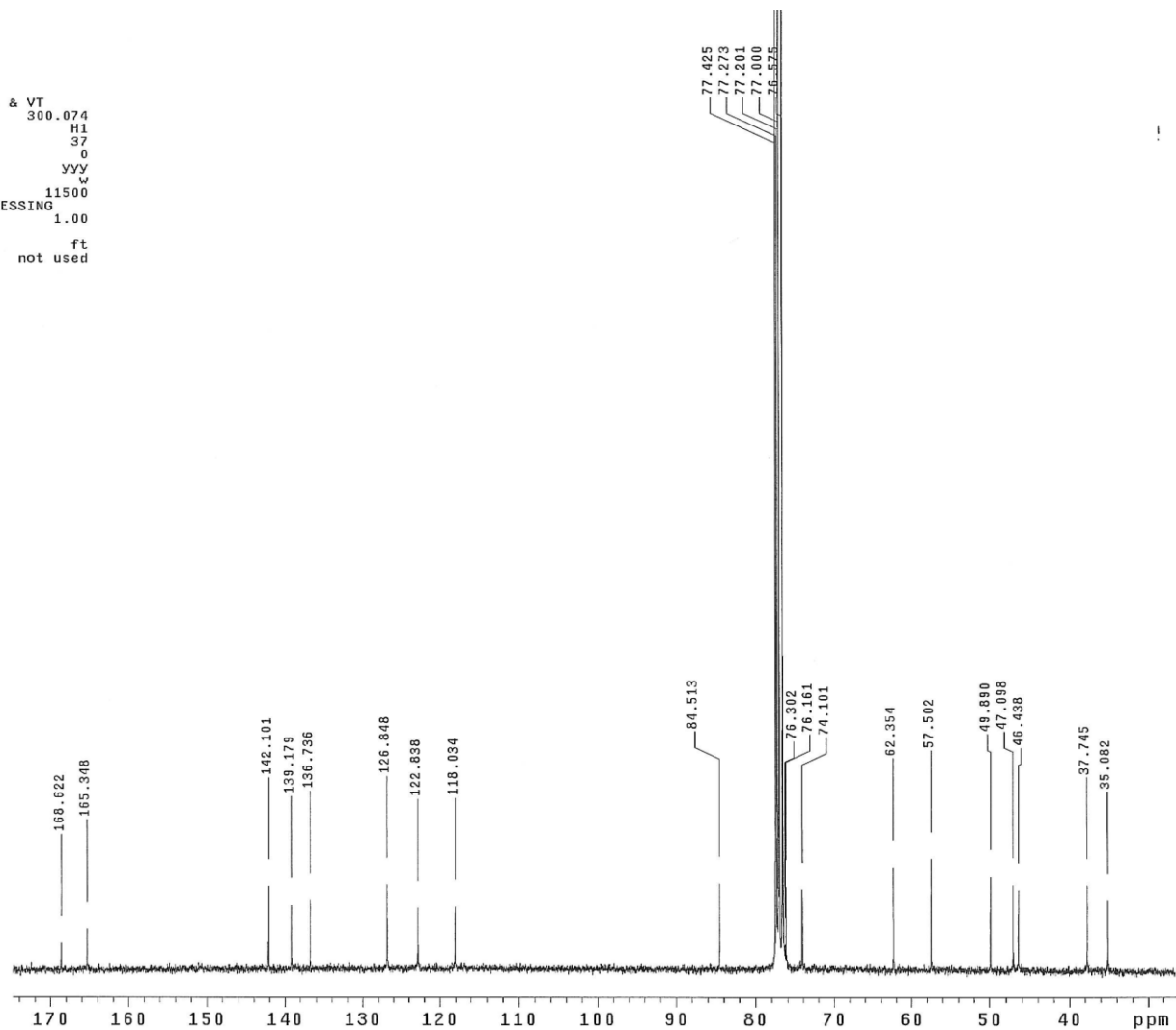
13C OBSERVE

exp7 std13c

```

SAMPLE          DEC. & VT
date Mar 8 2007 dfrq 300.074
solvent CDC13   dn      H1
file /export/home/~ dpwr 37
nmr1/Opletal/Elis~ dof 0
kaBrojerova-II-VII~ dm  yy
                  dmm  w
ACQUISITION     dmf 11500
sfrq 75.461     PROCESSING
tn    C13       lb 1.00
at    1.815     wtfile
np    68106     proc
sw    18761.7   fn  not used
fb    10400
bs    16        verr
tpwr  50        wexp
pw    16.2      wbs
d1    5.000     wnt
tof   0
nt    25000
ct    9152
alock s
gain  not used
      FLAGS
il    n
in    n
dp    y
      DISPLAY
sp    1996.3
wp    11182.9
vs    200
sc    0
wc    200
hzmm  55.86
is    500.00
rfl   7635.0
rfp   5809.9
th    3
ins   100.000
nm no ph

