

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

DIPLOMOVÁ PRÁCE



BIOLOGICKÁ AKTIVITA OBSAHOVÝCH LÁTEK ROSTLIN XXIV.
VLIV ALKALOIDŮ Z NĚKTERÝCH DRUHŮ RODU *FRITILLARIA* L. NA AKTIVITU
ACETYLCHOLINESTERASY A BUTYRYLCHOLINESTERASY

Vedoucí diplomové práce: Prof. RNDr. Lubomír Opletal, CSc.
Vedoucí katedry: Prof. RNDr. Luděk Jahodář, CSc.

Dobruška, květen 2013

Markéta Mervartová

CHARLES UNIVERSITY IN PRAGUE
FACULTY OF PHARMACY IN HRADEC KRALOVE
DEPARTMENT OF PHARMACEUTICAL BOTANY AND ECOLOGY

DIPLOMA THESIS

BIOLOGICAL ACTIVITY OF PLANT METABOLITES XXIV.
INFLUENCE OF ALKALOIDS FROM SOME SPECIES OF THE GENUS *FRITILLARIA* L.
ON ACTIVITY OF ACETYLCHOLINESTERASE AND BUTYRYLCHOLINESTERASE

Supervisor: Prof. RNDr. Lubomír Opletal, CSc.
Head of Department: Prof. RNDr. Luděk Jahodář, CSc.

Dobruška, May, 2013

Markéta Mervartová

PROHLÁŠENÍ

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

Tato práce byla zpracována za podpory grantů specifického vysokoškolského výzkumu SVV 267002 a FRVŠ 664/2011.

V Dobrušce, 3. května 2013

Markéta Mervartová

Děkuji

Prof. RNDr. Lubomíru Opletalovi, CSc. za odborné vedení mé diplomové práce, za poskytnuté cenné rady a připomínky, ale také za jeho čas a trpělivost,

Ing. Kateřině Macákové, Ph.D. za zásadní pomoc při měření biologické aktivity extraktů, celému kolektivu katedry farmaceutické botaniky a ekologie za příjemné pracovní prostředí, své rodině za velkou morální podporu.

OBSAH

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	7
1 ÚVOD	9
2 CÍL PRÁCE	12
3 TEORETICKÁ ČÁST	14
3.1 ALZHEIMEROVA CHOROBA (AD)	15
3.1.1 Charakteristika demencí	15
3.1.2 Charakteristika AD	15
3.1.3 Patogeneze a diagnostika AD	16
3.1.4 Terapie AD	18
3.1.4.1 Inhibitory cholinesteras	18
3.1.4.2 Parciální inhibitory NMDA receptorů glutamatergního systému	19
3.1.4.3 Doplňková farmaka	19
3.1.5 Perspektivní farmakoterapeutické možnosti	20
3.2 LÁTKY PŘÍRODNÍHO PŮVODU V LÉČBĚ AD	21
3.2.1 Významné inhibitory cholinesteras a látky jim podobné	21
3.2.2 Další inhibitory cholinesteras	23
3.2.3 Látky s jiným účinkem	24
3.3 ROD <i>FRITILLARIA</i> SP.	25
3.3.1 Synonyma	25
3.3.2 Systematické zařazení	25
3.3.3 Botanický popis	25
3.3.4 Celkové rozšíření	25
3.3.5 Obsahové látky	25
3.3.6 Biologická aktivita obsahových látek	34

4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	39
4.1	OBECNÉ METODY	40
4.1.1	Příprava a čištění rozpouštědel	40
4.1.2	Odpařování extraktů a jejich uchování	40
4.1.3	Rostlinný materiál	40
4.1.4	Příprava extraktů	41
4.1.5	Chemikálie, rozpouštědla a přístroje pro přípravu extraktů	42
4.2	STANOVENÍ CHOLINESTERASOVÉ AKTIVITY	43
4.2.1	Chemikálie, materiál a přístroje	43
4.2.2	Metodika stanovení cholinesterasové inhibiční aktivity (IC_{50})	44
4.2.2.1	Biologický materiál	44
4.2.2.2	Stanovení enzymové aktivity	45
4.2.2.3	Stanovení inhibiční aktivity extraktů	45
5	VÝSLEDKY	46
5.1	STANOVENÍ HODNOT IC_{50}	47
6	DISKUSE	48
7	LITERATURA	52
	ABSTRAKT	57
	ABSTRACT	59

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ACAT	acyl-koenzym A: cholesterol acyltransferasa
ACE I	angiotenzin konvertující enzym typu 1
AD	Alzheimerova choroba (Alzheimer's disease)
ADINACO	Alzheimer's Disease and NATural COMpounds
AGN	ztráta náhledu nad chorobou (anozognozie)
ACh	acetylcholin
AChE	acetylcholinesterasa
APOE-4	apolipoprotein E4
APP	amyloidní prekurzorový protein
A β	β -amyloid
BuChE	butyrylcholinesterasa
CNS	centrální nervová soustava
CT	počítačová tomografie
ČMLF	schopnost plánování jednoduchých činností (funkce vázané na čelní mozkové laloky)
DMSO	dimethylsulfoxid
DTNB	5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina
EBM	medicína založená na důkazech (Evidence Based Medicine)
Et ₂ O	diethylether
EtOAc	ethyl-acetát
EtOH	ethanol
GSK3 β	glykogen synthasa kinasa
ChE	cholinesterasa
M2	muskarinové receptory typu 2
MRI	magnetická rezonance
NMDA	N-methyl-D-aspartát
PPAR- γ	receptory přímo ovlivňující inzulinorezistenci (peroxisome proliferator-activated receptor, type γ)

RESP	schopnost zapamatování běžných každodenních událostí (recentní epizodická slovní paměť)
ROS	reaktivní formy kyslíku (reactive oxygen species)
SPECT	jednofotonová emisní výpočetní tomografie
VF	schopnosti orientace v prostoru, příp. čase (vizuospaciální funkce)

1 ÚVOD

Život v moderní společnosti jde ruku v ruce s neodvratitelným rizikem civilizačních chorob. Jsou to nemoci, jejichž vznik a vývoj je podmíněn či výrazně ovlivněn civilizací, způsobem života, technikou, stresem, znečištěním životního prostředí i jinými negativními faktory [1].

Rozvoj civilizace s sebou přinesl zlepšení životních podmínek, progresi v oblasti vědy a techniky a zároveň obrovský medicínský pokrok. Díky tomu se lidé dožívají vyššího věku. Spolu se stárnutím populace dochází k častějšímu výskytu mnohých onemocnění, dříve lidstvu téměř neznámých. Jedná se především o kardiovaskulární choroby způsobené aterosklerózou a s nimi související obezita a diabetes mellitus druhého typu, taktéž se zvyšuje četnost nádorových onemocnění. Na vzniku těchto nemocí se nemalou měrou podílí nezdravý životní styl.

Problematika stárnoucí populace a civilizačních chorob zahrnuje také demence. Tyto závažné duševní poruchy představují značnou zdravotní, sociální i ekonomickou zátěž. Podstatně zkracují nejen aktivní věk, ale i věk skutečný. Vedou ke značným omezením postižených, jejich postupné odkázanosti na péči okolí, k neschopnosti samostatné existence. A z problému jedince se postupně stává celospolečenská záležitost [2].

Nejčastější příčinou demencí je Alzheimerova choroba (AD). Představuje v čisté podobě alespoň polovinu všech demencí. Velmi častá je rovněž tzv. smíšená forma demence, u které se na rozvoji nemoci podílí jak AD, tak cévní změny mozku. AD patří mezi neurodegenerativní onemocnění, vede k úbytku některých populací neuronů a následně k mozkové atrofii. Tyto patologické změny se projevují jako syndrom demence, kdy dochází k postižení kognitivních funkcí, negativnímu ovlivnění aktivit denního života i behaviorálním a psychologickým poruchám [3].

V současnosti není ještě zcela objasněna etiopatogeneze AD, což nám neumožňuje optimální léčebný postup – kauzální terapii. Je však známo více etiopatogenetických řetězců, vzájemně spolu souvisejících. Ovlivněním těchto řetězců můžeme průběh demence výrazně zpomalit, především když začneme s léčbou včas [4].

Terapie AD má být komplexní. Zahrnuje farmakoterapii, psychosocioterapii, léčbu přidružených onemocnění, rehabilitaci tělesných funkcí a práci s rodinou, případně pečovateli [4].

Výzkum AD je ve světě řazen mezi priority a jsou na něj uvolňovány velké finanční prostředky. Pozornost je věnována zejména:

- genetice AD,
- mechanismu tvorby patologických bílkovin (β -amyloidu a τ -proteinu),
- poruchám přenosu informací uvnitř buňky,
- nervovým růstovým faktorům, jejich tvorbě, uvolnění a vazbě,
- apoptóze,
- vývoji nových léčiv proti AD a dalším demencím [3].

Jako potenciální zdroje nových léčiv jsou testovány i látky přírodního původu. Tyto látky mohou sloužit jako léčiva samy o sobě, nebo se jejich struktura stane inspirativní předlohou pro léčiva syntetická. Jednu z perspektivních skupin přírodních látek tvoří alkaloidy. V současné terapii AD jsou využívány dva alkaloidy – galanthamin a huperzin A. Jako nadějně pro léčbu AD se ukázaly také alkaloidy rodu *Fritillaria* sp., u kterých se, stejně jako u dalších látek, účinnost dále ověřuje. Studium přírodních látek z hlediska jejich vlivu na patofyziologické procesy ovlivňující rozvoj AD se zabývá výzkumná skupina ADINACO Research Group na katedře farmaceutické botaniky a ekologie Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy. Z náplně této pracovní skupiny vychází také tato diplomová práce.

2 CÍL PRÁCE

Cílem této práce bylo:

1. Seznámit se s problematikou AD a se současnými poznatky o alkaloidech rodu *Fritillaria* sp.
2. Připravit extrakty z dodaných 10 vzorků rostlin (sumární a alkaloidní).
3. Podílet se na stanovení biologické aktivity extraktů na lidskou acetylcholinesterasu (AChE) a butyrylcholinesterasu (BuChE).
4. Zpracovat nashromážděná data a výsledky a zhodnotit je v rámci diplomové práce.

3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 ALZHEIMEROVA CHOROBA (AD)

3.1.1 Charakteristika demencí

Pojem demence vznikl spojením latinských slov de (bez) a mens (mysl, vědomí, rozum) [5]. Jedná se o označení pro skupinu onemocnění, která jsou charakteristická globálním úbytkem intelektových schopností, poruchami osobnosti, chování, společenského začlenění a pracovních aktivit. Na žebříčku příčin úmrtnosti zauímají demence 4. – 5. místo [6].

Z hlediska příčiny rozlišujeme dva typy demencí. Primární demence, které mají svůj původ v atroficko-degenerativním poškození mozku, a sekundární (symptomatické) demence, které se objevují na podkladě např. systémového onemocnění, intoxikace, infekce, traumatu, tumoru a jiných patologických jevů postihujících také mozek. Celkem čítají tyto dvě kategorie okolo šedesáti chorob různé patogeneze [3, 5].

Nejčastější příčinou demence je AD a podle většiny statistik se na celkovém počtu demencí podílí 50 – 65 %. V současnosti jí ve světě trpí 17 – 25 milionů lidí, u nás se odhaduje počet nemocných na 70 000 – 90 000 [5].

3.1.2 Charakteristika AD

AD je progresivní neurologické onemocnění charakterizované především úbytkem paměti, dále poruchami chování a povšechným postižením běžných životních činností. Vzniká na podkladě degenerativního zániku mozkových neuronů, který mimo jiné vede k nedostatku acetylcholinu (ACh) v mozku [7].

