

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Katedra fyziologie živočichů a vývojové biologie



Imunosupresivní a protizánětlivé účinky
triterpenoidních sloučenin

Pavla Spáčilová

Bakalářská práce
Molekulární biologie a biochemie organismů

Praha 2007

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením školitele doc. MUDr. Mariána Hajdúcha, Ph.D. a školitele-konzultanta doc. Mgr. Jana Černého, Ph.D. a že jsem všechny použité prameny řádně citovala.

V Praze dne 30.4. 2007

.....
Marie Gáčlová

Podpis

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A BUNĚČNÝCH LINÍ

A549	lidský plicní karcinom	K-562	lidská myeloidní leukémie
Ac	acetyl	LT	leukotrien
B10R	myší makrofágy	Me	methyl
BSA	hovězí sérový albumin	MEL-2	lidský melanom
BT-549	lidský karcinom prsu	MIF	faktor inhibující migraci
CEM	lidská T-lymfoblastická leukémie	MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromid
COX	cyklooxygenáza	NF	jaderný faktor
DMEM	Dulbeccovo modifikované Eaglovo médium	NO	oxid dusnatý
DU145	lidský karcinom prostaty	OVCAR-3	lidský ovariální karcinom
Et	ethyl	PC-3	lidský karcinom prostaty
fMLP	formyl-methionylleucyl-fenylalanin	PG	prostaglandin
Glc	glukopyranosyl	PMA	forbol-12-myristát-13-acetát
GlcUA	glukuronopyranosyl	RAW 264.7	myší makrofágy
HFL1	lidské fetální plicní fibroblasty	RBL-2H3	potkaní bazofilní leukémie
HLE	lidská leukocytární elastáza	ROS	reaktivní formy kyslíku
IFN	interferon	Saos-2	lidský osteosarkom
IL	interleukin	SD	směrodatná odchylka
		TNF	tumor nekrotizující faktor

Poznámka k číslování

V této práci je použito dvojí číslování sloučenin. Látky zmiňované v teoretické části jsou označeny římskými číslicemi, látky testované v experimentální části jsou číslovány arabskými číslicemi.

OBSAH

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	3
OBSAH	4
ABSTRAKT	5
ABSTRACT	5
ÚVOD	6
TEORETICKÁ ČÁST	7
1. Protizánětlivé přírodní triterpenoidy	8
1.1 Boswellová kyselina a příbuzné kyseliny	8
1.2 Ursolová kyselina a oleanolová kyselina	10
1.3 Ginsenosidy a jiné saponiny	13
1.4 Betulin a betulinová kyselina	16
2. Syntetické triterpenoidní deriváty	18
2.1 Oleánanové a ursanové deriváty	18
2.2 Lupanové deriváty	19
2.3 Betulininy	21
3. Testování protizánětlivých účinků	22
3.1 Testování inhibice tvorby NO	22
3.2 Testování cytotoxického účinku pomocí MTT testu	23
EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	24
TABULKA VÝSLEDKŮ TESTOVÁNÍ	31
DISKUZE	33
ZÁVĚR	35
LITERATURA	36
PODĚKOVÁNÍ	43

ABSTRAKT

Tato práce podává přehled o přírodních a syntetických triterpenoidních derivátech s imunosupresivními a protizánětlivými účinky. Vlastní mechanismus jejich působení je různorodý. Jedná se o inhibici enzymů, transkripčních faktorů či inhibici tvorby tkáňových hormonů. V experimentální části byla sledována inhibice tvorby NO u myších makrofágů B10R stimulovaných lipopolysacharidem. Celkem bylo testováno padesát syntetických triterpenoidních derivátů s lupenovým, 18 α -oleananovým a des-E-lupanovým skeletem. Většina z nich inhibuje tvorbu NO, osm z testovaných sloučenin má terapeutický index větší než 5, z toho jedna sloučenina má terapeutický index vyšší než 10.

Klíčová slova: triterpenoidy, imunosupresivní, protizánětlivý, NO, inhibice

ABSTRACT

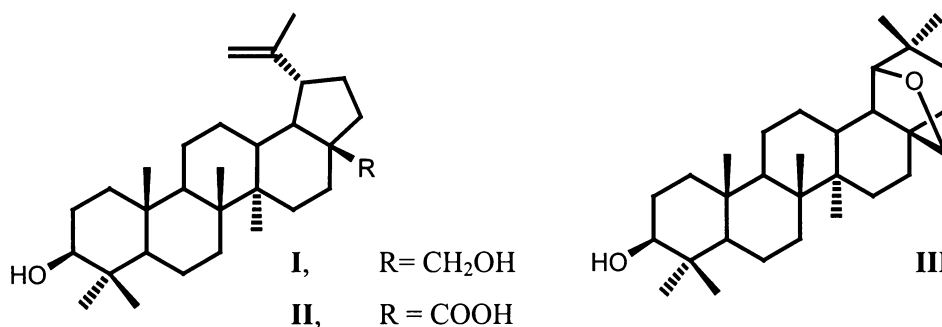
This thesis reviews immunosuppressive and anti-inflammatory effects of natural and synthetic triterpenoid derivatives. The mechanism of action is heterogenous over inhibition of enzymes, transcription factors or inhibition of tissue hormones synthesis. In experimental section of the thesis fifty triterpenoid derivatives of lupene, 18 α -oleanane and des-E-lupane skelet were tested for inhibition of NO synthesis in B10R mouse macrophages stimulated by lipopolysaccharide. Majority of tested derivatives inhibited NO synthesis, eight compounds showed therapeutic index value higher than 5, one had therapeutic index value higher than 10.

Key words: triterpenoids, immunosuppressive, anti-inflammatory, NO, inhibition

ÚVOD

V průběhu posledních dvou desetiletí byla objevena významná farmakologická aktivita u přírodních terpenických látek a jejich derivátů. Zejména deriváty lupanových, oleananových, ursanových, dammaran-eufanových a taraxasteranových triterpenoidů se vyznačují zajímavými biologickými účinky. Jejich účinky zahrnují nejen aktivitu protizánětlivou, imunomodulační, analgetickou, hepatoprotektivní, hypoglykemickou, hypolipidemickou, antimikrobiální, antimykotickou, virostatickou a tonizující, ale i aktivitu cytotoxickou (Džubák et al., 2006).

Doklady o užívání rostlin obsahujících triterpenoidy, jako jsou například *Panax ginseng*, *Ganoderma lucidum*, *Platycodon grandiflorum* či *Boswellia serrata*, jsou známy již z nejstarších léčebných postupů jako je Ayurveda, Siddha a Unani (Gupta, 1994). Triterpenoidní sloučeniny se vyskytují také v řadě běžných evropských rostlin. Betulin (I), obsažený v březové kůře (*Betula pendula*), kde tvoří až 30 % suché hmotnosti, a betulinová kyselina (II), vyskytující se v platanové kůře (*Platanus hispanica*), jsou zástupci triterpenických sloučenin snadno izolovatelných z přírodních zdrojů. U betulinové kyseliny (II) byla popsána zajímavá cytotoxická aktivita (Fulda et al., 1999), ale jsou známy také její účinky protizánětlivé (Bernard et al., 2001).



Na pracovišti RNDr. Jana Šarka, Ph.D. byla připravena skupina látek zvaných betulininy (Šarek et al., 2003). Jedná se sloučeniny odvozené od betulinu (I), kyseliny betulinové (II) a allobetulinu (III), jež vycházejí ze strukturních rysů lupanového, 18 α -oleananového a des-E-lupanového skeletu. Betulininy vykazují širokospektrální protinádorovou aktivitu vůči různým nádorovým liniím např. CEM, Mel-2, PC-3 aj. (Hajduch and Sarek, 2001). Vzhledem k širokému spektru známých biologických aktivit triterpenoidů jsou nyní u betulininů hledány další možnosti jejich terapeutického využití. Vedle studia anti-HIV aktivity a antimikrobiální aktivity se v neposlední řadě jedná o studium protizánětlivých aktivit připravených derivátů.