```

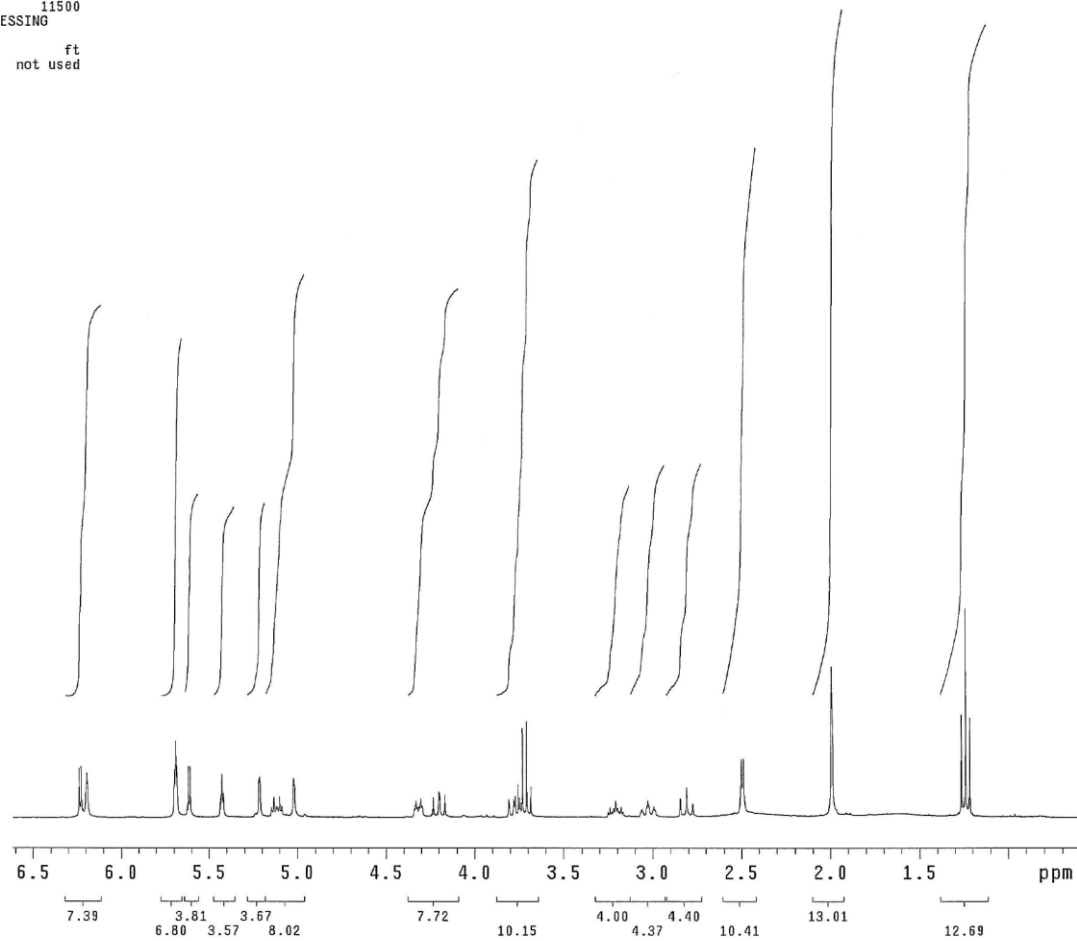


Příl. 4 <sup>13</sup>C NMR spektrum LC-2 (chlorojanerin)

```

repidolid
exp7 std1h
SAMPLE DEC. & VT
date Mar 7 2007 dfrq 300.074
solvent CDC13 dn H1
file /export/home/~ dpwr 37
vnmr1/Opletal/Elis~ dof 0
kaBrojerova-II-VII~ dm nnn
I_H.fid dmm c
ACQUISITION dmf 11500
sfrq 300.074 PROCESSING
tn H1 wtfile
at 1.998 proc ft
np 17984 fn not used
sw 4500.5
fb 2600 werr
bs 16 wexp
tpwr 54 wbs
pw 7.0 wnt
d1 5.000
tof 0
nt 16
ct 16
alock n
gain not used
FLAGS
il n
in n
dp y
DISPLAY
sp 182.3
wp 1803.7
vs 34
sc 0
wc 200
hzmm 9.02
is 3863.00
rf1 2883.3
rfp 2178.5
th 20
ins 100.000
nm cdc ph