U tohoto onemocnění je podstatné rozeznávat jeho familiární a sporadickou formu. Hluběji rozlišujeme familiární AD s raným začátkem, tedy před 60. rokem života, a familiární AD s pozdním začátkem, čili po 60. roce života. Většinu případů AD, tj. 90 – 95 %, tvoří forma sporadická, která postihuje pacienty ve věku 65 let a výše [8].

Incidence i prevalence AD roste s věkem, přičemž ženy jsou ve vysokém věku ohroženější než muži. Počínaje věkem 62,5 let se prevalence AD každých 4,5 roku zdvojnásobuje [4].

Nejvýznamnějším rizikovým faktorem pro vznik AD je tedy věk. Druhé místo v pořadí zauímá přítomnost alely apolipoproteinu E4 (APOE-4). Mezi vedlejší rizikové faktory řadíme ženské pohlaví, nízké vzdělání, výskyt AD nebo Downova syndromu v rodině a prodělání cerebrovaskulárního onemocnění či traumatu hlavy. Zvýšené riziko rozvoje AD je

registrováno u jedinců s neléčenou arteriální hypertenzí, se zvýšenou hladinou homocysteinu v krvi, zvýšenou konzumací tuků a s diabetem. Dvojnásobně vyšší riziko propuknutí nemoci mají kuřáci na rozdíl od nekuřáků [7]. Všechny uvedené aspekty mohou přispívat zrodu sporadické formy AD v lidském organismu [8].

Naopak snižovat riziko vzniku rozvoje sporadické formy AD může terapie nesteroidními antiflogistiky, statiny či estrogeny [8].

Na rozdíl od sporadické formy je familiární forma AD monogenně podmíněné onemocnění, které se vyznačuje autozomálně dominantní dědičností. Ta je vyjádřena vysokou penetrací jednoho z následujících genů: genu kódujícího amyloidní prekurzorový protein (APP) na dlouhém raménku chromozómu 21, genu kódujícího presenilin 1 na chromozómu 14, genu kódujícího presenilin 2 na chromozómu 1 a genu kódujícího τ -protein na chromozómu 17 [9].

AD se postupně projevuje těmito symptomy: porucha recentní epizodické slovní paměti (RESP) a jazyka, porucha vizuospeciálních funkcí (VF) a porucha funkcí vázaných na čelní mozkové laloky (ČMLF). U 40 % pacientů zaznamenáváme také poruchy nekognitivních funkcí, jako jsou deprese, halucinace, agresivita a poruchy spánku. Poměrně často se vyskytuje jev zvaný anozognozie (AGN). Nemoc obvykle končí smrtí pacienta 3 – 7 let od diagnostikování prvních klinických příznaků [10].

3.1.3 Patogeneze a diagnostika AD

Typické pro AD jsou senilní plaky, neuronální klubka (tangles) a úbytek neuronů. Součástí buněčné membrány neuronů je bílkovina APP, která je za normálních podmínek štěpena enzymem α -sekretasou na neškodné rozpustné peptidové fragmenty. Těmto fragmentům je přisuzována neuroprotektivní funkce. Za patologického stavu u AD se podílejí na štěpení APP patologické enzymy β - a γ -sekretasa, které dávají vznik peptidovým fragmentům o 38 – 43 aminokyselinách [5, 11].

Z těchto fragmentů jsou stěžejní pro rozvoj onemocnění dva amyloidní β -peptidy čítající 40 a 42 aminokyselin. Tyto proteiny jsou zodpovědné za amyloidní angiopatii a degeneraci neuronů v důsledku oxidačního stresu. Dochází k jejich oligomeraci, polymeraci a následné kumulaci, což vede ke zvýšení jejich neurotoxicity. Polymery jsou podstatou β -amyloidu (A β), základního stavebního materiálu senilních (alzheimerovských) plaků. Plaky

představují okrsy neurodegenerace, kde probíhá zánět, uvolňují se reaktanty akutní zánětlivé fáze (interleukiny, cytokiny, ROS) a dochází tak k další degeneraci tkáně. Projevují se příznaky excitotoxicity – nadměrného uvolnění excitačních aminokyselin a jejich vazby na ionotropní receptory [10, 11,12].

Ve zdravých neuronech je přítomen normální τ -protein, který stabilizuje mikrotubuly a podílí se na udržování integrity cytoskeletu. U AD dochází k degradaci τ -proteinu vlivem ROS. τ -protein je hyperfosforylován a vytváří tak nerozpustná filamenta zvaná neuronální klubka (tangles). Následně kolabují mikrotubuly a je vážně narušen axonální transport. Konečným důsledkem těchto procesů je pak apoptotický zánik neuronů, který je nezvratný a koreluje s tíží onemocnění [5, 12].

Značný úbytek nervových buněk mozku patří mezi základní charakteristiky AD. V porovnání s klinicky normálním stárnutím je pokles počtu neuronů o 40 – 80 % vyšší. Zasaženy jsou zejména „velké“ neurony o ploše přesahující 90 mikrometrů. Numerická atrofie neuronů se odehrává především v mozkové kůře (entorinální kůra, střední spánkový závit) a v oblastech podkorových (Meynertovo bazální jádro, hippocampus) [10].

V průběhu AD rovněž numericky atrofuji cholinerní neurony bazální části velkého mozku, čemuž odpovídá pokles korové AChE a cholinacetyltransferasy. Dochází k porušení acetylcholinerních aferentních drah, zvláště pak k defektu syntézy a výdeje ACh z presynaptického zakončení, zatímco postsynaptické muskarinové i nikotinové receptory jsou relativně dobře zachovány. Krom jiných jsou také postiženy noradrenergí neurony v locus coeruleus a dopaminerní neurony v substantia nigra [8, 11].

Numerická atrofie neuronů se makroskopicky projevuje poklesem hmotnosti i objemu mozku, ztenčováním mozkové kůry a rozšiřováním mozkových komor. Obzvláště patrné jsou tyto nálezy u presenilní formy onemocnění. V těchto případech může úbytek hmotnosti mozku v porovnání s kontrolním dosahovat až 300 g. Na objemu velmi výrazně ztrácejí zejména mediální temporální struktury mozkové kůry, což odpovídá již zmíněným mikroskopickým změnám [4].

Uvedené poznatky o změnách mozkových proporcí mohou být podkladem pro diagnostická vyšetření. Metoda MRI volumetrie umožňuje měření těch oblastí mozku, u kterých zaznamenáváme výrazné zmenšení objemu – hippocampus, amygdala a přilehlá entorinální kůra. Pomocí CT či MRI jsou lékaři schopni odhalit mikroangiopatii v bílé hmotě hemisfér a podkoří způsobenou nahromaděným A β v cévních stěnách. Oboustranné snížení

krevního průtoku v obou temporálních a parietálních lalocích je potvrzováno metodou SPECT. Velice slibné se zdá stanovování poměru A β -peptidů v mozkomíšním moku. Stejně nadějná je i možnost stanovování τ -proteinu a fosforylovaného τ -proteinu, jejich vzájemného poměru a poměru vůči A β -peptidům. Klinické příznaky jsou potvrzovány neuropsychologickými testy. Žádné z těchto vyšetření však není jednoznačně průkazné, diagnózu může definitivně potvrdit jedině patolog provedením autopsie nebo biopsie po smrti pacienta [5].

3.1.4 Terapie AD

V současné době není ještě plně vysvětlena etiologie AD, tudíž ji nelze léčit kauzálně. V terapii je možno využít pouze dosud objasněných patogenetických článků:

- poruchy acetylcholinergního systému,
- nadměrné uvolňování excitačních aminokyselin,
- tvorba senilních plaků [8].

V návaznosti na tyto principy jsme schopni chorobu do určité míry ovlivnit, především prodloužit období lehkých stádií a oddálit stádia těžká, typická výrazným zhoršením kvality života pacientů [13].

Moderní léčba nabízí pacientům pouze dva farmakoterapeutické postupy, které jsou založeny na důkazech (EBM) – tj. výsledcích více rozsáhlých, multicentrických, multietnických, randomizovaných, dvojité zaslepených studií. Jsou to:

- inhibitory cholinesteras (ChE),
- inhibitory *N*-methyl-D-aspartátových (NMDA) receptorů.

Existují i další farmakoterapeutické přístupy, kterými je možno ovlivnit jednotlivé etiopatogenetické řetězce, jejich použití však není dostatečně podloženo klinickými studiemi [14].

3.1.4.1 Inhibitory cholinesteras

Správně fungující cholinergní systém zajišťuje optimální paměťové funkce a udržuje kvalitní úroveň vědomí. U AD je tento systém narušen sníženou tvorbou a výdejem ACh. Inhibitory ChE blokují enzymy, které jsou zodpovědné za rozklad ACh v synaptické štěrbině. Jedná se o AChE a u AD patologicky zmnoženou, jinak zcela minoritní BuChE. Pomalejší odbourávání

ACh zvyšuje jeho koncentraci v synaptické štěrbině a tím upravuje cholinergní přenos na nervových synapsích v mozku. Vzhledem k téměř neměnnému počtu muskarinových receptorů a k mírně sníženému počtu nikotinových receptorů je tato léčba účinná. Inhibice ChE navíc snižuje tvorbu i toxicitu A β a zasahuje tak do neurodegenerativních mechanismů AD [13, 15].

V současnosti se na území ČR, ve většině států Evropy a USA používají v klinické praxi tři látky: donepezil, galanthamin a rivastigmin. Donepezil je čistý inhibitor AChE, téměř bez výskytu nežádoucích účinků. Galanthamin se také řadí k čistým inhibitorům AChE, navíc je alosterickým modulátorem nikotinových receptorů, též s minimem nežádoucích efektů. Rivastigmin jako jediný z těchto látek inhibuje jak AChE, tak BuChE, a díky tomu má i o něco vyšší výskyt nežádoucích účinků v oblasti gastrointestinálního traktu. Tyto látky se běžně využívají k terapii lehkých a středně těžkých forem onemocnění. Řadíme je mezi tzv. kognitiva [14].

3.1.4.2 Parciální inhibitory NMDA receptorů glutamatergního systému

Excitační aminokyseliny (glutamát, aspartát, homocystein aj.) patří mezi mozkové neurotransmitery zajišťující hlavní mechanismy učení a paměti. V pokročilých stádiích AD dochází k nadměrnému uvolňování těchto aminokyselin v oblasti plaků a následně k jejich zvýšené vazbě na NMDA receptory, což vede ke zhoršení kognitivních funkcí. Navíc se při podráždění NMDA receptorů otvírají vápníkové kanály, hladina vápenatých iontů v neuronu se zvyšuje, tím se aktivují určité enzymy měnící strukturu proteinů a dojde k odkrytí genu pro apoptózu, v důsledku čehož nastane buněčná smrt [15].

K dispozici je prozatím jen jeden zástupce parciálních inhibitorů NMDA receptorů – memantin. Tato látka potlačuje zánik neuronů a zlepšuje synaptický přenos v CNS. Dále inhibuje proteinkinasu GSK3 β , která spouští degradaci τ -proteinu. Memantin lze podávat společně s inhibitory ChE, tato kombinace je dokonce velmi výhodná a v praxi využívaná [14].

3.1.4.3 Doplnková farmaka

V terapii AD je možné využít i některé látky, jejichž působení není založeno na důkazech. Obvykle zlepšují kognitivní i nekognitivní funkce, kombinují se s inhibitory ChE i memantinem, nicméně jejich používání se nemůže dostatečně opírat o výsledky klinických studií [15].