CÍLE BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

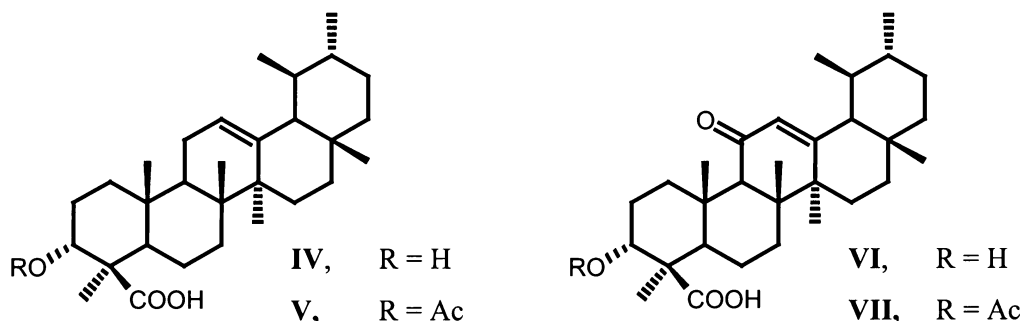
1. Provést literární rešerši protizánětlivých a imunosupresivních účinků triterpenoidů.
2. Provést screeningové testy protizánětlivé aktivity u vybraných triterpenoidních derivátů a vyvodit vztahy mezi strukturou a účinností.

TEORETICKÁ ČÁST

1. PROTIZÁNĚTLIVÉ PŘÍRODNÍ TRITERPENOIDY

1.1 Boswellová kyselina a příbuzné kyseliny

Stromy rodu *Boswellia* jsou využívány pro získávání kadidla, gumové pryskyřice, která byla odpradávná využívána k terapeutickým účelům (Safayhi et al., 1997). Surový extrakt z *Boswellia serrata* nazývaný „salai gugal“ se v Indii dodnes běžně používá při léčbě revmatoidní artritidy (Ammon et al., 1993). Účinnými látkami obsaženými v kadidle jsou β -boswellová kyselina (IV), acetyl- β -boswellová kyselina (V), 11-oxo- β -boswellová kyselina (VI) a acetyl-11-oxo- β -boswellová kyselina (VII) (Pozharitskaya et al., 2006).

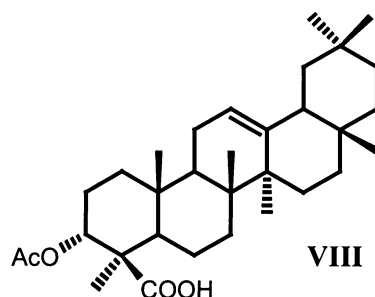


Bylo zjištěno, že ethanolický extrakt z *Boswellia serrata* inhibuje tvorbu leukotrienu B_4 u krysích peritoneálních neutrofilů (Ammon et al., 1991). Následné zkoumání jednotlivých boswellových kyselin v extraktu obsažených ukázalo, že jak β -boswellová kyselina (IV), tak i její deriváty V - VII snižují tvorbu leukotrienu B_4 u potkaních peritoneálních neutrofilů na základě inhibice 5-lipoxygenázy. Jako nejúčinnější inhibitor se ukázal derivát VII s hodnotou $IC_{50} = 1,5 \mu\text{mol/l}$ (Safayhi et al., 1992). Bylo prokázáno, že kyselina VII se váže přímo na molekulu 5-lipoxygenázy ve specifickém místě odlišném od místa navázání arachidonové kyseliny (Safayhi et al., 1995). Právě 5-lipoxygenáza je velmi významným enzymem v syntéze leukotrienů, jež jsou biologickými mediátory u astmatu, artritidy, ulcerózní kolitidy či Crohnovy choroby (Wasserman, 1983). Později bylo prokázáno, že boswellové kyseliny v koncentraci až $400 \mu\text{mol/l}$ neovlivňují u lidských krevních destiček ani aktivitu 12-lipoxygenázy, ani aktivitu cyklooxygenázy. Jsou tedy selektivními inhibitory 5-lipoxygenázy (Ammon et al., 1993).

Kromě inhibice 5-lipoxygenázy, která je bezpochyby hlavním mechanismem protizánětlivého účinku boswellových kyselin, byla popsána i inhibice lidské leukocytární elastázy (HLE) (EC 3.4.21.37) β -boswellovou kyselinou (IV) a kyselinou VII (Safayhi et

al., 1997). Negativní účinky enzymu HLE jsou podstatné při vzniku onemocnění jako jsou plicní emfysém, cystická fibróza, chronická bronchitida, glomerulonefritida či revmatoidní artritida (Bernstein et al., 1994).

Byl také studován vliv 3 α -acetyl-11-oxo- β -boswelové kyseliny (VII) a 3 α -acetyl- α -boswelové kyseliny (VIII) na tvorbu TNF- α v lidských lipopolysacharidem aktivovaných monocytech. Byla sledována jak exprese mRNA příslušející TNF- α , tak koncentrace TNF- α uvolněného do média. Obě kyseliny VII a VIII se ukázaly jako inhibitory syntézy TNF- α , přičemž kyselina VII, nesoucí 11-ketoskupinu, se ukázala jako lepší inhibitor (Syrovets et al., 2005). Ve stejné práci je popsána inhibice NF- κ B kyselinami V a VII pomocí přímé interakce s I κ B kinázami.



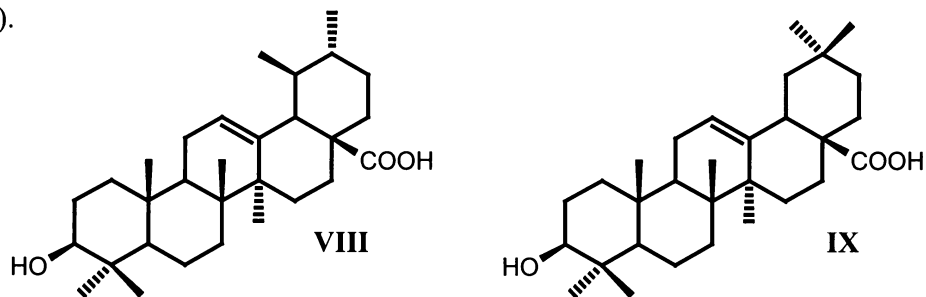
Velmi zajímavým výsledkem skončilo zkoumání vlivu podávání boswelové kyseliny (IV) na rejekci štěpu při allogenní transplantaci srdce u myši. Denní dávka 0,3 mg/kg podávaná žaludeční sondou prodloužila průměrnou dobu přežívání transplantátu z 8,4 dne u kontroly na 14,5 dne (Dahmen et al., 2001).

Boswelové kyseliny zasahují do signálních drah lidských neutrofilů. Bylo zjištěno, že aktivují MAP-kinázy p42^{MAPK} a p38. Aktivace je efektivnější u kyselin VI a VII, zatímco aktivace působením kyselin IV a V, které nemají 11-ketoskupinu, byla nižší. Také se ukázalo, že boswelové kyseliny IV - VII ovlivňují zvýšení intracelulární hladiny Ca²⁺ (Altmann et al., 2002).

Studium extraktu z *Boswellia carterii* (Chevrier et al., 2005) bylo zaměřeno na imunomodulační účinky *in vitro*. U myších splenocytů byl *in vitro* pozorován cytotoxický efekt, pokud byl jako rozpouštědlo extraktu použit ethanol. Pokud byl místo ethanolu použit sezamový olej, projeví se následující imunomodulační efekty: tvorba IL-2 a IFN- γ byla inhibována, naopak tvorba IL-4 a IL-10 vzrostla. Účinkem extraktu se tedy posilovala tvorba cytokinů stimulujících TH2 buňky.

1.2 Ursolová kyselina a oleanolová kyselina

Ursolová kyselina (**IX**) je v rostlinné říši široce rozšířená. Je přítomna ponejvíce v kutikule listů a plodů. Obsahují ji například léčivé rostliny jako rozmarýn *Rosmarinus officinalis* (Altinier et al., 2007) či šalvěj *Salvia officinalis*. Ursolová kyselina (**IX**) je hlavní protizánětlivou složkou šalvěže při léčbě kožních zánětů (Baricevic et al., 2001). Uvádí se, že slupka zralého jablka obsahuje 50 mg ursolové kyseliny (**IX**) (Fernandes et al., 1964).