```

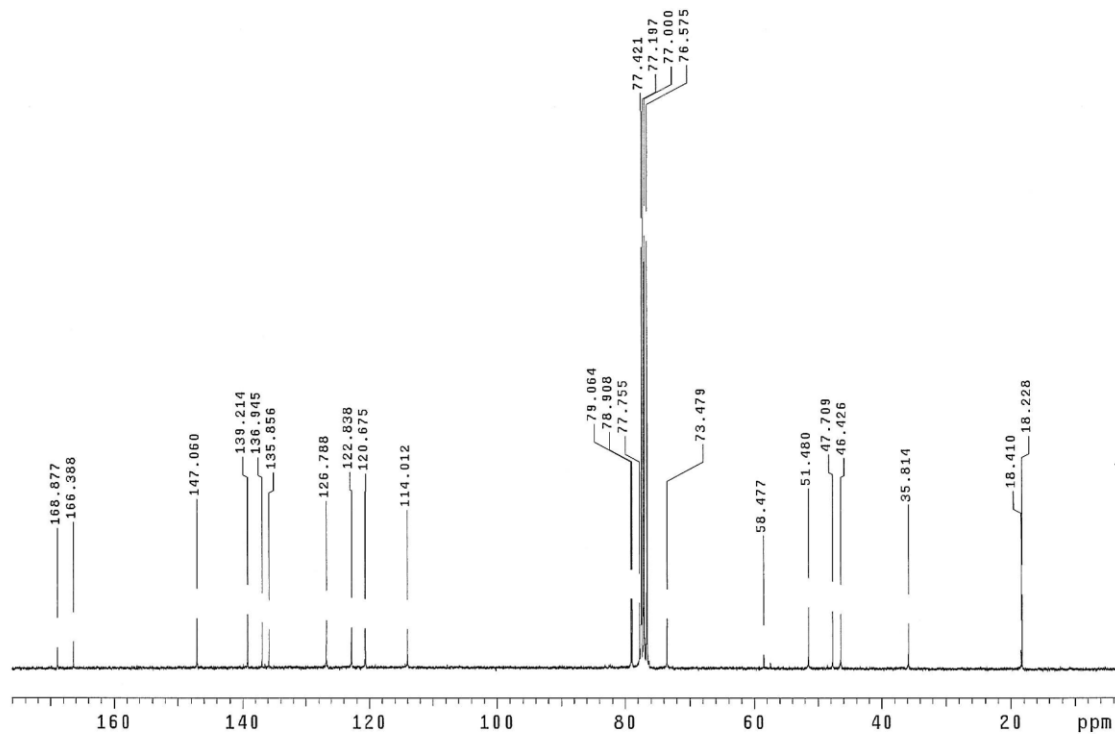


Příl. 5 <sup>1</sup>H NMR spektrum LC-3 (repidolid)

```

repiolid
exp7 std13c
SAMPLE DEC. & VT
date Mar 7 2007 dfrq 300.074
solvent CDC13 dn H1
file /export/home/~ dpwr 37
vnmr1/Opletal/Elias~ dof 0
kaBrojerova-II-VII~ dm yyy
I_C.fid dmm w
ACQUISITION dmf 11500
sfrq 75.461 PROCESSING
tn C13 lb 1.00
at 1.815 wtfile
np 68106 proc ft
sw 18781.7 fn not used
fb 10400
bs 16 verr
tpwr 50 wexp
pw 16.2 wbs
d1 5.000 wnt
tof 0
nt 25000
ct 8896
alock s
gain not used
FLAGS
il n
in n
dp y
DISPLAY
sp 245.4
wp 13041.7
vs 72
sc 0
wc 200
h2mm 65.21
is 500.00
rfl 7635.2
rfp 5809.9
th 2
ins 100.000
nm no ph