V rámci přídatné terapie lze podávat např. nootropní farmaka, látky zvyšující mozkový metabolismus. Jako nejvýhodnější se ukazuje užívání nicergolinu, který nejenže zlepšuje mozkovou mikrocirkulaci, ale má také slabý vliv na acetylcholinergní systém. Částečné důkazy existují u preventivní léčby extraktem z *Ginkgo biloba* [14, 15].

Dále je možné použít tzv. zametače ROS (E-vitamin, β -karoten aj.) a látky zvyšující tvorbu nervových růstových faktorů (Cerebrolysin – hydrolyzát vepřových mozků). V současnosti je zkoušena řada dalších farmakoterapeutických přístupů, které vycházejí z určitých teoretických předpokladů, ale jejich efektivita byla dosud prokázána jen částečně [14].

3.1.5 Perspektivní farmakoterapeutické možnosti

Hlavním krokem v patogenezi AD je tvorba a ukládání $A\beta$ a jeho dílčí stupně. V současné době jsou již zkoušeny látky, které by svým účinkem mohly proces amyloidogeneze ovlivnit. Dobře snášené jsou např. inhibitory β -sekretas, ale bohužel nevykazují předpokládaný benefit. Podávání inhibitorů γ -sekretas bylo shledáno jako nebezpečné z důvodu vysoké toxicity. Větší úspěch mají modulátory γ -sekretas, jako velmi slibný se v tomto ohledu jeví R-enantiomer nesteroidního antirevmatika flurbiprofenu. Některé studie prokázaly, že aktivitu α -sektretasy mohou zlepšovat statiny, toto tvrzení však potřebuje další ověření. Jinou perspektivní cestou je zabránění oligomerace fragmentů APP látkami jako tramiprosat či kurkumin. Dále probíhají studie s antiamyloidní vakcínací, monoklonálními protilátkami proti $A\beta$ a imunoglobuliny [13].

Ovlivnění degenerace τ -proteinu je další nadějný směr, kterým by se případně mohla terapie AD ubírat. Testům jsou podrobovány také látky zaměřené na zlepšení mitochondriálního metabolismu. Pozornost je rovněž věnována studiu látek snižujících inzulinovou rezistenci v mozkové tkáni působením na PPAR- γ , neboli glitazonové receptory (antidiabetikum rosiglitazon). Pozitivní vliv na acetylcholinergní a glutamátergní funkce byl prokázán rovněž u blokátorů 5-HT₆ serotonergních receptorů [13].

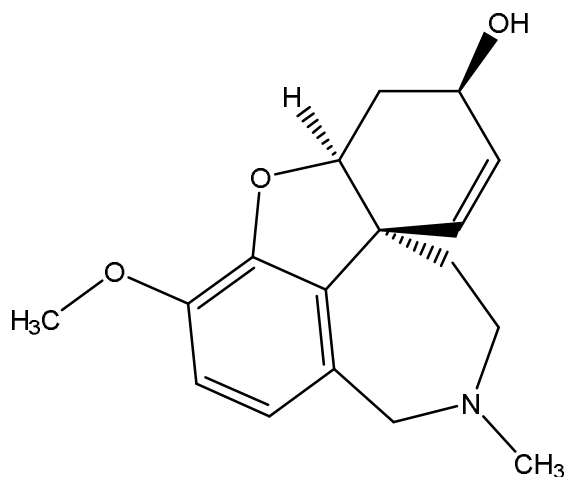
3.2 LÁTKY PŘÍRODNÍHO PŮVODU V LÉČBĚ AD

Některá z moderních léčiv mají svůj původ v přírodních látkách. V terapii AD se prakticky uplatňují přírodní alkaloidy galanthamin a huperzin A. V současnosti se výzkum zaměřuje na další látky alkaloidního typu, které by mohly být velmi perspektivní pro budoucí použití v praxi. Mnohé z nich totiž vykazují inhibiční účinek na AChE.

3.2.1 Významné inhibitory cholinesteras a látky jim podobné

Galanthamin byl poprvé izolován ze sněženy *Galanthus woronowii*, ale vyskytuje se i v ostatních druzích rodu *Galanthus* sp. a najdeme ho i v mnoha dalších rodech čeledi Amaryllidaceae. Jeho hlavní účinek tkví v inhibici AChE, kromě toho také alostericky moduluje nikotinové receptory, a tím zvyšuje produkci ACh. Jeho nevýhodou je poměrně nízký inhibiční efekt na BuChE. Jako dostatečně prozkoumané léčivo v terapii AD slouží v rámci vědeckých studií jako standard acetylcholinesterasové inhibiční aktivity [16].

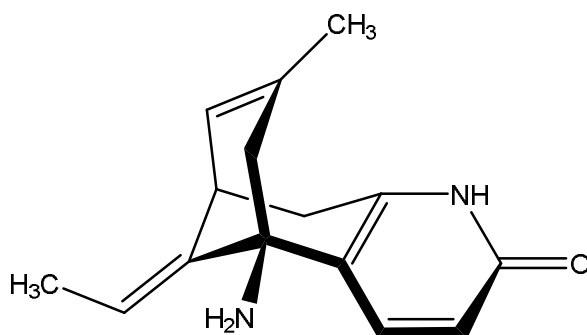
Látky inhibující AChE byly taktéž nalezeny i v dalších zástupcích čeledi Amaryllidaceae. V důsledku toho se stávají předmětem výzkumu tyto rody: *Eucharis*, *Crinum*, *Narcissus*, *Brunsvigia*, *Ammocharis*. V rostlinách *Eucharis grandifolia* a *Galanthus nivalis* se ve stopových množstvích vyskytuje derivát galanthaminu (9-O-demethylgalanthamin) zvaný sangvinin. Tento alkaloid byl v pokusech *in vitro* shledán jako mnohonásobně účinnější v porovnání s galanthaminem. Významnou inhibiční aktivitu také vykazují deriváty alkaloidu lykorninu. Neméně důležitou skupinu v tomto směru tvoří hymayn a látky od něj odvozené [16].



Obr. 1 Galanthamin

Huperzin A má svůj původ v plavuni *Huperzia serrata* (Huperziaceae), ale najdeme ho v malých množstvích i ve vrancí jedlovém (*Huperzia selago*), rostlině vzácně rostoucí i na našem území. Jedná se o silný reverzibilní inhibitor AChE s neuroprotektivním účinkem, který kromě kognitivních funkcí pozitivně ovlivňuje rovněž pocity úzkosti. Oproti ostatním léčivům užívaným v terapii AD disponuje velice výhodnými vlastnostmi: má delší terapeutický efekt, lepší biologickou dostupnost po perorálním podání, rychlejší průnik přes hematoencefalickou bariéru, nižší intenzitu nežádoucích efektů. V současné době byla v USA úspěšně dokončena druhá fáze klinického testování této látky pro léčbu AD. Na území Číny již probíhá fáze čtvrtá, tedy běžné používání huperzinu A v klinické praxi spojené se shromažďováním podrobnějších informací [17].

V posledních letech se výzkum zabývá možnostmi přípravy polosyntetických derivátů huperzinu A za účelem zesílení účinku a zlepšení farmakokinetických vlastností. Totéž platí i o huperzinu B, alkaloidu, který je přirozeně mnohem slabším inhibitorem než galanthamin, nicméně jeho deriváty vykazují aktivitu až o dva řády vyšší [18].



Obr. 2 Huperzin A

3.2.2 Další inhibitory cholinesteras

Tab. 1 Některé další látky vykazující inhibiční účinek na cholinesterasy

Strukturní typ	Látka	Původ	Biologická aktivita	Citace
Chinazolino-karbolinový alkaloid	Rutekarpin	<i>Evodia rutaecarpa</i> , Rutaceae	selektivní inhibice AChE antitrombotický, protizánětlivý, vazodilatační efekt	[16]
Chinazolinový alkaloid	Isaindigoton	<i>Isatis indigotica</i> , Brassicaceae	selektivní inhibice BuChE	[16]
Isochinolinové alkaloidy	Berberinové deriváty	<i>Coptis chinensis</i> , Ranunculaceae	inhibice AChE i BuChE	[16]
Piperidinové alkaloidy	Spektalin, 3-O-acetylspektalin	<i>Senna spectabilis</i> , Fabaceae	vysoká CNS selektivita	[16]
Pregnanové steroidní alkaloidy	blíže neurčeno	<i>Sarcococca saligna</i> , Buxaceae	inhibice AChE i BuChE	[19]
Meroterpenoidy	Arisugaciny	<i>Penicillium</i> sp., Trichocomaceae	inhibice AChE i BuChE	[20]
Purinový derivát	Zeatin	<i>Fiatoua villosa</i> , Orchidaceae <i>Zea mays</i> , Poaceae	inhibice AChE zabránění tvorby A β	[21, 22]
Terpeny	Tanshinon I (diterpen)	<i>Salvia miltiorrhiza</i> , Lamiaceae	inhibice AChE zabránění tvorby A β	[23, 24]

Tab. 1 pokračování

Strukturní typ	Látka	Původ	Biologická aktivita	Citace
Terpeny	Ursolová kyselina (triterpen)	<i>Majorana hortensis</i> , <i>Rosmarinus officinalis</i> , <i>Salvia officinalis</i> , Lamiaceae některé druhy Ericaceae	inhibice AChE i BuChE	[25, 26]
Extrakt	Tenuigenin	<i>Polygala tenuifolia</i> , Polygalaceae	inhibice AChE snížení produkce A β	[27]

3.2.3 Látky s jiným účinkem

Tab. 2 Látky s možností ovlivnění AD jiným způsobem

Strukturní typ	Látka	Původ	Biologická aktivita	Citace
Fenanthrenové deriváty	blíže neurčeno	<i>Salvia deserta</i> , Lamiaceae	inhibice propylendopeptidas	[23]
Meroterpenoid	Pyripyropen A	<i>Aspergillus fumigatus</i> , Trichocomaceae	inhibitor ACAT, snižuje cholesterolémii v krvi	[20, 23]
Polyfenol	Kurkumin	<i>Curcuma longa</i> , Zingiberaceae	antioxidační efekt inhibice tvorby A β neuroprotektivní efekt protizánětlivý efekt	[28, 29]
Extrakt	blíže neurčeno	<i>Ginkgo biloba</i> , Ginkgoaceae	antioxidační efekt inhibice tvorby A β neuroprotektivní efekt snížení krevní viskozity	[28]

3.3 ROD *FRITILLARIA* SP.

3.3.1 Synonyma

Petilium St.-Hil. [30]

3.3.2 Systematické zařazení [31]

Podříše	<i>Cornobionta</i>	Vyšší rostliny
Oddělení	<i>Magnoliophyta</i>	Krytosemenné
Třída	<i>Liliopsida</i>	Jednoděložné
Řád	<i>Liliales</i>	Liliovité
Čeleď	<i>Liliaceae</i>	Liliovité
Rod	<i>Fritillaria</i> sp.	Řebčík

3.3.3 Botanický popis

Jedná se o jednodomé vytrvalé pozemní byliny s cibulemi, někdy jsou přítomny i vedlejší cibulky. Listy střídavé nebo v přeslenu, u nekvetoucích rostlin je pouze jeden list; jednoduché, přisedlé, s listovými pochvami. Čepele listů celokrajné, většinou čárkovité, kopinaté až vejčité, se souběžnou žilnatinou. Květy oboupohlavné, jednotlivé nebo v květenstvích (zpravidla řídkých hroznech), poměrně nápadné, tvaru zvonku či číšky, různých barev. Okvětí ze šesti okvětních lístků ve dvou přeslenech. Tyčinek je šest (3+3), pestík tvořen třemi srostlými plodolisty, semeník je svrchní. Plodem je tobolka [31].