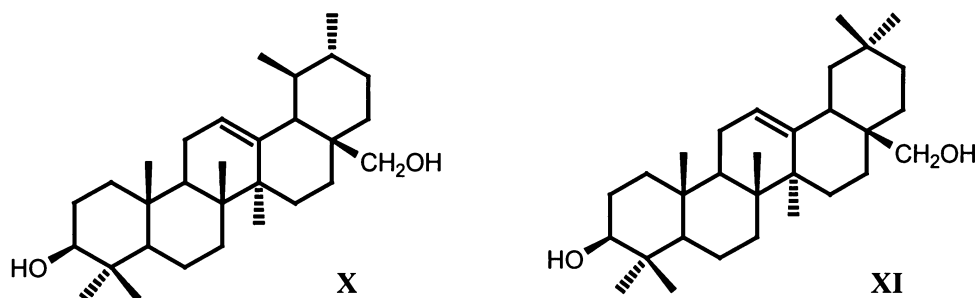
Strukturně podobná je oleanolová kyselina (**X**). Citace z roku 1995 uvádí, že byla dosud izolována z přibližně 120 rostlin, což svědčí o jejím širokém rozšíření. Jako zástupce rostlin obsahujících oleanolovou kyselinu (**X**) můžeme jmenovat například *Panax ginseng* nebo *Sambucus chinensis*, oba používané v tradiční čínské medicíně. (Liu, 1995).

Již v 60. letech 20. století byl popsán protizánětlivý účinek ursolové kyseliny (**IX**) vůči karagenanem indukovanému otoku tlapy u potkanů (Gupta et al., 1969). Mechanismus protizánětlivého účinku nespočívá v inhibici 5-lipoxygenázy (Safayhi et al., 1995).

Byl zkoumán vliv na syntézu prostaglandinů cyklooxygenázou COX-1 a COX-2 (EC 1.14.99.1). Ukázalo se, že ursolová kyselina (**IX**) stejně jako oleanolová kyselina (**X**) tuto syntézu inhibují. Obě kyseliny **IX** a **X** selektivně inhibují zvláště syntézu prostaglandinů cyklooxygenázou COX-2 s poměrem selektivity COX-2/COX-1 0,6 (resp. 0,8 u kyseliny **X**) (Ringbom et al., 1998). Ursolová kyselina (**IX**) zasahuje do syntézy eikosanoidů inhibicí transkripce cyklooxygenázy COX-2, která dává vzniknout prostaglandinu E₂. Enzym COX-2 je indukován vnějším faktorem, např. PMA, zatímco jeho izoenzym COX-1 je konstitutivním buněčným enzymem. Účinek ursolové kyseliny (**IX**) na indukci COX-2 byl zkoumán na lidských epitelových buňkách ošetřených PMA. Nejlepších výsledků bylo dosaženo při koncentraci ursolové kyseliny (**IX**) 30 μmol/l. Transkripce cyklooxygenázy COX-1 se působením ursolové kyseliny (**IX**) nezměnila (Subbaramiah et al., 2000). Pozdější zkoumání mechanismu působení ukázalo, že ursolová kyselina (**IX**) ovlivňuje jaderný faktor NF-κB. Inhibuje jeho aktivaci různými faktory

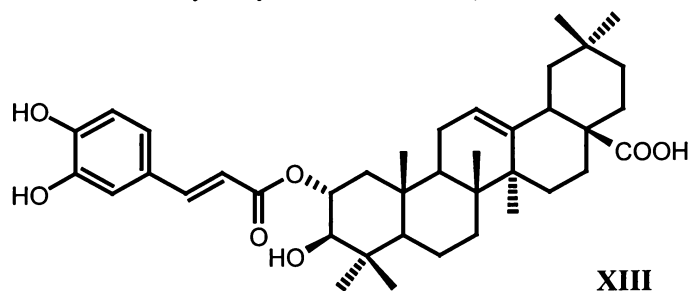
například TNF či forbolovými estery, s čímž přímo souvisí suprese tvorby cyklinu D1, cyklooxygenázy COX-2 a metaloproteinázy 9 (Shishodia et al., 2003).

Ursolová kyselina (**IX**) je také inhibítozem lidské leukocytární elastázy HLE. Její inhibiční konstanta K_i je rovna 4,4 $\mu\text{mol/l}$. Také oleanolová kyselina (**X**) inhibuje HLE ($K_i = 6,4 \mu\text{mol/l}$). Uvaol (**XI**), alkohol odvozený od ursolové kyseliny (**IX**), a erythrodiol (**XII**), alkohol odvozený od oleanolové kyseliny (**X**), mají slabší inhibiční účinek: $K_i = 15,7 \mu\text{mol/l}$ (resp. 17,3 $\mu\text{mol/l}$) (Ying et al., 1991).



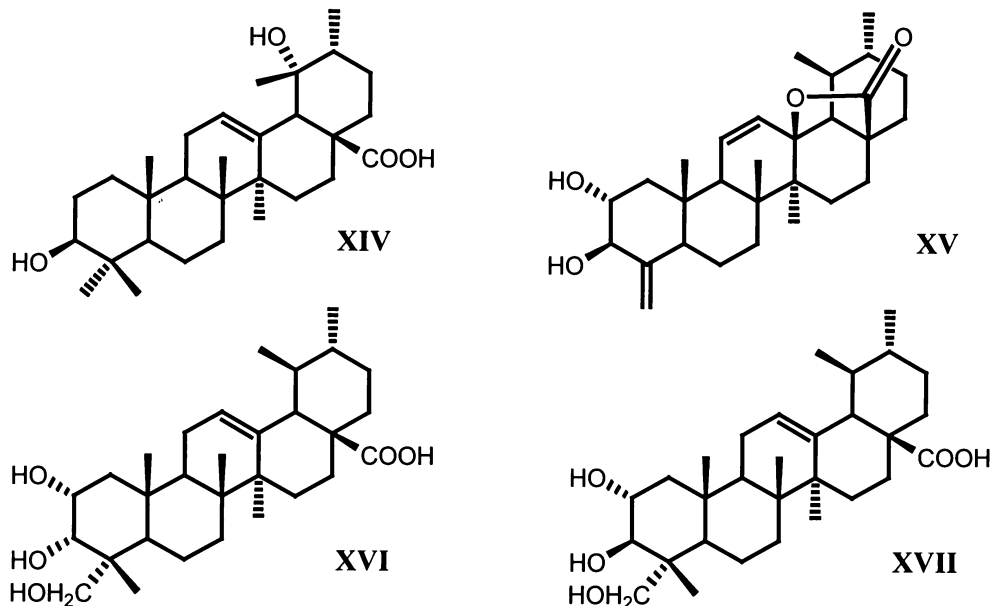
Bylo prokázáno, že ursolová kyselina (**IX**) *in vitro* inhibuje tvorbu reaktivních forem kyslíku (ROS). U lidských neutrofilů aktivovaných opsonizovaným zymosanem dosáhla ursolová kyselina (**IX**) izolovaná z *Leonurus cardiaca* hodnoty $IC_{50} = 140 \mu\text{mol/l}$, což je slibný výsledek vzhledem k tomu, že indomethacin a aspirin měly ve stejném testu hodnoty IC_{50} vyšší (246 $\mu\text{mol/l}$, resp. 518 $\mu\text{mol/l}$) (Ali et al., in press).

Při zkoumání vlivu inhibice indukované syntézy NO u myších makrofágů RAW 264.7 aktivovaných lipopolysacharidem a interferonem γ se ukázala oleanolová kyselina (**X**) izolovaná z *Hippophae rhamnoides* jako slabý inhibitor syntézy NO s hodnotou $IC_{50} = 40,2 \mu\text{mol/l}$. Strukturně blízký derivát **XIII**, který byl také z této rostliny izolován, je silným inhibítozem syntézy NO s $IC_{50} = 7,6 \mu\text{mol/l}$ (Yang et al., 2007).