```

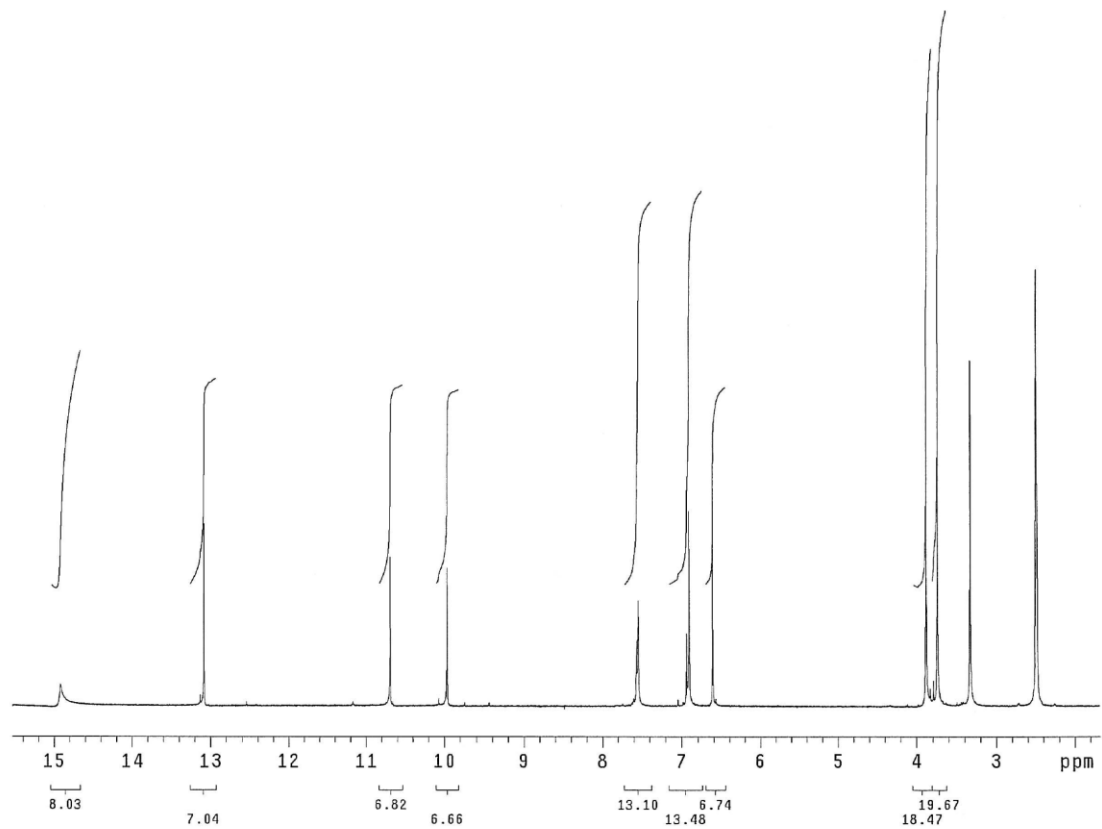


Příl. 6 <sup>13</sup>C NMR spektrum LC-3 (repiolid)

```

jaceosidin
exp7 std1h
SAMPLE          DEC. & VT
date  May 23 2006  dfrq  300.076
solvent  DMSO  dn  H1
file  /export/home/~ dpwr  37
vnmr1/Dp1eta1/Broj~ dof  0
erova-frakce-3_H.f~ dm  nnn
c
ACQUISITION  id  dmm  c
dmf  11500
sfrq  300.077  PROCESSING
tn  H1  wtfile
at  1.998  proc  ft
np  17984  fn  not used
sw  4500.5
fb  2600  werr
bs  16  wexp
tpwr  54  wbs
pw  7.0  wnt
d1  5.000
tof  1000.0
nt  16
ct  16
alock  n
gain  not used
FLAGS
il  n
in  n
dp  y
DISPLAY
sp  503.5
wp  4157.3
vs  86
sc  0
vc  200
hzmm  20.79
is  1696.78
rf1  450.5
rfp  747.2
th  20