3.3.4 Celkové rozšíření

Rod *Fritillaria* sp. je jedním z nejrozsáhlejších rodů čeledi Liliaceae čítající okolo 130 druhů. Vyskytují se především v oblasti Středomoří, Severní Americe a Střední Asii [32, 33].

3.3.5 Obsahové látky

Z 35 druhů rodu *Fritillaria* sp. bylo doposud izolováno okolo 140 obsahových látek. Z nich podstatnou část tvoří steroidní alkaloidy, které jsou zodpovědné za většinu biologických účinků [33].

Tab. 3 Hlavní steroidní alkaloidy v rostlinách rodu *Fritillaria* sp.

Typ steroidního alkaloidu	Název alkaloidu	Taxon	Citace
Cevaninový typ	Delavin	<i>F. imperialis</i>	[34]
	Ebeiedin	<i>F. ebeiensis</i>	[32]
		<i>F. ebeiensis</i> var. <i>purpurea</i>	[33]
		<i>F. hupehensis</i>	[32]
		<i>F. puqiensis</i>	[32]
		<i>F. thunbergii</i>	[32]
		<i>F. ussuriensis</i>	[32]
		<i>F. walujewii</i>	[32]
	Ebeiedin-3-β-D-glukosid	<i>F. ebeiensis</i>	[32]
	Ebeiedinon	<i>F. ebeiensis</i>	[32]
		<i>F. ebeiensis</i> var. <i>purpurea</i>	[33]
		<i>F. hupehensis</i>	[32]
		<i>F. pallidiflora</i>	[32]
		<i>F. puqiensis</i>	[32]
	Ebeinin	<i>F. ebeiensis</i>	[32]
<i>F. ebeiensis</i> var. <i>purpurea</i>		[33]	
Forticin	<i>F. imperialis</i>	[34]	
Heilonin	<i>F. ussuriensis</i>	[32]	
Hupehenin	<i>F. egregia</i>	[33]	
	<i>F. hupehensis</i>	[32]	
	<i>F. walujewii</i>	[32]	
Hupeheninosid	<i>F. cirrhosa</i>	[32]	
	<i>F. egregia</i>	[33]	
	<i>F. hupehensis</i>	[32]	
	<i>F. lichuanensis</i>	[33]	
	<i>F. pallidiflora</i>	[32]	
	<i>F. walujewii</i>	[32]	

Tab. 3 pokračování

Typ steroidního alkaloidu	Název alkaloidu	Taxon	Citace
Cevaninový typ	Hupehenirin	<i>F. egregia</i>	[33]
		<i>F. hupehensis</i>	[32]
		<i>F. lichuanensis</i>	[33]
	Chuanbeinon	<i>F. cirrhosa</i>	[35]
		<i>F. delavayi</i>	[36]
		<i>F. taipaiensis</i> var. <i>ningriaensis</i>	[33]
	Imperialin (sipeimin)	<i>F. cirrhosa</i>	[32]
		<i>F. delavayi</i>	[37]
		<i>F. imperialis</i>	[33]
		<i>F. pallidiflora</i>	[32]
		<i>F. raddeana</i>	[33]
		<i>F. taipaiensis</i> var. <i>ningriaensis</i>	[33]
<i>F. ussuriensis</i>		[37]	
<i>F. wabuensis</i>		[33]	
<i>F. walujewii</i>		[32]	
<i>F. yuminensis</i>	[33]		
Imperialin-3-β-D-glukosid	<i>F. cirrhosa</i>	[32]	
	<i>F. pallidiflora</i>	[32]	
	<i>F. walujewii</i>	[32]	
Impericin	<i>F. imperialis</i>	[34]	

Tab. 3 pokračování

Typ steroidního alkaloidu	Název alkaloidu	Taxon	Citace	
Cevaninový typ	Isoverticin	<i>F. anhuiensis</i>	[33]	
		<i>F. ebeiensis</i>	[32]	
		<i>F. ebeiensis</i> var. <i>purpurea</i>	[37]	
		<i>F. hupehensis</i>	[32]	
		<i>F. imperialis</i>	[33]	
		<i>F. ningguoensis</i>	[33]	
		<i>F. puqiensis</i>	[32]	
		<i>F. taipaiensis</i> var. <i>ningriaensis</i>	[33]	
		<i>F. thunbergi</i>	[32]	
		<i>F. thunbergi</i> var. <i>chekiangensis</i>	[37]	
		<i>F. wabuensis</i>	[33]	
		Persikanidin A	<i>F. imperialis</i>	[34]
		Pingbeinon	<i>F. ussuriensis</i>	[32]
Pingbeinon-3-β-D- glukosid	<i>F. ussuriensis</i>	[32]		
Pingpeimin A	<i>F. ussuriensis</i>	[32]		
Pingpeimin C	<i>F. ussuriensis</i>	[32]		
Pukviedin	<i>F. hupehensis</i>	[32]		
	<i>F. puqiensis</i>	[32]		
	<i>F. thunbergii</i>	[32]		
Pukviedin-7-ol	<i>F. puqiensis</i>	[32]		
Pukviedinon	<i>F. hupehensis</i>	[32]		
	<i>F. puqiensis</i>	[32]		
	<i>F. thunbergii</i>	[32]		

Tab. 3 pokračování

Typ steroidního alkaloidu	Název alkaloidu	Taxon	Citace
Cevaninový typ	Sinpeinin A	<i>F. cirrhosa</i>	[32]
		<i>F. pallidiflora</i>	[32]
		<i>F. ussuriensis</i>	[32]
		<i>F. walujewii</i>	[32]
	Ussuriedin	<i>F. ussuriensis</i>	[32]
	Verticin (peimin)	<i>F. cirrhosa</i>	[35]
		<i>F. delavayi</i>	[36]
		<i>F. ebeiensis</i>	[32]
		<i>F. ebeiensis</i> var. <i>purpurea</i>	[33]
		<i>F. hupehensis</i>	[32]
		<i>F. monatha</i>	[37]
		<i>F. ningguoensis</i>	[33]
		<i>F. puqiensis</i>	[32]
		<i>F. royelei</i>	[33]
		<i>F. thunbergi</i>	[32]
<i>F. thunbergi</i> var. <i>chekiangensis</i>		[37]	
<i>F. ussuriensis</i>		[32]	
<i>F. verticillata</i>		[33]	
<i>F. verticillata</i> var. <i>thunbergii</i>		[33]	
<i>F. wayuangesis</i>	[33]		
Verticin <i>N</i> -oxid	<i>F. ebeiensis</i>	[32]	
Verticinon <i>N</i> -oxid	<i>F. ebeiensis</i>	[32]	

Tab. 3 pokračování

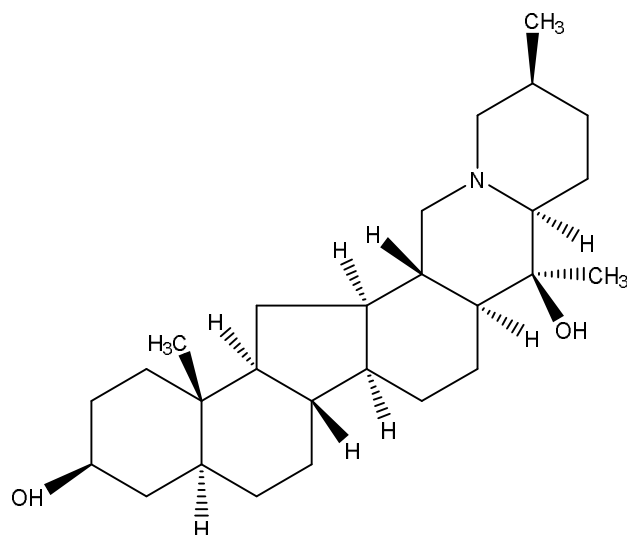
Typ steroidního alkaloidu	Název alkaloidu	Taxon	Citace
Cevaninový typ	Verticinon (peiminin)	<i>F. anhuiensis</i>	[33]
		<i>F. cirrhosa</i>	[35]
		<i>F. delavayi</i>	[36]
		<i>F. ebeiensis</i>	[32]
		<i>F. ebeiensis</i> var. <i>purpurea</i>	[33]
		<i>F. hupehensis</i>	[32]
		<i>F. imperialis</i>	[33]
		<i>F. lichuanensis</i>	[33]
		<i>F. monatha</i>	[37]
		<i>F. ningguoensis</i>	[33]
		<i>F. puqiensis</i>	[32]
		<i>F. royelei</i>	[33]
		<i>F. taipaiensis</i> var.	
		<i>ningriaensis</i>	[33]
		<i>F. thunbergi</i>	[32]
		<i>F. thunbergi</i> var.	
		<i>chekiangensis</i>	[37]
		<i>F. ussuriensis</i>	[32]
		<i>F. verticillata</i>	[33]
<i>F. verticillata</i> var. <i>thunbergii</i>	[33]		
<i>F. wayuangensis</i>	[33]		
Verticinon-3-β-D-glukosid		<i>F. ebeiensis</i>	[32]
		<i>F. hupehensis</i>	[32]
		<i>F. thunbergii</i>	[32]
Yibeinosid A		<i>F. pallidiflora</i>	[32]
		<i>F. walujewii</i>	[32]
Yibeinosid B		<i>F. pallidiflora</i>	[32]
Yubeisid		<i>F. puqiensis</i>	[32]
		<i>F. yuminensis</i>	[33]

Tab. 3 pokračování

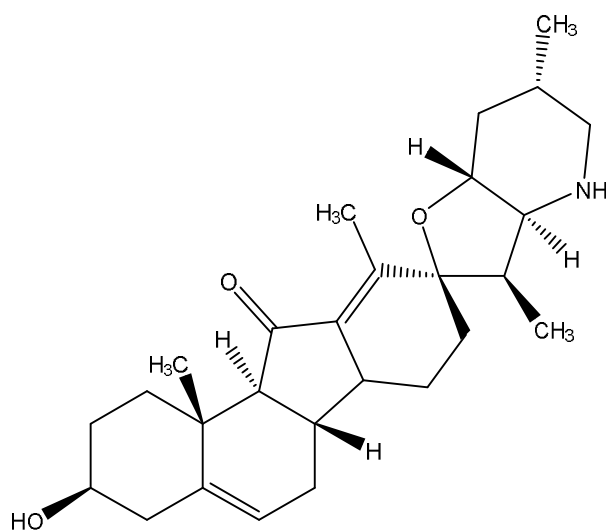
Typ steroidního alkaloidu	Název alkaloidu	Taxon	Citace
Cevaninový typ	Zhebeininosid	<i>F. ebeiensis</i>	[32]
		<i>F. hupehensis</i>	[32]
		<i>F. thunbergii</i>	[32]
		<i>F. ussuriensis</i>	[32]
Jervinový typ	Peimisin	<i>F. anhuiensis</i>	[33]
		<i>F. cirrhosa</i>	[32]
		<i>F. dajinensis</i>	[37]
		<i>F. delavayi</i>	[36]
		<i>F. ebeiensis</i>	[32]
		<i>F. eduardii</i>	[33]
		<i>F. hupehensis</i>	[32]
		<i>F. mellea</i>	[37]
		<i>F. monatha</i>	[37]
		<i>F. ningguoensis</i>	[33]
		<i>F. pallidiflora</i>	[32]
		<i>F. puqiensis</i>	[32]
		<i>F. raddeana</i>	[33]
		<i>F. taipaiensis</i> var. <i>ningriaensis</i>	[37]
		<i>F. thunbergii</i>	[32]
		<i>F. ussuriensis</i>	[32]
<i>F. wabuensis</i>	[33]		
<i>F. walujewii</i>	[32]		
Veratraminový typ	Pukvienin A	<i>F. puqiensis</i>	[32]
	Pukvienin B	<i>F. puqiensis</i>	[32]
	Pukvienin C	<i>F. puqiensis</i>	[32]
	Pukvienin D	<i>F. puqiensis</i>	[32]
	Pukvienin E	<i>F. puqiensis</i>	[32]
	Pukvienin F	<i>F. puqiensis</i>	[32]