Byla studována aktivita ursanových triterpenoidů izolovaných z *Weigela subsessilis* vůči komplementu. Ukázalo se, že sedm z osmi studovaných derivátů inhibovalo klasickou cestu komplementu. Nejlepšího výsledku dosáhla pomolová kyselina (**XIV**) s hodnotou $IC_{50} = 4 \mu\text{mol/l}$. Naopak jako zcela neúčinný se ukázal ilekudinol A (**XV**), který místo karboxylové funkce v poloze 28 obsahuje laktonový kruh. To svědčí o významu

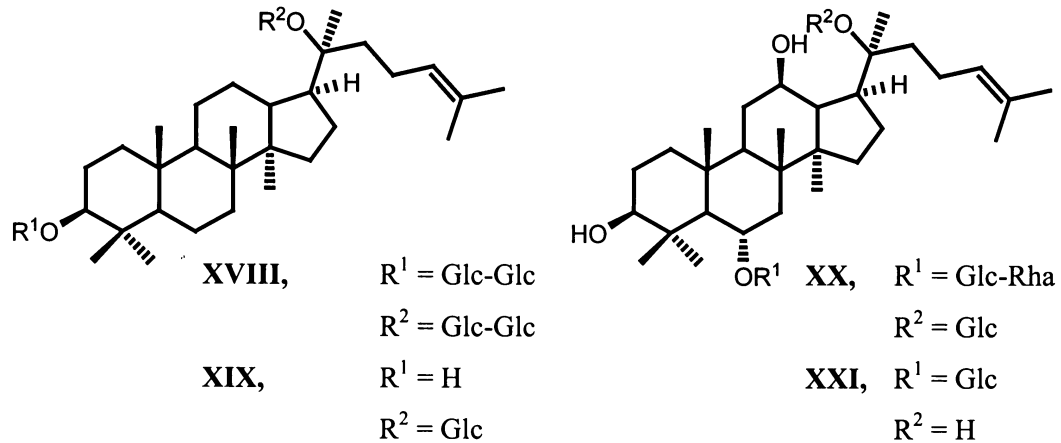
28-karboxylové skupiny u ursanových triterpenoidů pro aktivitu vůči komplementu. Rozdíl v aktivitě kyseliny **XVI** ($IC_{50} = 56 \mu\text{mol/l}$) a kyseliny **XVII** ($IC_{50} = 163 \mu\text{mol/l}$) zase ukazuje na to, že α -konfigurace hydroxylové skupiny v poloze 3 vede k vyšší aktivitě vůči komplementu (Thuong et al., 2006).



Překvapivým zjištěním je fakt, že u klidových myších makrofágů RAW 264.7 je působením ursolové kyseliny (**IX**) tvorba oxidu dusnatého aktivována. Současně je indukována exprese indukovatelné NO syntázy (EC 1.14.13.39) a tvorba TNF- α . Oxid dusnatý i TNF- α jsou prozánětlivé cytokiny, proto je jejich indukce právě ursolovou kyselinou (**IX**), tedy potenciálně protizánětlivou látkou, neobvyklá, i když se jedná o účinek na klidové makrofágy (You et al., 2001). Hypotéza rozdílného účinku ursolové kyseliny (**IX**) závislého na tom, v jakém stavu se makrofág právě nachází, vedla k dalšímu studiu účinku ursolové kyseliny (**IX**) na klidové makrofágy. V klidových myších makrofázích RAW 264.7 byla pozorována indukce syntézy migračního inhibičního faktoru (MIF). Tento cytokin je důležitý v regulaci aktivity jak makrofágů, tak T-lymfocytů. Indukuje například tvorbu TNF- α nebo aktivitu COX-2. Ukázalo se, že ursolová kyselina (**IX**) zvyšuje množství MIF uvolněného do média, ale nezvyšuje vnitrobuněčnou koncentraci mRNA MIF proteinu (Ikeda et al., 2005). Byla provedena i *in vivo* studie na myších sledující prozánětlivé účinky ursolové kyseliny (**IX**). Kůže myši byla senzitivována dimethylbenz[*a*]antracénem a PMA a ursolová kyselina byla aplikována lokálně. Byla pozorována signifikantní indukce COX-2 a TNF- α oproti kontrole (Ikeda et al., 2006). Studium výhod a rizik užívání ursolové kyseliny (**IX**) jako protizánětlivé substance je předmětem dalšího výzkumu.

1.3 Ginsenosidy a jiné saponiny

Nejznámějšími triterpenoidními glykosidy, tedy saponiny, jsou glykosidy zvané ginsenosidy R(x). Mají dammaranovou strukturu a vyskytují se např. ve všehoji lékařském (*Panax ginseng*). Dosud bylo izolováno již přes 25 ginsenosidů z červeného a bílého ginsengu (Džubák et al., 2004).

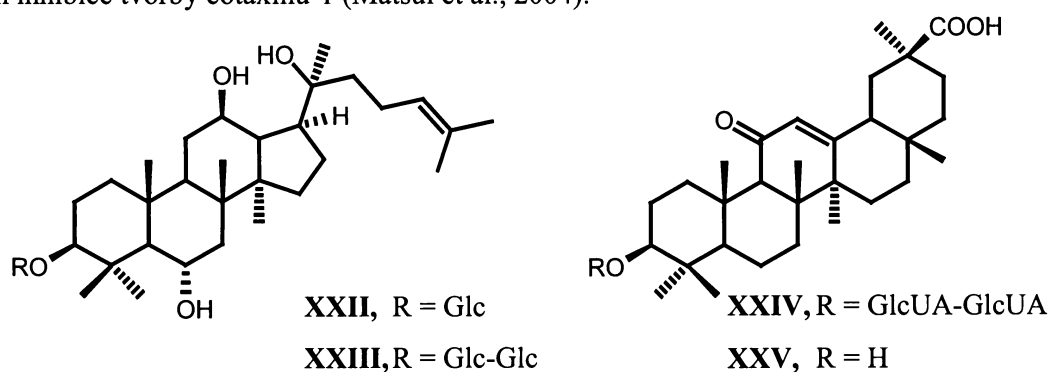


Hlavním saponinem kořene *Panax ginseng* je ginsenosid Rb₁ (**XVIII**). Jedná se o protopanaxadiolový derivát. V zažívacím traktu je tento glykosid štěpen za vzniku „sloučeniny K“ (**XIX**) (Yim et al., 2004). Tato sloučenina inhibuje *in vitro* tvorbu NO u myších makrofágů RAW 264.7 aktivovaných lipopolysacharidem s hodnotou IC₅₀ = 32 μmol/l. Sloučenina **XIX** také inhibuje tvorbu prostaglandinu E₂. Oba její inhibiční účinky spočívají v inhibici transkripce indukovatelné NO syntázy a cyklooxygenázy COX-2 prostřednictvím interakce s transkripčním faktorem NF-κB. U „mateřského“ ginsenosidu Rb₁ (**XVIII**) žádné inhibiční účinky pozorovány nebyly (Park et al., 2005).

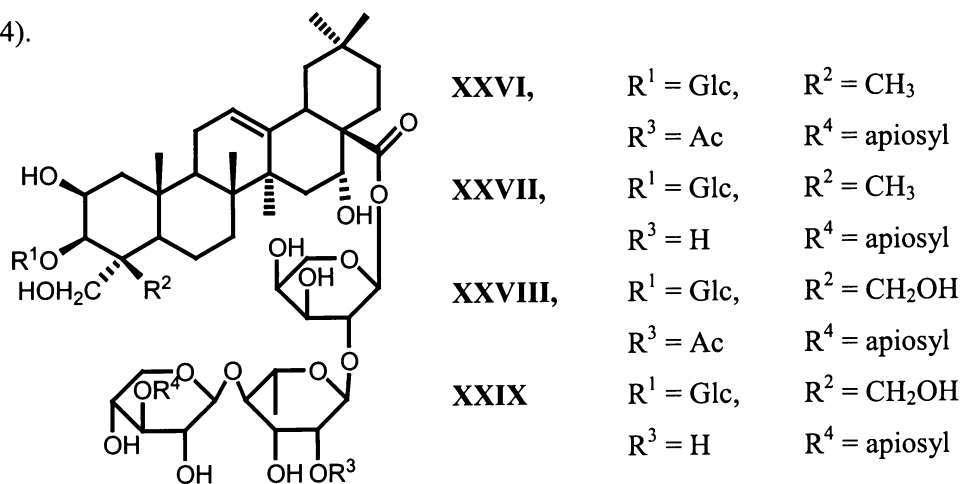
Podobně jsou i deriváty protopanaxatriolu, například ginsenosid Re (**XX**), v trávicím traktu štěpeny střevní mikroflórou na ginsenosid Rh₁ (**XXI**) (Bae et al., 2005). I u ginsenosidu Rh₁ (**XXI**) byla popsána inhibice syntézy indukované NO syntázy a cyklooxygenázy COX-2 (Park et al., 2004). U ginsenosidu Rh₂ (**XXII**), který vzniká štěpením ginsenosidu Rg₃ (**XXIII**), byla kromě inhibice syntézy indukované NO syntázy a cyklooxygenázy COX-2 popsána i inhibice uvolnění β-hexosaminidázy indukované pomocí IgE u buněk RBL-2H3, tedy účinek antialergický (Park et al., 2003).