lms  100.000
nm  cdc ph

```

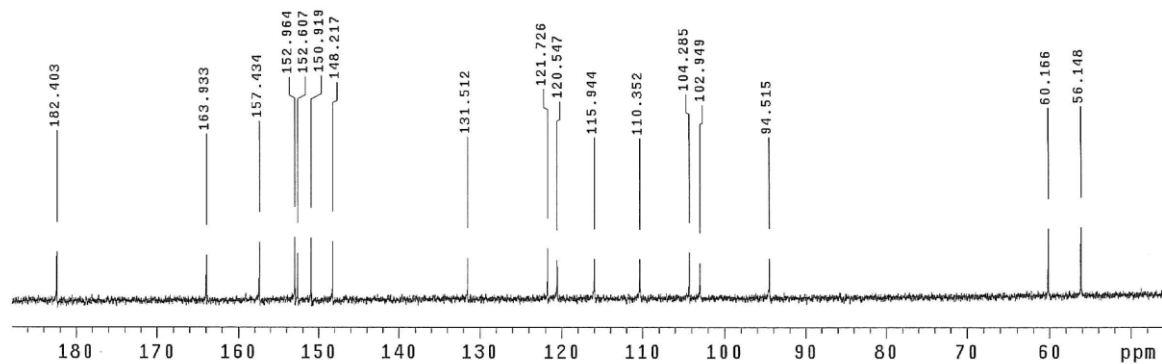


Příl. 7 <sup>1</sup>H NMR spektrum LC-4 (jaceosidin)

```

jaceosidin
exp7 std13c
SAMPLE DEC. & VT
date May 23 2006 dfrq 300.076
solvent DMSO dn H1
file /export/home/~ dpwr 37
vnmr1/Opletal/Broj~ dof 0
erova-frakce-3_C.f~ dm yyy
id dmm w
ACQUISITION 11500
sfrq 75.461 PROCESSING
in C13 lb 1.00
at 1.815 wtfile
np 68106 proc ft
sw 18761.7 fn not used
fb 10400
bs 16 werr
tpwr 50 wexp
pw 16.2 wbs
d1 5.000 wnt
tof 0
nt 25000
ct 9248
alock s
gain not used
FLAGS
il n
in n
dp y
DISPLAY
sp 3475.0
wp 10705.4
vs 604
sc 0
wc 200
hzmm 53.53
is 500.00
rfl 4838.8
rfp 2995.5
th 3
ins 100.000
nm no ph