Tab. 3 pokračování

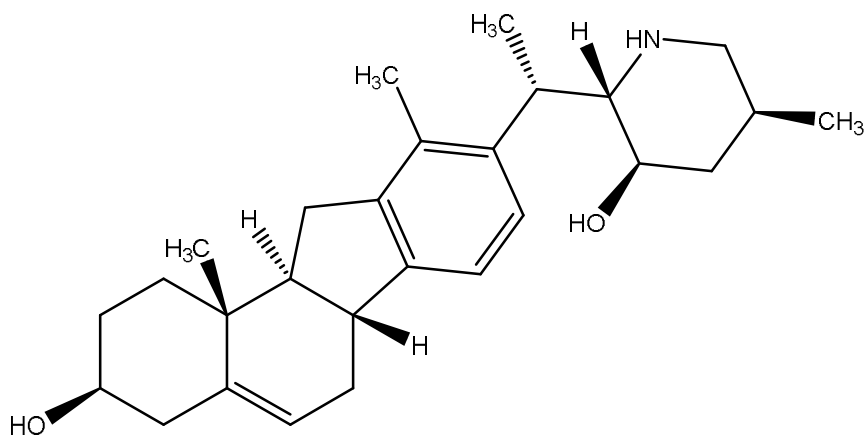
Typ steroidního alkaloidu	Název alkaloidu	Taxon	Citace
Sekosolanidinový typ	<i>N</i> -demethylpukvietinon	<i>F. puqiensis</i>	[32]
	Pingbeininosin	<i>F. ussuriensis</i>	[32]
	Pukvietinedinon	<i>F. puqiensis</i>	[32]
	Pukvietinon	<i>F. puqiensis</i> <i>F. thunbergii</i>	[32] [32]
	Pukvietinonosid	<i>F. puqiensis</i>	[32]
Solanidinový typ	Solanidin	<i>F. camtschaticensis</i>	[38]



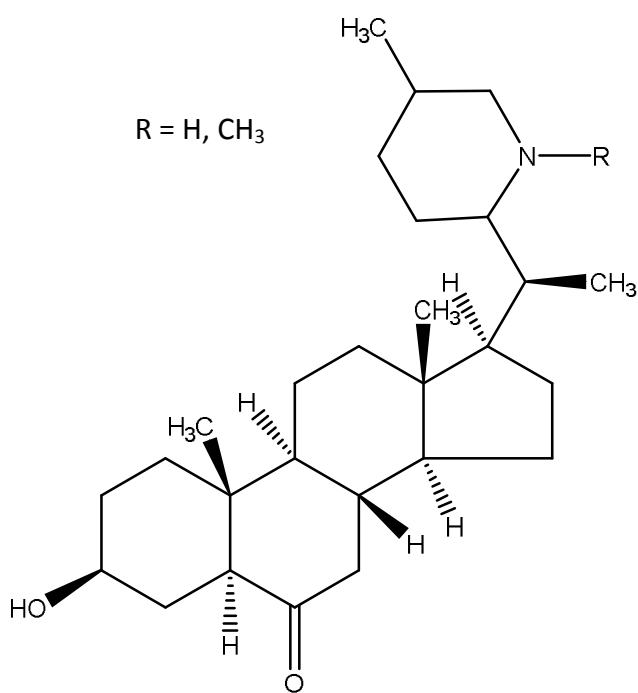
Obr. 3 Cevaninový typ (základní skelet)



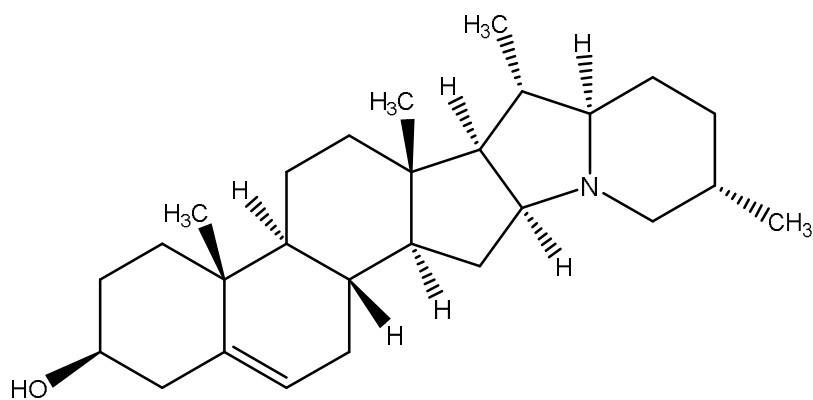
Obr. 4 Jervinový typ (základní skelet)



Obr. 5 Veratraminový typ (základní skelet)



Obr. 6 Sekosolanidinový typ (základní skelet)



Obr. 7 Solanidinový typ (základní skelet)

3.3.6 Biologická aktivita obsahových látek

Několik druhů rodu *Fritillaria* sp. se využívá v tradiční čínské medicíně pro antitussický a expektorační účinek. Ukázalo se, že tento efekt způsobují steroidní alkaloidy [33]. Nyní jsou tyto látky sledovány pro svou inhibiční aktivitu na AChE a BuChE.

Tab. 4 Biologická aktivita hlavních steroidních alkaloidů rodu *Fritillaria* sp.

Typ steroidního alkaloidu	Název alkaloidu	Biologická aktivita	Citace
Cevaninový typ	Delavin	inhibice AChE i BuChE, větší selektivita k BuChE	[34]
	Ebeiedin	antimikrobiální efekt	[39]
		slabá inhibice AChE i BuChE	[40]
		protinádorová aktivita	[41]
		tracheobronchiální relaxace, závislá na koncentraci	[42]
	Ebeiedin-3-β-D-glukosid	není popsána	
	Ebeiedinon	inhibice AChE i BuChE	[40]
	Ebeinin	slabá inhibice AChE i BuChE	[40]
	Forticin	inhibice AChE i BuChE, větší selektivita k BuChE	[34]
	Heilonin	není popsána	
Hupehenin	slabá inhibice AChE i BuChE	[40]	
Hupeheninosid	selektivní inhibice BuChE	[40]	
Hupehenirin	není popsána		

Tab. 4 pokračování

Typ steroidního alkaloidu	Název alkaloidu	Biologická aktivita	Citace
Cevaninový typ	Chuanbeinon	antitussický účinek expektorační účinek protizánětlivý účinek selektivní inhibice BuChE	[43] [43] [43] [40]
	Imperialin	antagonista M2 receptorů antitussický účinek expektorační účinek slabá inhibice AChE i BuChE protizánětlivý účinek tracheobronchiální relaxace, závislá na koncentraci	[44] [45] [45] [40] [45] [42]
	Imperialin-3-β-D- glukosid	antimuskarinový účinek slabá inhibice AChE i BuChE	[46] [40]
	Impericin	inhibice AChE i BuChE, větší selektivita k BuChE	[34]
	Isoverticin	antitussický účinek expektorační účinek slabá inhibice AChE i BuChE protizánětlivý účinek	[45] [45] [40] [45]
	Persikanidin A	inhibice AChE i BuChE, větší selektivita k BuChE	[34]
	Pingbeinon	není popsána	

Tab. 4 pokračování

Typ steroidního alkaloidu	Název alkaloidu	Biologická aktivita	Citace
Cevaninový typ	Pingbeinon-3-β-D-glukosid	není popsána	
	Pingpeimin A	není popsána	
	Pingpeimin C	není popsána	
	Pukviedin	není popsána	
	Pukviedin-7-ol	není popsána	
	Pukviedinon	není popsána	
	Sinpeinin A	antagonista M2 receptorů slabá inhibice AChE i BuChE	[44] [40]
	Ussuriedin	není popsána	
	Verticin (peimin)	antimikrobiální efekt antimuskarinový účinek antitussický účinek expektorační účinek inhibice ACE I slabá inhibice AChE i BuChE protinádorová aktivita protizánětlivý účinek sedativní účinek tracheobronchiální relaxace, závislá na koncentraci	[39] [46] [43] [43] [47] [40] [41] [43] [48] [42]
	Verticin <i>N</i> -oxid	není popsána	
	Verticinon <i>N</i> -oxid	není popsána	

Tab. 4 pokračování

Typ steroidního alkaloidu	Název alkaloidu	Biologická aktivita	Citace
Cevaninový typ	Verticinon (peiminin)	analgetický efekt antimikrobiální efekt antimuskarinový účinek antitussický účinek expektorační účinek inhibice ACE I slabá inhibice AChE i BuChE protinádorová aktivita protizánětlivý účinek sedativní účinek tracheobronchiální relaxace, závislá na koncentraci	[49] [39] [46] [43] [43] [47] [40] [41] [43] [48] [42]
	Verticinon-3-β-D-glukosid	není popsána	
	Yibeinosid A	inhibice AChE i BuChE	[40]
	Yibeinosid B	není popsána	
	Yubeisid	není popsána	
	Zhebeinosid	není popsána	
Jervinový typ	Peimisin	inhibice ACE I	[47]
Veratraminový typ	Pukvienin A	antihypertenzivní efekt slabá inhibice AChE i BuChE	[50] [40]
	Pukvienin B	antihypertenzivní efekt slabá inhibice AChE i BuChE	[50] [40]

Tab. 4 pokračování

Typ steroidního alkaloidu	Název alkaloidu	Biologická aktivita	Citace
Veratraminový typ	Pukvienin C	není popsána	
	Pukvienin D	není popsána	
	Pukvienin E	antihypertenzivní efekt	[50]
	Pukvienin F	není popsána	
Sekosolanidinový typ	<i>N</i> -demethylpukvietinon	selektivní inhibice AChE	[40]
	Pingbeininosin	není popsána	
	Pukvietinedinon	není popsána	
	Pukvietinon	antimuskarinový účinek slabá inhibice AChE i BuChE protinádorová aktivita tracheobronchiální relaxace, závislá na koncentraci	[46] [40] [41] [42]
	Pukvietinonosid	slabá inhibice AChE i BuChE	[40]
Solanidinový typ	Solanidin	inhibice AChE i BuChE, větší selektivita k BuChE závislá na koncentraci	[51]

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 OBECNÉ METODY

4.1.1 Příprava a čištění rozpouštědel

Všechny druhy rozpouštědel byly přečištěny procesem destilace komerčních rozpouštědel, hlavní frakce byla jímána dle tabelárně stanoveného bodu varu [52]. Touto cestou bylo predestilováno max. 90 % objemu rozpouštědla.

4.1.2 Odpařování extraktů a jejich uchování

Ethanolové (sumární) a ethyl-acetátové (alkaloidní) extrakty vzorků drog byly odpařovány na vakuové odparce při maximální teplotě 40 °C.

Takto připravené odparky extraktů určené pro změření biologické aktivity byly přeplněny do injekčních ampulek o objemu 5 ml a následně rychle odpařovány na vodní lázni při teplotě do 60 °C v proudu filtrovaného vzduchu. Po odpaření rozpouštědel byly ampulky vloženy do exsikátoru a dále sušeny ve vakuu (1,33 kPa, 24 hod.) nad perlami silikagelu. Nakonec byly ampulky naplněny argonem, zataveny a do doby analýzy uchovávány při teplotě -22 °C.