Dalším zajímavým saponinem je glycyrrhizin (**XXIV**), jenž se vyskytuje v kořeni lékořice (*Glycyrrhiza glabra*). Extrakt z lékořice je hojně používán v Japonsku při léčení akutní i chronické hepatitidy. Glycyrrhizin (**XXIV**) je štěpen účinkem střevní mikroflóry

na 18 β -glycyrrhetovou kyselinu (**XXIV**) (Yim et al., 2004). Bylo prokázáno zvýšení aktivity NK buněk a indukce tvorby interferonů účinkem glycyrrhizinu (**XXIV**) (Abe et al., 1982; Itoh and Kumagai, 1983). Glycyrrhizin (**XXIV**) také zvyšuje tvorbu IL-12 u myších peritoneálních makrofágů aktivovaných lipopolysacharidem. Tento efekt je zprostředkován zvýšením transkripce obou podjednotek IL-12 díky ovlivnění NF- κ B (Dai et al., 2001). Byl také zkoumán efekt glycyrrhizinu (**XXIV**) při léčbě plicních zánětlivých onemocnění. Glycyrrhizin (**XXIV**) a glycyrrhetová kyselina (**XXV**) inhibují tvorbu IL-8 a eotaxinu-1 u lidských plicních fibroblastů HFL1 stimulovaných IL-4 a TNF- α . Zatímco glycyrrhizin (**XXIV**) inhiboval zvláště tvorbu IL-8, u glycyrrhetové kyseliny (**XXV**) byla pozorována jen inhibice tvorby eotaxinu-1 (Matsui et al., 2004).



Platycodon grandiflorum je rostlina užívaná v orientální medicíně k léčbě chronických zánětlivých onemocnění. Byly z ní izolovány biologicky aktivní saponiny nazvané platycodiny a polygalaciny. Byl studován jejich *in vitro* inhibiční efekt na tvorbu NO a PGE₂ u myších makrofágů RAW 264.7. Jako nejlepší inhibitory se ukázaly 2''-*O*-acetylpolygalacin D (**XXVI**), polygalacin D (**XXVII**), platycodin A (**XXVIII**) a platycodin D (**XXIX**). Všechny uvedené saponiny inhibují transkripci indukovatelné NO syntázy a cyklooxygenázy COX-2 skrze ovlivnění transkripčního faktoru NF- κ B (Ahn et al., 2004).

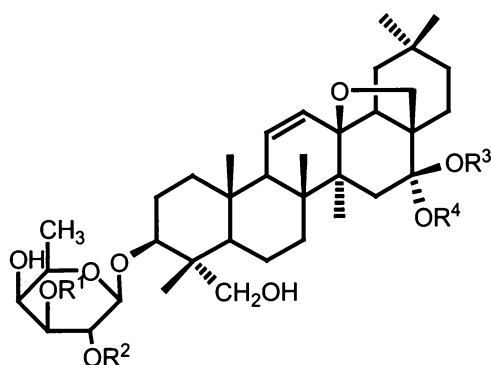


Další rostlinou, z níž byla izolována řada biologicky aktivních saponinů (saikosaponinů), je *Bupleurum falcatum*, japonsky nazývaná „saiko“. Používá se v tradiční japonské a čínské medicíně k léčení chronické hepatitidy a autoimunitních chorob. Výskyt saikosaponinů však není vázán pouze na rostliny rodu *Bupleurum*. Byly například izolovány i z *Heteromorpha sp.* či *Scrophularia sp.* (Bermejo Benito et al., 1998).

Byl studován účinek saikosaponinu 1 a 2 (**XXX** a **XXXI**) na edém ucha u myší způsobený PMA a na tvorbu PGE₂ a LTC₄ u myších peritoneálních makrofágů aktivovaných ionoforem. Vliv na edém ucha (94% inhibice, resp. 96% inhibice) byl u obou saikosaponinů dávkovaných v množství 1 mg/ucho srovnatelný s účinkem indomethacinu v dávce 3 mg/ucho (94 %). Oba saikosaponiny v koncentraci 100 μmol/l také dosáhly vysoké inhibice tvorby PGE₂ (75 %, resp. 63 %) a inhibice tvorby LTC₄ (90 %, resp. 88 %) (Bermejo Benito et al., 1998).

Je znám také účinek saikosaponinu A (**XXXII**) proti alergickému astmatu. Při intravenózním podání saikosaponinu A (**XXXII**) u morčete dochází k signifikantnímu zmírnění bronchokonstrikce po podání antigenu (Park et al., 2002).

Saikosaponin D (**XXXIII**) mění aktivitu T-lymfocytů. Moduluje signální dráhu vedoucí přes proteinkinázu C. Saikosaponin D (**XXXIII**) u myších T-buněk inhibuje indukci CD69 a CD71 po působení konkanavalinem A, inhibuje též indukci CD69 zprostředkovanou PMA. Také tvorba IL-2 aktivovaná působením PMA je účinkem saikosaponinu D (**XXXIII**) v koncentraci 10 μmol/l a 20 μmol/l inhibována (Leung et al., 2005).



XXX,	R ¹ = Glc,	R ² = Glc
	R ³ = OH	R ⁴ = H
XXXI,	R ¹ = Glc,	R ² = Glc-SO ₃ ⁻
	R ³ = OH	R ⁴ = H
XXXII,	R ¹ = Glc,	R ² = H
	R ³ = OH	R ⁴ = H
XXXIII,	R ¹ = Glc,	R ² = H
	R ³ = H	R ⁴ = OH

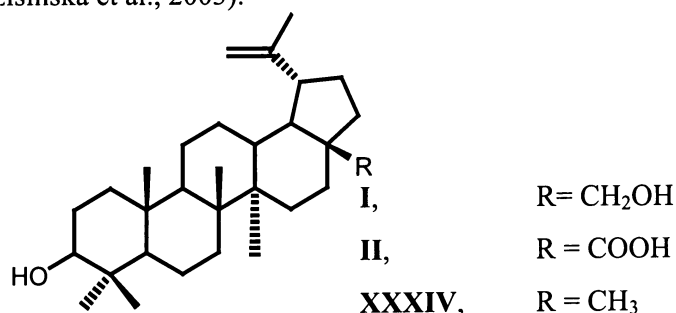
1.4 Betulin a betulinová kyselina

Betulin (**I**) je v rostlinné říši široce rozšířený triterpenický diol. Březová kůra (*Betula pendula*) obsahuje 20 – 30 % (hmot.) betulinu (**I**). Také betulinová kyselina (**II**) byla izolována z mnoha druhů rostlin. Ve větším množství (3 % hmot.) je obsažena v platanové kůře (*Platanus hispanica*). Pentacyklický alkohol lupeol (**XXX**) se často vyskytuje společně s betulinem (**I**) (Džubák et al., 2006).

Jak betulin (**I**), tak betulinová kyselina (**II**) mají mírné protizánětlivé účinky v relativně vysokých koncentracích (Cichewicz and Kouzi, 2004).

Mechanismus protizánětlivého účinku betulinu (**I**) a betulinové kyseliny (**II**) spočívá v inhibici fosfolipázy A_2 . Bioinformatická studie ukázala, že betulin (**I**) i betulinová kyselina (**II**) se mohou vázat do vazebného místa enzymu. Betulinová kyselina (**II**) se ukázala jako lepší inhibitor fosfolipázy A_2 , když v koncentraci 2,5 $\mu\text{mol/l}$ vykazovala 30% inhibici enzymu, kdežto betulin (**I**) inhiboval fosfolipázu A_2 z 15 % (Bernard et al., 2001).

Betulinová kyselina (**II**) inhibuje v koncentraci 2,5 – 20 $\mu\text{g/ml}$ tvorbu NO a expresi cyklooxygenázy COX-2 u myších makrofágů RAW 264.7 aktivovaných lipopolysacharidem. Naopak tvorba TNF- α a IL-1 β se působením betulinové kyseliny (**II**) na makrofágy RAW 264.7 zvyšuje, a to i v případě, že jsou aktivovány lipopolysacharidem, i v případě, kdy aktivovány nejsou (Yun et al., 2003). Naopak při studování účinku betulinu (**I**) a betulinové kyseliny (**II**) na leukocyty, které byly získány z plné lidské krve a jež byly aktivovány fytohemaglutininem a lipopolysacharidem, se ukázalo, že betulin (**I**) indukuje tvorbu TNF- α . Hladina interferonu γ a IL-10 nebyla betulinem (**I**) ovlivněna. Betulinová kyselina (**II**) neovlivnila hladinu žádného ze tří studovaných cytokinů (Zdzisińska et al., 2003).