```

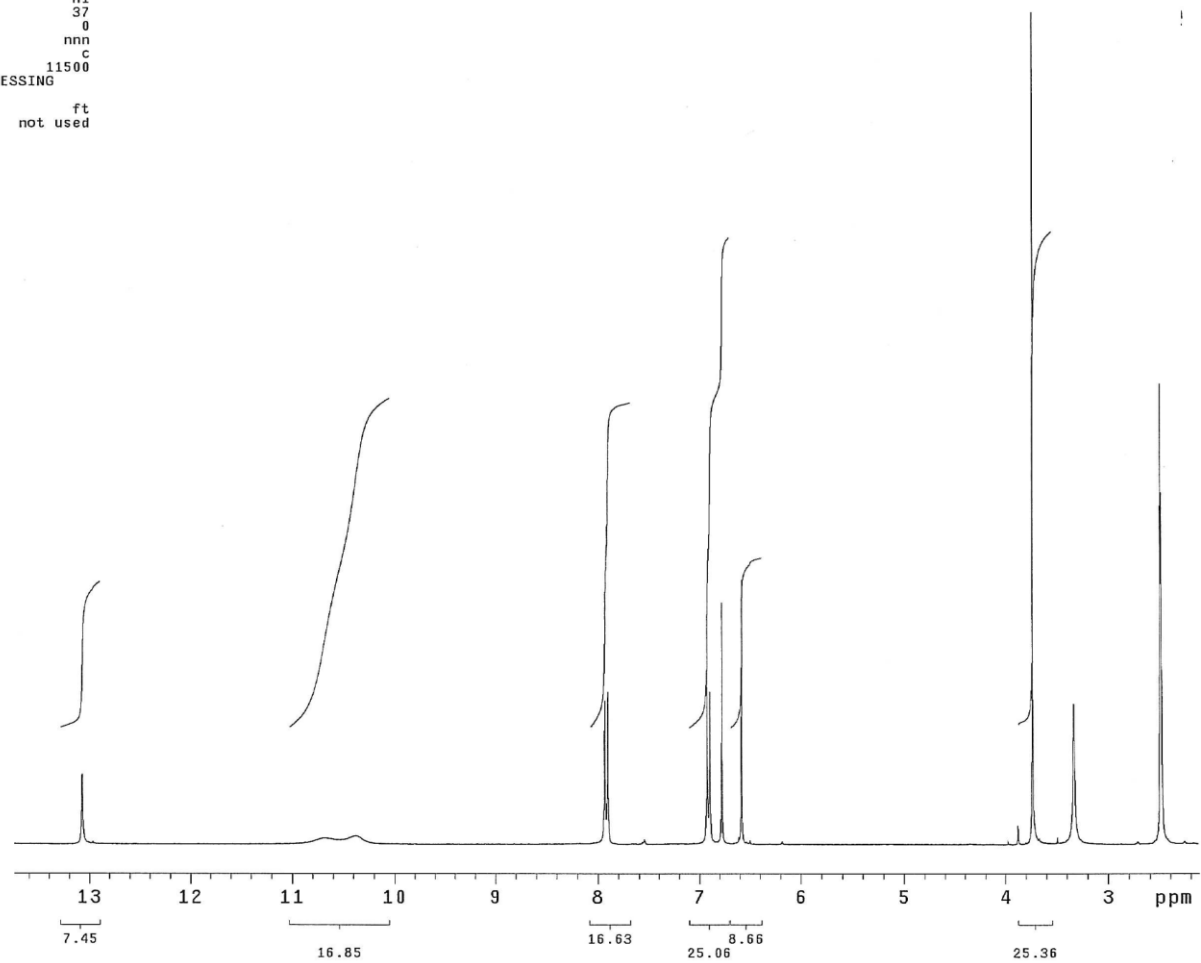


Příl. 8 <sup>13</sup>C NMR spektrum LC-4 (jaceosidin)

```

hispidulin
exp7 std1h
SAMPLE DEC. & VT
date May 18 2006 dfrq 300.076
solvent DMSO dn H1
file /export/home/~ dpwr 37
vnmr1/Opletal/Broj~ dof 0
erova-frakce-1_H.f~ dm nnn
id dmm c
ACQUISITION id dmf 11500
sfrq 300.076 PROCESSING
tn H1 wtfile
at 1.998 proc ft
np 17984 fn not used
sw 4500.5
fb 2600 werr
bs 16 wexp
tpwr 54 wbs
pw 7.0 wnt
d1 5.000
tof 500.0
nt 32
ct 32
alock n
gain not used
FLAGS
il n
in n
dp y
DISPLAY
sp 636.2
wp 3489.0
vs 142
sc 0
wc 200
hzmm 17.44
is 1343.83
rf1 950.7
rfp 747.2
th 20
ins 100.000
nm cdc ph

```



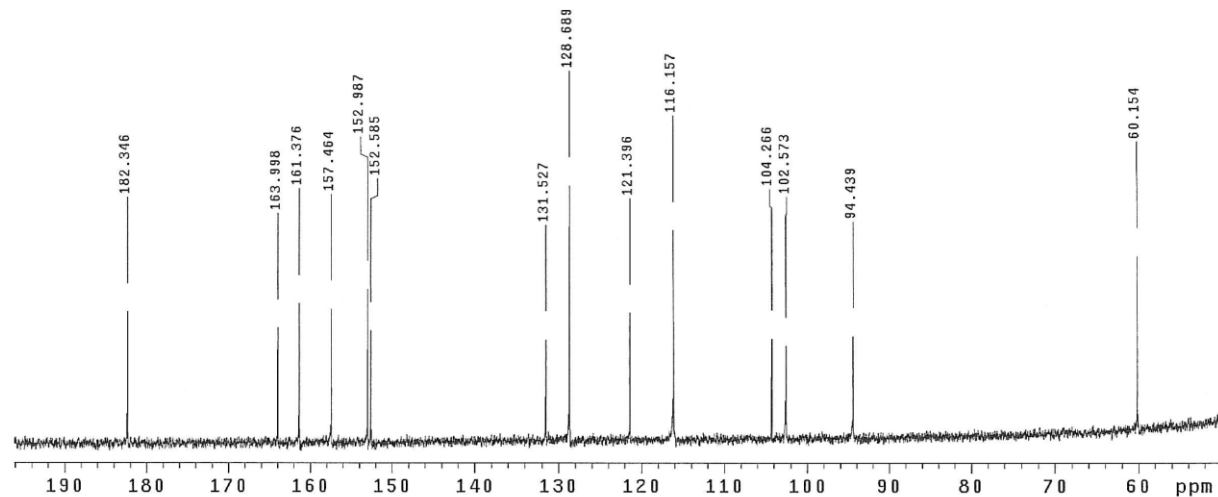
Příl. 9 <sup>1</sup>H NMR spektrum LC-5 (hispidulin)



```

hispidulin
exp7 std13c
SAMPLE DEC. & VT
date May 18 2006 dfrq 300.076
solvent DMSO dn H1
file /export/home/~ dpwr 37
vnmr1/OpIeta1/Broj~ dof 0
erova-frakce-1_C.f~ dm yyy
id dmm w
ACQUISITION dmf 11500
sfrq 75.461 PROCESSING
tn C13 lb 1.00
at 1.815 wtfile
np 68106 proc ft
sw 18761.7 fn not used
fb 10400
bs 16 werr
tpwr 50 wexp
pw 16.2 wbs
d1 5.000 wnt
tof 0
nt 25000
ct 9488
alock s
gain not used
FLAGS
il n
in n
dp y
DISPLAY
sp 3785.4
wp 11010.8
vs 1185
sc 0
wc 200
hzmm 55.05
is 500.00
rfl 4838.5
rfp 2995.5
th 6
ins 100.000
nm no ph

```



Příl. 10 <sup>13</sup>C NMR spektrum LC-5 (hispidulin)