4.1.3 Rostlinný materiál

Rostlinný materiál byl získán nákupem dle následujících údajů:

Tab. 5 Přehled rostlinného materiálu

Číslo*	Taxon	Morfolog. část	Původ
AL-224	<i>F. camtschatcensis</i>	cibule	Lukon Bulbs Lovčice, 11-10-05
AL-218	<i>F. eduardii</i>	cibule	Lukon Bulbs Lovčice, 11-10-05
AL-226	<i>F. elwesii</i>	cibule	Lukon Bulbs Lovčice, 11-10-05
AL-227	<i>F. graeca</i>	cibule	Lukon Bulbs Lovčice, 11-10-05
AL-217	<i>F. hermonis</i> var. <i>amana</i>	cibule	Lukon Bulbs Lovčice, 11-10-05
AL-050	<i>F. imperialis</i>	nať	Lindava, 10-04-25
AL-223	<i>F. meleagris</i> var. <i>alba</i>	cibule	Lukon Bulbs Lovčice, 11-10-05
AL-222	<i>F. michailovskyi</i>	cibule	Lukon Bulbs Lovčice, 11-10-05
AL-220	<i>F. minuta</i>	cibule	Lukon Bulbs Lovčice, 11-10-05
AL-088	<i>F. ussuriensis</i>	cibule	Pragon, 2010

* číslo vzorku z katalogizace pracovní skupiny ADINACO Group

4.1.4 Příprava extraktů [53]

Suchá rostlinná část byla pokrájena na drobné částice (cca 1 – 2 mm). Do Erlenmayerovy baňky byla nasypána odvážená rozdrobněná droga, která byla přelita 95% ethanolem (EtOH) tak, aby droga byla ponořená a nad ní alespoň 3 cm kapaliny. Do baňky byl vložen varný kamínek a droga byla podrobena extrakci EtOH za varu po dobu 15 minut od začátku varu. Poté byla baňka vyjmuta z vodní lázně a ponechána asi 15 minut zchladnout, droga se usadila u dna a zbylá tekutina byla přefiltrována přes silnější vliselinový filtr. Toto vyvaření bylo opakováno dvakrát. Následně bylo k sedlině v baňce přidáno takové množství EtOH, aby byla matolina právě překryta rozpouštědlem a vzniklá suspenze byla sonikována 10 minut na ultrazvukové lázni SONOREX při normální teplotě a stupni sonikace 10. Směs byla opět zfiltrována přes vliselin. Spojené filtráty byly nakonec zfiltrovány přes vrstvu křemeliny ve filtračním tubusu. Čirý filtrát byl odpařením na vakuové odparce zahuštěn zhruba na desetinu objemu. Pasteurovou pipetou bylo odebráno tolik roztoku, aby po odpaření vážil odparek 8 – 10 mg. Extrakt byl odpařen v ampulce obvyklým způsobem (proudem vzduchu z Pasteurovy pipety) při maximální teplotě 40 °C (označení odparku S).

Hlavní část ethanolového extraktu v baňce (zbytek) byla zahuštěna do řídkého stavu, k ní bylo přidáno asi 10 ml vody a přebytečný EtOH byl odpařen na odparce. Odparek ethanolového extraktu byl smíchán s 10 – 20 ml 2% H₂SO₄ (dle množství odparku). Baňka s touto suspenzí byla vložena do ultrazvukové lázně SONOREX a podrobena pětiminutové sonikaci při normální teplotě a stupni sonikace 10. Občas bylo nutné s baňkou v lázni kroužit, aby došlo k odstranění částic ulpívajících na stěnách. Kalná tekutina byla zfiltrována přes malý tubus a nízkou vrstvu křemeliny (cca 3 mm), která byla nejprve promyta vodou. Poté byla baňka vypláchnuta 10 ml vody a tento výplach byl zfiltrován přes stejný tubus. Získaný roztok musel být čirý nebo téměř čirý, nikoliv kalný. Tento čirý kyselý filtrát byl doplněn vodou do celkového množství 40 – 50 ml a poté byl vytřepán dvakrát ¼ svého objemu předestilovaným a nestabilizovaným Et₂O pro odstranění nežádoucích látek (silice, lipidy apod.). Etherová vrstva byla ostře oddělena a odstraněna. Vodná kyselá vrstva byla zalkalizována 10% Na₂CO₃ na pH cca 10 (univerzální pH papírek) a vytřepána třikrát ¼ svého objemu předestilovaným ethyl-acetátem (EtOAc). Ethyl-acetátová fáze byla ostře oddělena, organické výtřepky byly spojeny v zabroušené baňce minimální potřebné velikosti, bylo přidáno malé množství (2 – 5 g) bezvodého Na₂SO₄ a roztok byl vysušen; soustavu bylo nutné nechat asi 30 minut stát, občas protřepat. Poté byl ethyl-acetátový roztok alkaloidů

zfiltrován ve filtračním tubusu přes malou vrstvu vaty a čirý filtrát byl jímán do zvážené baňky a odpařen na vakuové odparce při minimální teplotě (40 °C) dosucha. Pak byl odparek zvážen, rozpuštěn v malém množství odměřeného EtOAc (2 ml) a rozplněn do injekčních ampulek. Rozpouštědlo bylo z ampulek odstraněno obvyklým způsobem, ampulky byly podrobeny sušení po dobu minimálně 16 hodin ve vakuovém exsikátoru nad perlami silikagelu a poté zváženy (označení odparku B).

4.1.5 Chemikálie, rozpouštědla a přístroje pro přípravu extraktů

Rozpouštědla:

Diethylether č. destilovaný bez stabilizátoru (Et₂O)

Ethanol č. 95%, denaturovaný methanolem (EtOH)

Ethyl-acetát č. (EtOAc)

Chemikálie:

Argon

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

Kyselina sírová 2% (w/w)

Silikagel sušící perly

Síran sodný bezvodý č.

Uhličitan sodný 10% roztok (w/w)

Přístroje:

Ultrazvuková lázeň SONOREX 10P

Vakuová odparka Büchi

4.2 STANOVENÍ CHOLINESTERASOVÉ AKTIVITY (VČ. PŘÍPRAVY ERYTROCYTÁRNÍCH POUZDER)

4.2.1 Chemikálie, materiál a přístroje

Chemikálie:

Acetylthiocholin jodid (Sigma-Aldrich) (dále použit 10mM roztok)

Butyrylthiocholin jodid (Sigma-Aldrich) (dále použit 10mM roztok)

Dimethylsulfoxid p. a. (Sigma-Aldrich)

5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina $\geq 98\%$ (Sigma-Aldrich) (dále použit 5mM roztok)

Galanthamin hydrobromid (Changsha Organic Haerb Inc., China)

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

Eserin (Sigma-Aldrich)

Pufry:

5mM fosfátový pufr pH 7,4

Zásobní roztok A

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

Zásobní roztok B

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

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

5mM fosfátový pufr pH 7,4 obsahující 150 mM chloridu sodného

8,766 g chloridu sodného p. a. bylo rozpuštěno v 5mM fosfátovém pufru pH 7,4 a bylo jím doplněno do 1000 ml.

100mM fosfátový pufr, pH 7,4

Zásobní roztok A

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

Zásobní roztok B

200mM roztok Na₂HPO₄ (v 1 litru roztoku je obsaženo 28,4 g Na₂HPO₄, nebo 35,6 g Na₂HPO₄·2 H₂O, nebo 71,63 g Na₂HPO₄·12 H₂O).

Bylo smícháno 57 ml roztoku A a 243 ml roztoku B a 300 ml vody.

Přístroje:

Centrifuga Avanti J-301, rotor JA-30.50

Centrifuga Boeco U-32R, rotor Hettich 1611

Reader Synergy HT (BioTek)

4.2.2 Metodika stanovení cholinesterasové inhibiční aktivity (IC₅₀)

Pro určení hodnoty IC₅₀ byla uplatněna Ellmanova spektrofotometrická metoda s použitím 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoové kyseliny (DTNB) [54]. Jako substráty byly použity estery thiocholinu, které byly prostřednictvím ChE štěpeny na thiocholin a příslušnou kyselinu. Stanovována byla SH-skupina thiocholinu, která se navázala na DTNB za vzniku žlutě zbarveného produktu, který byl zjišťován spektrofotometricky při vlnové délce 412 nm (Reader Synergy HT). Byl sledován nárůst absorpance za 1 minutu.

4.2.2.1 Biologický materiál

Jako zdroj AChE byla použita pouzdra lidských erytrocytů. Zdrojem BuChE byla lidská plazma.

Erytrocytární pouzdra byla připravena z čerstvě odebrané krve zdravých dobrovolníků, ke které byl přidán 1 ml citrátu sodného na 9 ml krve podle upravené metody Stecka a Kanta [55]. Plná krev byla zbavena plazmy centrifugací při rychlosti 4000 ot.min⁻¹ při teplotě 10 °C za použití centrifugy Boeco U-32R s rotorem Hettich 1611. Erytrocyty byly přeplněny do 50ml zkumavek a třikrát promyty 5mM fosfátovým pufrům (pH 7,4) obsahujícím 150 mM chloridu sodného (12 000 ot.min⁻¹, centrifuga Avanti J-301, rotor JA-30.50). Promyté erytrocyty byly míchány s 5mM fosfátovým pufrům (pH 7,4) po dobu 10 minut, v důsledku čehož došlo k jejich lýze. Následně byly centrifugovány rychlostí 20 000 ot.min⁻¹ při teplotě 10 °C a vzniklá pouzdra byla třikrát promyta fosfátovým pufrům.

Preparátem s obsahem BuChE je plazma získaná po odstranění erytrocytů.

4.2.2.2 Stanovení enzymové aktivity

Oba enzymové preparáty byly podrobeny analýze na aktivitu za použití obvyklých substrátů (acetylthiocholinu pro AChE, butyrylthiocholinu pro BuChE); pro měření musely být použity takové preparáty, které měly $A = 0,08 - 0,15$ (AChE – erytrocytární pouzdra) a $A = 0,15 - 0,20$ (BuChE – plazma). Jestliže by měly primární enzymové preparáty aktivitu vyšší, musely by být naředěny potřebným množstvím 5mM fosfátového pufru pH 7,4.

Toto stanovení bylo provedeno následujícím způsobem: do 6 jamek mikrotitrační destičky bylo napipetováno 8,3 μ l plazmy nebo pouzder lidských erytrocytů, bylo přidáno 283 μ l DTNB, 8,3 μ l DMSO, směs byla promíchána po dobu 1 minuty na třepačce, ponechána 5 minut inkubovat, potom bylo do všech jamek napipetováno 33,3 μ l roztoku příslušného substrátu (acetyl- nebo butyrylthiocholinu) a po 1 minutě byla měřena absorbance (A) roztoku. Pokud byla absorbance mimo oblast výše uvedených hodnot, bylo provedeno příslušné měření.

4.2.2.3 Stanovení inhibiční aktivity extraktů

U měřených extraktů bylo do jamek mikrotitračních destiček napipetováno 8,3 μ l plazmy nebo pouzder lidských erytrocytů, bylo přidáno 283 μ l DTNB, 8,3 μ l roztoku extraktů v DMSO o klesající koncentraci (přidávané roztoky extraktů byly použity v koncentraci 20,0; 10,0; 2,0; 1,0; 0,2 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$, případně nižší). Pro referenční vzorek bylo pipetováno 8,3 μ l DMSO. Směs byla promíchána po dobu 1 minuty na třepačce při 37 °C, potom bylo do všech jamek napipetováno 33,3 μ l roztoku příslušného substrátu (acetyl- nebo butyrylthiocholinu). Měření bylo prováděno při teplotě 37 °C, vlnové délce 436 nm (erytrocytární pouzdra) nebo 412 nm (plazma) v kinetickém modu po dobu 1 minuty. Bylo provedeno 6 měření. Výpočet IC_{50} byl proveden za použití programu GraphPad Prism (verze 3.02 pro Windows; výrobce Graph PaD Software, San Diego, CA, USA).