Ukázalo se, že betulinová kyselina (**II**) inhibuje aktivaci NF- κ B vyvolanou například PMA, H₂O₂ či cigaretovým kouřem. S tím souvisí i inhibice transkripce COX-2 a metaloproteinázy 9 (Takada and Aggarwal, 2003).

Betulinová kyselina (**II**) má signifikantní protizánětlivou aktivitu vůči edému tlapy u potkanů indukovaném karagenanem a serotoninem, jež je srovnatelná s aktivitou dexamethazonu (Sami et al., 2006).

Betulinová kyselina (**II**) je mírným inhibitorem fosfodiesterázy D_4 s hodnotou $IC_{50} = 125 \mu\text{mol/l}$. Fosfodiesteráza D_4 je důležitým enzymem v rozvoji astmatu, chronických obstrukčních plicních chorob a psoriázy, proto jsou její inhibitory jako potenciální léčiva intenzivně studovány (Weniger et al., 2005).

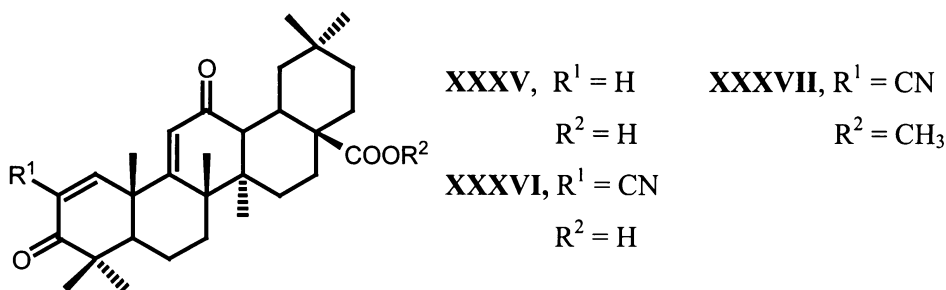
Byla studována inhibiční schopnost tvorby superoxidů lidskými neutrofily u betulinu (**I**), betulinové kyseliny (**II**) a lupeolu (**XXXIV**). Byla-li tvorba superoxidů indukována fMLP, byla inhibice superoxidů pozorována u betulinu (**I**) a lupeolu (**XXXIV**), byla-li tvorba superoxidů indukována PMA, měl inhibiční účinek jen betulin (**I**), byla-li tvorba superoxidů indukována arachidonovou kyselinou, byla inhibice superoxidů pozorována pouze u lupeolu (**XXXIV**). Betulinová kyselina (**II**) tvorbu superoxidů neovlivnila v žádném z případů (Yamashita et al., 2002).

Z výše zmíněných lupanových derivátů byl pouze u lupeolu (**XXXIV**) popsán silný inhibiční účinek vůči lidské leukocytární elastáze (Tolstikova et al., 2006).

2. SYNTETICKÉ TRITERPENOIDNÍ DERIVÁTY

2.1 Oleananové a ursanové deriváty

V roce 1997 byl publikován článek o nových syntetických ursanových a oleananových triterpenoidech s modifikovaným kruhem A a C, které inhibovaly tvorbu NO u myších peritoneálních makrofágů aktivovaných interferonem γ . Devět z připravených sloučenin mělo hodnotu IC_{50} menší než 10 $\mu\text{mol/l}$ a jako nejúčinnější se ukázala kyselina **XXXV** s hodnotou $IC_{50} = 0,9 \mu\text{mol/l}$ (Honda et al., 1997).

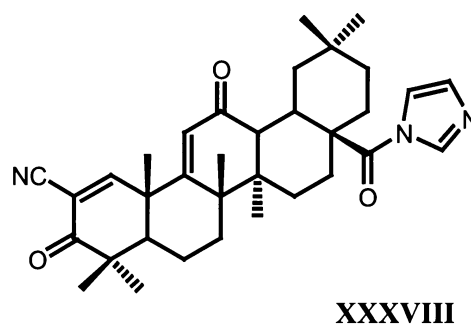
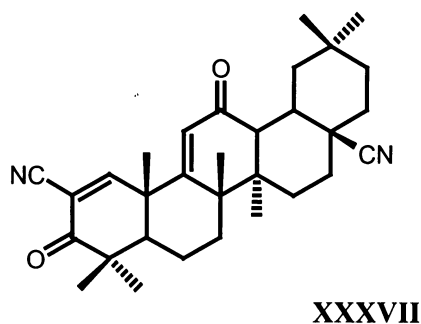


Na základě slibné aktivity kyseliny **XXXV** byly syntetizovány další oleananové deriváty s 1-en-3-onovou strukturou a substitucí v poloze 2. Tak bylo připraveno dalších pět sloučenin s hodnotu IC_{50} menší než 10 $\mu\text{mol/l}$, mezi nimi byla i kyselina 2-kyano-3,12-dioxoolean-1,9-dien-28-ová (**XXXVI**), nazývaná též CDDO, která má hodnotu $IC_{50} = 0,4 \text{ nmol/l}$, což je hodnota srovnatelná s dexamethazonem. Při studiu závislosti aktivity připravených enonových sloučenin na jejich struktuře se ukázala jako nejvýhodnější elektronakceptorová skupina v poloze 2 a současná přítomnost enonového systému na kruhu C. Aktivita CDDO (**XXXVI**) je srovnatelná s aktivitou jejího methyl-esteru **XXXVII** (Honda et al., 1998; Honda et al., 1999).

CDDO (**XXXVI**) inhibuje expresi indukovatelné NO syntázy a COX-2 u myších makrofágů RAW 264.7 aktivovaných lipopolysacharidem nebo interferonem γ (Suh et al., 1999). Bylo rovněž zjištěno, že CDDO (**XXXVI**) inhibuje tvorbu matrixových metaloproteináz 1 a 13 vyvolanou působením IL-1 u lidské chondrocytové linie SW-1353 i u primárních lidských chondrocytů a jeví se tak jako perspektivní sloučenina pro léčbu revmatoidní artritidy a osteoartritidy (Elliott et al., 2003).

Další deriváty odvozené od struktury CDDO (**XXXVI**) se ukázaly jako ještě aktivnější inhibitory produkce NO u myších makrofágů RAW 264.7. Konkrétně derivát **XXXVII** má hodnotu $IC_{50} = 3,5 \text{ pmol/l}$ (Honda et al., 2002).

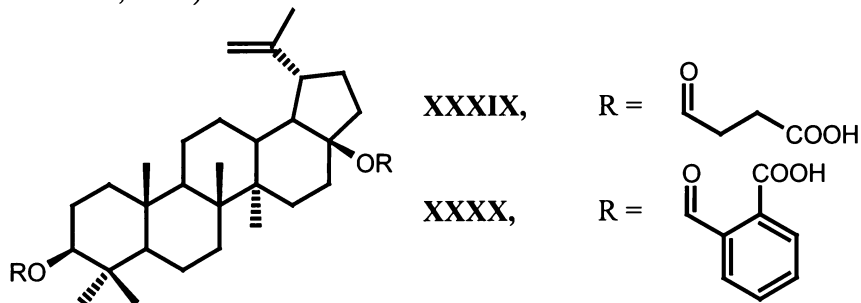
Derivát **XXXVIII**, označovaný jako CDDO-Im, výrazně inhibuje tvorbu indukovatelné NO syntázy *in vivo*. Myším byl nejprve intraperitoneálně podán thioglykolát. Po třech dnech jim bylo intraperitoneálně podáno 5 µg interferonu γ a po třiceti minutách následovalo podání 1 či 10 nmol derivátu **XXXVIII** i.p. Po desíti hodinách byly myším odebrány peritoneální makrofágy. Ukázalo se, že CDDO-Im (**XXXVIII**) v množství 1 nmol inhiboval expresi indukovatelné NO syntázy z 51 % (resp. ze 98 % v dávce 10 nmol). CDDO (**XXXVI**) měla ve stejném testu inhibiční účinek v dávce 10 nmol (36 %) (Place et al., 2003).