Cholinesterasová inhibiční aktivita byla srovnávána s referenčními látkami (galanthaminem, huperzinem A, eserinem).

Hodnoty IC_{50} byly vypočítány z naměřených hodnot poklesu aktivity AChE nebo BuChE nelineární regresí v programu GraphPaD Prism. Výsledky byly porovnány s hodnotami IC_{50} známých inhibitorů ChE: galanthaminem, huperzinem A a eserinem. Procenta inhibice (% I) byla počítána dle vzorce $\% I = 100 - (\Delta A_{\text{BL}} / \Delta A_{\text{SA}}) * 100$, kde ΔA_{BL} je nárůst absorbance slepého vzorku za 1 minutu a ΔA_{SA} je nárůst absorbance měřeného vzorku.

5 VÝSLEDKY

5.1 STANOVENÍ HODNOT IC₅₀

Tab. 6 Cholinesterasová aktivita ethyl-acetátových extraktů

Číslo	Taxon	IC ₅₀ AChE*	IC ₅₀ BuChE*
AL-224	<i>F. camtschatcensis</i>	185,4 ± 19,7	6,8 ± 0,71
AL-218	<i>F. eduardii</i>	92,23 ± 8,4	15,3 ± 1,6
AL-226	<i>F. elwesii</i>	> 500	39,4 ± 4,1
AL-227	<i>F. graeca</i>	153,7 ± 16,2	10,7 ± 1,09
AL-217	<i>F. hermonis</i> var. <i>amana</i>	130,1 ± 12,2	14,8 ± 1,5
AL-050	<i>F. imperialis</i>	97,3 ± 10,1	6,4 ± 0,51
AL-223	<i>F. meleagris</i> var. <i>alba</i>	128,0 ± 11,4	0,93 ± 0,11
AL-222	<i>F. michailovskyi</i>	87,8 ± 9,1	3,0 ± 0,28
AL-220	<i>F. minuta</i>	178,2 ± 15,6	15,3 ± 1,43
AL-088	<i>F. ussuriensis</i>	277,6 ± 31,2	51,8 ± 5,2

*hodnoty inhibičních aktivit jsou uváděny v µg/ml

Tab. 7 Cholinesterasová aktivita standardních látek

Látka	IC ₅₀ AChE		IC ₅₀ BuChE	
	µg/ml	µM	µg/ml	µM
Galanthamin	0,491 ± 0,019	1,710 ± 0,065	12,155 ± 0,374	42,30 ± 1,30
Huperzin A	0,008 ± 0,0002	0,033 ± 0,001	> 242,3	> 1000
Eserin	0,017 ± 0,0003	0,063 ± 0,001	0,036 ± 0,001	0,130 ± 0,004

6 DISKUSE

Rostliny rodu *Fritillaria* sp. jsou více než dva tisíce let součástí tradiční čínské medicíny. Uplatňují se především jako významná antitussika a expektorancia. Některé druhy dokonce najdeme v Čínském lékopise, konkrétně *F. thunbergii* a *F. cirrhosa* (může zahrnovat též *F. unibracteata*, *F. przewalskii* a *F. delavayi*). V Indii, Japonsku a Turecku jsou tyto rostliny využívány v lidovém léčitelství [33]. V současnosti jsou druhy rodu *Fritillaria* sp. a jejich biologické účinky dále studovány a ověřovány.

Tab. 8 Uplatnění jednotlivých druhů rodu *Fritillaria* sp. ve fytoterapii [33]

Rostlina	Droga	Použití
<i>F. cirrhosa</i>	cibule	antitussikum, expektorans
	rozemletá celá rostlina	antiseptikum
	mast obsahující celou rostlinu	zmírnění bolestí břicha
	odvar z cibulí	antipyretikum
<i>F. delavayi</i>	cibule	antitussikum, expektorans antiflogistikum
<i>F. ebeiensis</i>	cibule (alkaloidní frakce ze sušených cibulí)	protinádorová aktivita
<i>F. ebeiensis</i> var. <i>purpurea</i>	cibule	antitussikum, expektorans
<i>F. hupehensis</i>	cibule	antitussikum, expektorans
<i>F. imperialis</i>	cibule (EtOH extrakt)	antibakteriální účinek digestivum emolliens
<i>F. karelinii</i>	cibule	antitussikum, expektorans
<i>F. ningguoensis</i>	cibule	antitussikum, expektorans
	extrakt z cibulí připravený horkou vodou	antiseptikum
<i>F. pallidiflora</i>	cibule	antitussikum, expektorans
<i>F. przewalskii</i>	cibule	antitussikum, expektorans
<i>F. puqiensis</i>	cibule	antitussikum, expektorans

Tab. 8 pokračování

Rostlina	Droga	Použití
<i>F. roylei</i>	extrakt z cibulí připravený horkou vodou	antituberkulotikum
	čaj z čerstvých cibulí	léčba astmatu
	extrakt ze sušené rostliny připravený horkou vodou	antipyretikum náhražka při nedostatku mléka
	extrakt ze sušené rostliny	zmírnění silných porodních bolestí
<i>F. thunbergii</i>	cibule	antitussikum, expektorans
<i>F. thunbergii</i> var. <i>chekiangensis</i>	cibule	antitussikum, expektorans
	odvar ze sušených cibulí	antihypertenzivum
<i>F. unibracteata</i>	cibule	antitussikum, expektorans
<i>F. ussuriensis</i>	cibule	antitussikum, expektorans
<i>F. verticillata</i> var. <i>thunbergii</i>	cibule	antipyretikum sedativum laktagogum zmírnění silných porodních bolestí
<i>F. wabuensis</i>	cibule	antitussikum, expektorans
<i>F. walujewii</i>	cibule	antitussikum, expektorans

Hlavním cílem mé práce bylo stanovení inhibiční aktivity extraktů z deseti vybraných druhů rodu *Fritillaria* sp. na lidskou AChE a BuChE. Výsledné hodnoty ukazují na celkově slabší inhibici AChE a silnější inhibici BuChE. Nejvyšší inhibiční aktivita byla naměřena u extraktů z těchto druhů: *F. camtschatcensis*, *F. imperialis*, *F. meleagris* var. *alba* a *F. michailovskyi*. Vyšší selektivita k BuChE u *F. imperialis* odpovídá výsledkům již provedené studie [34].

Z *F. imperialis* bylo izolováno pět steroidních alkaloidů s inhibiční aktivitou zejména vůči BuChE – impericin, forticin, delavin, persikanidin A a imperialin jako nejslabší inhibitor BuChE [34]. Vysokou selektivitu k BuChE mají rovněž steroidní alkaloidy

hupeheninosid a chuanbeinon. Naopak silným inhibítozem AChE je *N*-demethylpukvietinon. Téměř shodnou inhibiční aktivitu k oběma ChE vykazují ebeiedinon a yibeinosid A [40]. Tyto alkaloidy se vyskytují ve více druzích rodu *Fritillaria* sp. (viz Tab. 3). *F. camtschaticensis* obsahuje solanidin [38], který je společně s α -solaninem a α -chaconinem znám jako inhibitor AChE a BuChE, s vyšší selektivitou k BuChE závislou na koncentraci [51].

Poměrně výrazný inhibiční efekt proti BuChE byl sledán u extraktů z cibulí *F. meleagris* var. *alba* a *F. michailovskyi*. U *F. meleagris* var. *alba* by se na této aktivitě mohl teoreticky podílet imperialin, který byl prokázán u *F. meleagris* [56], jeho inhibiční účinek však není nijak zásadní. Tyto dva druhy nebyly z hlediska obsahových látek a biologické aktivity doposud zkoumány. Vysoké hodnoty IC₅₀ extraktů z nich získaných by se mohly stát důvodem k bližšímu studiu těchto druhů. S určitou pravděpodobností mohou být účinnými látkami vykazujícími silnou inhibici BuChE steroidní alkaloidy chuanbeinon, hupeheninosid, impericin a delavin, jak vyplývá z údajů literatury [34, 40].

7 LITERATURA

1. <http://21stoleti.cz/blog/2010/04/17/civilizacni-nemoci-od-a-do-z/>, staženo 3. dubna 2013.
2. Jirák R. a kol.: *Demence*. Maxdorf, Praha 1999.
3. Jirák R. a kol.: *Demence a jiné poruchy paměti*. Grada Publishing, Praha 2009.
4. Koukolík F., Jirák R.: *Alzheimerova nemoc a další demence*. Grada Publishing, Praha 1998.
5. Hort J., Rusina R.: *Paměť a její poruchy*. Maxdorf, Praha 2007.
6. Topinková E., v knize: *Klinická farmacie I.* (Vlček J., Fialová D., ed.), kap. 7.3 Grada Publishing, Praha 2010.
7. Bednařík J., Ambler Z., Růžička E.: *Klinická neurologie*. Triton, Praha 2010.
8. Jirák R., Koukolík F.: *Demence*. Galén, Praha 2004.
9. Opletal L.: Látky používané při neurodegenerativních onemocněních. Přednáška pro pregraduální studenty, předmět Potravní doplňky, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Hradec Králové 2011.
10. Koukolík F., Jirák R.: *Diagnostika a léčení syndromu demence*. Grada Publishing, Praha 1999.
11. Raboch J., Zvolský P.: *Psychiatrie*. Galén, Praha 2001.
12. Raboch J., Pavlovský P.: *Klinická psychiatrie v denní praxi*. Galén, Praha 2008.
13. Jirák R.: Farmakoterapie demencí. *Prakt. lékař. 4*, 286 (2008).
14. Jirák R.: Farmakoterapie Alzheimerovy choroby. *Prakt. lékař. 5*, 176 (2009).
15. Tilšer I.: Léčba demencí (kognitiva, antidementiva) 2012. Přednáška pro pregraduální studenty, předmět Farmakologie, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Hradec Králové 2012.
16. Martin J., Kršková Z., Dušek J.: Huperzin A a jiné přírodní látky v léčbě Alzheimerovy choroby. *Prakt. lékař. 7*, 39 (2011).
17. Wang R., Yan H., Tang X. C.: Progress in studies of huperzine A, a natural cholinesterase inhibitor from Chinese herbal medicine. *Acta Pharmacol. Sin.* 27, 1 (2006).
18. He X. C., Feng S., Wang Z. F., Shi Y., Zheng S., Xia Y., Jiang H., Tang X. C., Bai D.: Study on dual-site inhibitors of acetylcholinesterase: Highly potent derivatives of bis- and bifunctional huperzine B. *Bioorg. Med. Chem.* 15, 1394 (2007).

19. Atta-ur-Rahman, Zaheer-ul-Haq, Asaad Khalid, Shazia Anjum, M. Riaz Khan, M. Iqbal Choudhary: Pregnane-type steroidal alkaloids of *Sarcococca saligna*: A new class of cholinesterase inhibitors. *Helv. Chim. Acta* *85*, 678 (2002).
20. Shiomi K., Tomoda H., Ootoguro K., Omura S.: Meroterpenoids with various biological activities produced by fungi. *Pure Appl. Chem.* *71*, 1059 (1999).
21. Heo H. J., Hong S. C., Cho H. Y., Hong B., Kim H. K., Kim E. K., Shin D. H., Heo H. J.: Inhibitory effect of zeatin, isolated from *Fiatoua villosa*, on acetylcholinesterase activity from PC 12 cells. *Mol. Cells* *13*, 113 (2002).
22. Choi S. J., Jeong C. H., Choi S. G., Chun J. Y., Kim Y. J., Lee J. M., Shin D. H., Heo H. J.: Zeatin prevents amyloid β -induced neurotoxicity and scopolamine-induced cognitive deficits. *J. Med. Food* *12*, 271 (2009).
23. Opletal L., Opletalová V., Jun D., Kuča K.: Současné uplatnění některých přírodních látek v terapii demencí Alzheimerova typu. *34. konference: Syntéza a analýza léčiv; Brno 12. - 14. září 2005*, Sborník abstraktů (bez editora) str. 26, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 2005.
24. Wang Q., Yu X., Patal K., Hu R., Chuang S., Zhang G., Zheng J.: Tanshinones inhibit amyloid aggregation by amyloid- β peptide, disaggregate amyloid fibrils, and protect cultured cells. *ACS Chem. Neurosci.* v tisku, 2013.
25. Chung Y. K., Heo H. J., Kim E. K., Kim H. K., Huh T. L., Lim Y., Kim S. K., Shin D. H.: Inhibitory effect of ursolic acid purified from *Origanum majorana* L. on the acetylcholinesterase. *Mol. Cells* *11*, 137 (2001).
26. Wake G., Court J., Pickering A., Lewis R., Wilkins R., Perry E.: CNS acetylcholine receptor activity in European medicinal plants traditionally used to improve failing memory. *J. Ethnopharmacol.* *69*, 105 (2000).
27. Jia H., Jiang Y., Ruan Y., Zhang Y., Ma X., Zhang J., Beyreuther K., Tu P., Zhang D.: Tenuigenin treatment decreases secretion of the Alzheimer's disease amyloid beta-protein in cultured cells. *Neurosci. Lett.* *367*, 123 (2004).
28. Mansuco C., Siciliano R., Barone E., Preziosi P.: Natural substances and Alzheimer's disease: From preclinical studies to evidence based medicine. *Biochim. Biophys. Acta* *1822*, 616 (2012).
29. Thimmappa S. Anekonda, P. Hemachandra Reddy: Can herbs provide a new generation of drugs for treating Alzheimer's disease? *Brain Res. Rev.* *50*, 361 (2005).

30. Jahodář L.: *Farmakobotanika – semenné rostliny*. Karolinum, Praha 2006.
31. <http://cs.wikipedia.org/wiki/%C5%98eb%C4%8D%C3%ADk>, staženo 31. března 2013.
32. Zhou J. L., Xin G. Z., Shi Z. Q., Ren M. T., Qi L. W., Li H. J., Li P.: Characterization and identification of steroidal alkaloids in *Fritillaria* species using liquid chromatography coupled with electrospray ionization quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.* 1217, 7109 (2010).
33. Saklani A., Sahoo M. R., Kutty S. K.: The genus *Fritillaria* (Liliaceae): A review of its phytochemical and pharmacological perspectives. *Int. J. Res. Phytochem. Pharmacol.* 1, 96 (2011).
34. Atta-ur-Rahman, Akhtar M. N., Choudhary M. I., Tsuda Y., Sener B., Khalid A., Parvez M.: New steroidal alkaloids from *Fritillaria imperialis* and their cholinesterase inhibiting activities. *Chem. Pharm. Bull* 50, 1013 (2002).
35. Cao X., Zhang M., Li J., Xiao P., Chen S., Chen Sh.: Alkaloid constituents of *Fritillaria cirrhosa*. *Zhongcaoyao* 40, 15 (2009).
36. Cao X. W., Chen S. B., Li J., Xiao P. G., Chen S. L.: Steroidal alkaloids from the bulb of *Fritillaria delavayi* Franch. (Liliaceae). *Biochem. Syst. Ecol.* 36, 665 (2008).
37. Lin G., Li P., Li S. L., Chan S. W.: Chromatographic analysis of *Fritillaria* isosteroidal alkaloids, the active ingredients of Beimu, the antitussive traditional Chinese medicinal herb. *J. Chromatogr. A.* 935, 321 (2001).
38. Mitsuhashi H., Nagai U., Endo T.: Constituents of *Fritillaria camtschaticensis*. *Chem. Pharm. Bull.* 17, 2370 (1969).
39. Xiao C., Zhao H., Li P., Xu G.: Antimicrobial activity (in vitro) of the constituents of bulbs of *Fritillaria*. *Zhongguo Yaoke Daxue Xuebao* 23, 188 (1992).
40. Lin B. Q., Ji H., Li P., Fang W., Jiang Y.: Inhibitors of acetylcholin esterase in vitro – screening of steroidal alkaloids from *Fritillaria* species. *Planta Med.* 72, 814 (2006).
41. Li P., Xu G., Xu L., Wang Y.: Active constituents of the bulbs of *Fritillaria ebeiensis* and their antitumor activity in mice. *Phytother. Res.* 9, 460 (1995).
42. Chan W. S., Li P., Kwan Y. W., Lin G.: In vitro tracheobronchial relaxation of *Fritillaria* alkaloids. *Zhongguo Tianran Yaowu* 9, 345 (2011).
43. Wang D., Zhu J., Wang S., Wang X., Ou Y., Wei D., Li X.: Antitussive, expectorant and anti-inflammatory alkaloids from *Bulbus Fritillariae Cirrhosae*. *Fitoterapia* 82, 1290 (2011).

44. Lin B. Q., Ji H., Li P., Jiang Y., Fang W.: Selective antagonism activity of alkaloids from bulbs *Fritillariae* at muscarinic receptors: Functional studies. *Eur. J. Pharmacol.* **551**, 125 (2006).
45. Wang D., Wang S., Chen X., Xu X., Zhu J., Nie L., Long X.: Antitussive, expectorant and anti-inflammatory activities of four alkaloids isolated from *Bulbus* of *Fritillaria wabuensis*. *J. Ethnopharmacol.* **139**, 189 (2012).
46. Zhou Y., Ji H., Li P., Jiang Y.: Antimuscarinic function of five *Fritillaria* alkaloids on guinea pig tracheal strips. *Zhongguo Yaoke Daxue Xuebao* **34**, 58 (2003).
47. Oh H., Kang D. G., Lee S., Lee Y., Lee H. S.: Angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory alkaloids from *Fritillaria ussuriensis*. *Planta Med.* **69**, 564 (2003).
48. Qian B., Xu H.: Studies on the antitussive and sedative activities of peimin and peiminine. *Yaoxue Xuebao* **20**, 306 (1985).
49. Xu F. Z., Chen C., Zhou X. Q., Wang L. J., He G. M.: Study on the analgesic effect and the physical dependence of verticinone. *Jinri Yaoxue* **18**, 4 (2008).
50. An J. J., Zhou J. L., Li H. J., Jiang Y., Li P.: Puqienine E: An angiotensin converting enzyme inhibitory steroidal alkaloid from *Fritillaria puqiensis*. *Fitoterapia* **81**, 149 (2010).
51. Nigg H. N., Ramos L. E., Graham E. M., Sterling J., Brown S., Cornell J. A.: Inhibition of human plasma and serum butyrylcholinesterase (EC 3.1.1.8) by α -chaconine and α -solanine. *Fundam. Appl. Toxicol.* **33**, 272 (1996).
52. Keil B.: *Laboratorní technika organické chemie*. Nakladatelství Akademie věd Československé republiky, Praha 1963.
53. Opletal L.: osobní sdělení.
54. Ellman G. L., Courtney K. D., Andres V. Jr, Feather-Stone R. M.: A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* **7**, 88 (1961).
55. Steck T. L., Kant J. A.: Preparation of impermeable ghosts and inside-out vesicles from human erythrocyte membranes. *Methods Enzymol.* **31**, 172 (1974).
56. Bauer Š., Masler L., Országh Š., Mokry J., Tomko J.: Alkaloidy z *Fritillaria meleagris*. *Chem. zvesti* **12**, 584 (1958).

ABSTRAKT

Mervartová, M.: Biologická aktivita obsahových látek rostlin XXIV. Vliv alkaloidů z některých druhů rodu *Fritillaria* L. na aktivitu acetylcholinesterasy a butyrylcholinesterasy. Diplomová práce, Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra farmaceutické botaniky a ekologie, Hradec Králové 2013, 60 s.

Bylo provedeno stanovení biologické aktivity extraktů na lidskou acetylcholinesterasu (AChE) a butyrylcholinesterasu (BuChE). Extrakty byly připraveny z deseti vybraných druhů rodu *Fritillaria* sp., které by mohly být perspektivní pro léčbu Alzheimerovy choroby: *F. camtschatcensis* (cibule), *F. eduardii* (cibule), *F. elwesii* (cibule), *F. graeca* (cibule), *F. hermonis* var. *amana* (cibule), *F. imperialis* (nať), *F. meleagris* var. *alba* (cibule), *F. michailovskyi* (cibule), *F. minuta* (cibule), *F. ussuriensis* (cibule).

Z každého rostlinného vzorku byl připraven sumární (ethanolický) a alkaloidní (ethyl-acetátový) extrakt. Sumární extrakt byl získán extrakcí rozemleté drogy 95% ethanolem a následným zahuštěním. Dalším rozpuštěním v 2% H₂SO₄, filtrací, alkalizací 10% Na₂CO₃ na pH cca 10 a vytřepáním alkaloidních bazí do ethyl-acetátu byl zhotoven alkaloidní extrakt.

Na základě Ellmanovy spektrofotometrické metody byla zjišťována inhibiční aktivita těchto extraktů na lidskou AChE (z erytrocytů) a BuChE (z plazmy) a pomocí výpočtu byly stanoveny hodnoty IC₅₀.

Silný inhibiční účinek na BuChE byl objeven u extraktů z *F. camtschatcensis*, *F. imperialis*, *F. meleagris* var. *alba* a *F. michailovskyi*. Jako zajímavé pro bližší výzkum se jeví *F. meleagris* var. *alba* a *F. michailovskyi*.

Klíčová slova: *Fritillaria* sp., alkaloidy, acetylcholinesterasa, butyrylcholinesterasa, inhibice.

ABSTRACT

Mervartová, M.: Biological activity of plant metabolites XXIV. Influence of alkaloids from some species of the genus *Fritillaria* L. on activity of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase. Diploma thesis, Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Department of Pharmaceutical botany and Ecology, Hradec Králové 2013, 60 s.

Biological activity of extracts to human acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BuChE) was carried out. Extracts were prepared from ten chosen species of the genus *Fritillaria* which could be perspective for the treatment of Alzheimer's disease: *F. camtschaticensis* (bulb), *F. eduardii* (bulb), *F. elwesii* (bulb), *F. graeca* (bulb), *F. hermonis* var. *amana* (bulb), *F. imperialis* (herb), *F. meleagris* var. *alba* (bulb), *F. michailovskyi* (bulb), *F. minuta* (bulb), *F. ussuriensis* (bulb).

Sumary (ethanol) and alkaloidal (ethylacetate) extract were prepared from each sample. The sumary extract was obtained by extraction of pulverized drug by 95% ethanol. The alkaloidal extract was made by following dissolution in 2% H₂SO₄, filtration, alkalization by 10% Na₂CO₃ on pH approx. 10 and final extraction of alkaloidal bases into ethylacetate.

The inhibitory activity of these extracts to human AChE (from red blood cells) and BuChE (from plasma) was detected based on Ellman's spectrophotometric method and then IC₅₀ values were determined by calculation.

Extracts of *F. camtschaticensis*, *F. imperialis*, *F. meleagris* var. *alba* and *F. michailovskyi* showed strong inhibition of BuChE. *F. meleagris* var. *alba* and *F. michailovskyi* could be interesting for further study.

Key words: *Fritillaria* sp., alkaloids, acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase, inhibition.