2.2 Lupanové deriváty

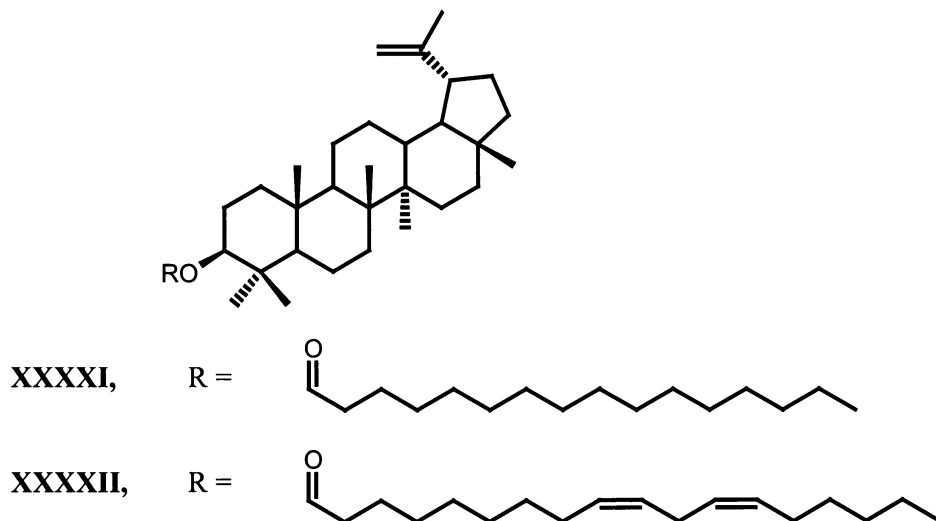
Deriváty lupanu byly dosud studovány především pro své protinádorové a antivirální účinky. Jen několik prací se věnuje protizánětlivé aktivitě lupanových derivátů.

Je znám protizánětlivý efekt betulinových esterů. Například hemiglutarát **XXXIX** efektivně stimuluje imunitní odpověď a regeneraci organismu po zánětu. Jiným příkladem může být hemifitalát **XXXX**, který má protizánětlivé účinky srovnatelné s ortofenem (Tolstikova et al., 2006).

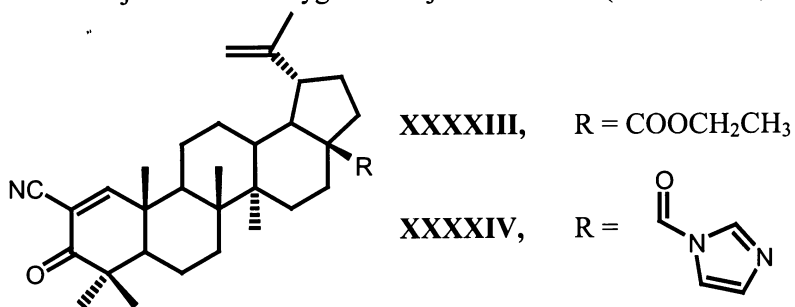


Byl zkoumán inhibiční účinek esterů vyšších mastných kyselin s lupeolem (**XXXIV**) vůči serinovým proteázám. Serinové proteázy, stejně jako metaloproteázy, jsou důležité enzymy v rozvoji revmatoidní artritidy. Při studiu účinku lupeolových esterů

bylo jako modelové zvoleno štěpení BSA trypsinem. Ester **XXXXI** inhibuje tuto enzymatickou reakci s inhibiční konstantou $K_i = 30 \mu\text{mol/l}$, ester **XXXXII** má hodnotu inhibiční konstanty $K_i = 14 \mu\text{mol/l}$. V obou případech jde o nekompetitivní inhibici. Oba estery jsou však zároveň kompetitivními inhibitory s inhibičními konstantami $K_i = 103 \mu\text{mol/l}$ pro ester **XXXXI**, resp. $K_i = 52 \mu\text{mol/l}$ pro ester **XXXXII**. Pankreatická elastáza žádným z esterů **XXXXI** a **XXXXII** inhibována není (Hodges et al., 2003).

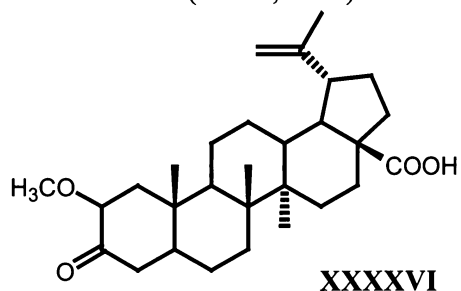
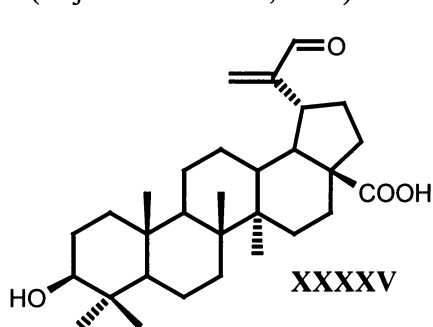


Bylo syntetizováno patnáct derivátů betulinové kyseliny (**II**) strukturně podobných CDDO (**XXXVI**). Všechny nové deriváty nesly 3-oxo-1-enovou strukturu doplněnou elektronakceptorovou skupinou v poloze 2 (především kyanoskupinou). Všechny připravené deriváty mají inhibiční účinek na tvorbu NO u myších makrofágů RAW 264.7 stimulovaných interferonem γ . Osm z nich mělo hodnotu IC_{50} nižší než $0,05 \mu\text{mol/l}$. Jako nejaktivnější se ukázal derivát **XXXXIII** s hodnotou $IC_{50} = 0,02 \mu\text{mol/l}$. Derivát **XXXXIV** indukuje hemovou oxygenázu v játrech *in vivo* (Honda et al., 2006).

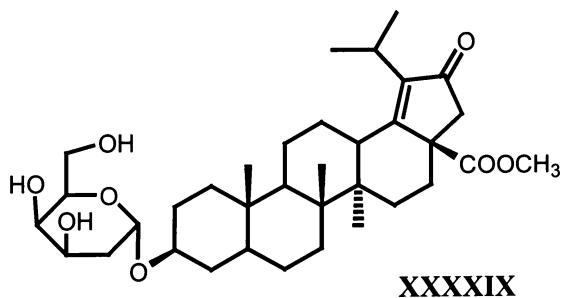
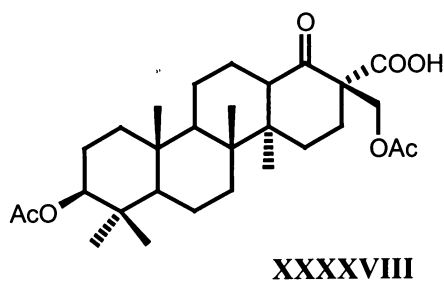
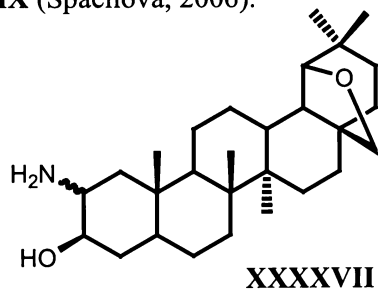
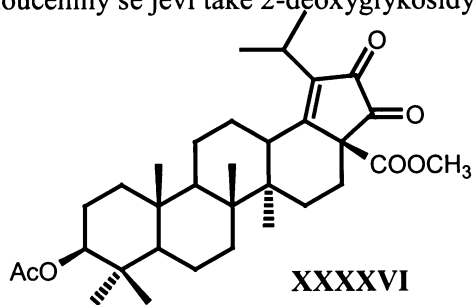


2.3 Betulininy

Na pracovišti RNDr. Jana Šarka, Ph.D. byla připravena řada lupanových, des-E-lupanových a 18 α -oleananových derivátů, zvaných betulininy, které se vyznačují vysokou *in vitro* protinádorovou aktivitou ($IC_{50} < 10 \mu\text{mol/l}$) vůči nádorovým liniím jako jsou A549, Saos-2, BT-549, DU145, OVCAR-3, K-562 či CEM (Šarek et al., 2003). Mezi 20(29)-lupanovými deriváty byl nalezen největší cytotoxický účinek u aldehydu **XXXXV** (Hajduch and Sarek, 2003) a methoxyderivátu **XXXXVI** (Urban, 2005).



Významnými cytotoxickými účinky se vyznačuje taktěž diketon **XX** (Hajduch and Sarek, 2003). Z oleananových derivátů je svými cytotoxickými aktivitami významný aminol **XXXXVII** (Urban, 2005), dále je třeba z des-E-derivátů zmínit vysoce účinnou β -ketokyselinu **XXXXVIII** (Hajduch and Sarek, 2003). Jako vysoce cytotoxicky aktivní sloučeniny se jeví také 2-deoxyglykosidy, např. **XXXXIX** (Spáčilová, 2006).



3. TESTOVÁNÍ PROTIZÁNĚTLIVÝCH ÚČINKŮ

3.1 Testování inhibice tvorby NO

Inhibice tvorby NO u myších makrofágů stimulovaných lipopolysacharidem může být sledována *in vitro* testem. Myší peritoneální makrofágy nebo myší makrofágové buněčné linie jako RAW 264.7 nebo B10R jsou kultivovány 24-72 hodin s lipopolysacharidem. Působením lipopolysacharidu jsou makrofágy aktivovány a dochází k expresi indukovatelné NO syntázy, která katalyzuje tvorbu NO z L-argininu. NO je následně oxidován na nitrit, který se uvolňuje do kultivačního média. Pokud jsou makrofágy kultivovány kromě lipopolysacharidu rovněž s testovanou sloučeninou, je možné sledovat vliv testované látky na produkci nitritu. Koncentrace nitritu se stanovuje pomocí Griessova činidla (Green et al., 1994).

Griessovo činidlo obsahuje sulfanilamid a *N*-(1-naftyl)ethylendiamin. Reakcí s nitritovým aniontem dochází k diazotaci sulfanilamidu a následné kopulaci s *N*-(1-naftyl)ethylendiaminem v kyselém prostředí za vzniku růžově zbarvené azosloučeniny s absorpčním maximem při 540 nm (Schéma 1). Obsah nitritu je následně stanoven spektrofotometricky. Při stanovení je třeba přesně dodržovat pH v rozmezí 1,7 až 3,0 a dobu inkubace analyzovaného vzorku s činidlem (Ivanov, 2004).

Inhibice tvorby NO se vyjadřuje jako hodnota IC_{50} - taková koncentrace testovaného derivátu, kdy je obsah nitritu v kultivačním médiu proti kontrole poloviční. Hodnotu IC_{50} je z experimentálních dat možno získat pomocí softwaru, například programu Chemorezist (Regner et al, 2000).

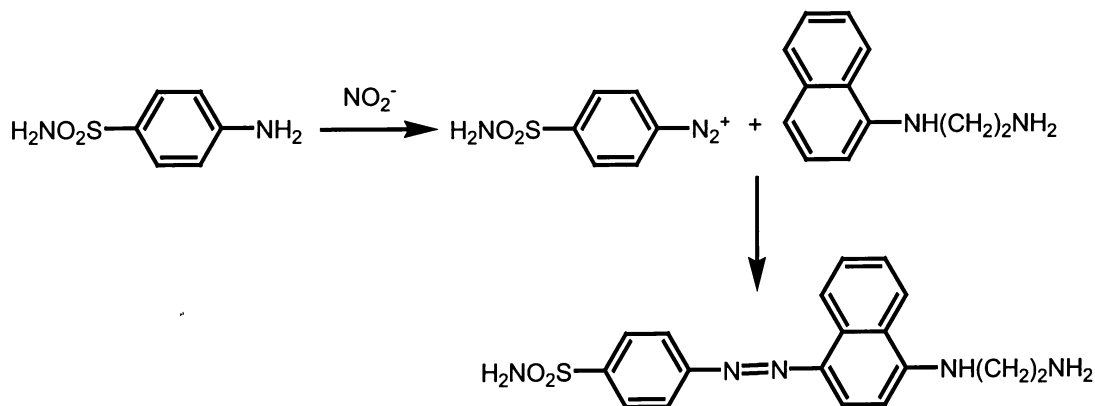


Schéma 1: Princip stanovení nitritů pomocí Griessova činidla

3.2 Testování cytotoxického účinku pomocí MTT testu

Je nutno rozlišit, zdali testovaná látka má skutečně inhibiční účinek na tvorbu NO, či zda pokles tvorby NO souvisí spíše s cytotoxickými vlastnostmi testovaného derivátu. Proto je souběžně se stanovením inhibice tvorby NO prováděn i *in vitro* test cytotoxicity.

MTT test byl v literatuře poprvé zmíněn v roce 1954 (Black and Speer, 1954). Tento test se běžně používá k testování cytotoxicity nových protinádorových léčiv a k určení senzitivity primárních nádorových buněk na chemoterapii.

Princip MTT testu spočívá ve schopnosti živých buněk redukovat MTT na fialový formazan (Schéma 2). Redukce probíhá v mitochondriích pomocí sukcinyl dehydrogenázy. Formazan není rozpustný ve vodě, jeho krystaly se proto rozpouštějí přidávkem 10% vodného dodecylsulfátu sodného. MTT test je následně vyhodnocen spektrofotometricky. Absorbance získaného roztoku při 540 nm je úměrná počtu živých buněk v buněčné suspenzi (Stýskalová, 2006).

Cytotoxický efekt se vyjadřuje pomocí hodnoty IC_{50} . Je to taková koncentrace testovaného derivátu, kdy přežívá 50 % buněk. Hodnota IC_{50} se získává zpracováním naměřených dat pomocí softwaru, obdobně jako tomu je u sledování inhibice tvorby NO.

Důležitou hodnotou pro posouzení souvislosti inhibice tvorby NO a cytotoxicity derivátu je terapeutický index, označovaný TI. Jedná se o podíl hodnoty IC_{50} získané z testu inhibice tvorby NO a hodnoty IC_{50} získané z MTT testu za přítomnosti lipopolysacharidu v kulturačním médiu.

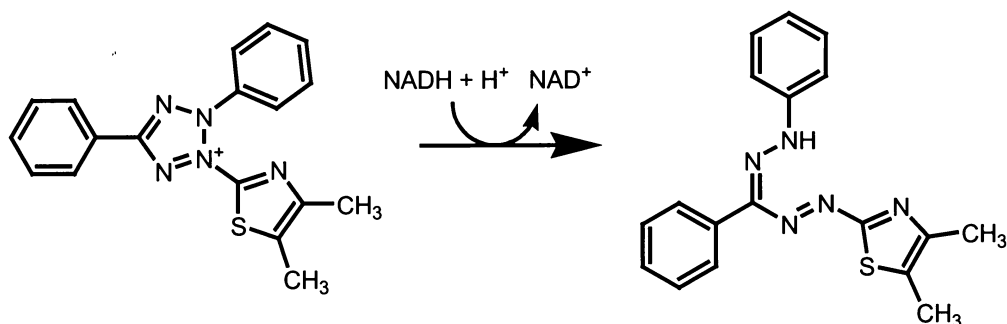


Schéma 2: Redukce MTT na formazan, probíhající v mitochondriích živých buněk

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Obecné poznámky k experimentální části

Pro screening protizánětlivých aktivit vybraných sloučenin byla použita buněčná linie myších makrofágů B10R (Barrera et al., 1994), získaná od Dr. Danuty Radzioch (Montreal, Kanada). Buňky byly pěstovány v plastových kultivačních lahvích (80 cm²) v kultivačním médiu DMEM s glukózou (5 g/l), L-glutaminem (2 mmol/l), penicilinem (100 U/ml), streptomycinem (100 µg/ml), 10% fetálním hovězím sérem a NaHCO₃. Buňky byly pěstovány v inkubátoru při 37 °C v atmosféře 5% CO₂.

Absorbance byly měřeny na přístroji Labsystem iEMS Reader MF (Velká Británie).

Testované chemikálie byly získány z laboratoře RNDr. Jana Šarka, Ph.D., MTT a lipopolysacharid (katalogové číslo L4391) byly zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich, s.r.o. (ČR) Griessovo činidlo (*N*-(1-naftyl)ethylendiamin hmot. 0,1%, sulfanilamid hmot. 1%, kyselina fosforečná obj. 2% v deionizované vodě) bylo připravováno jako čerstvé.

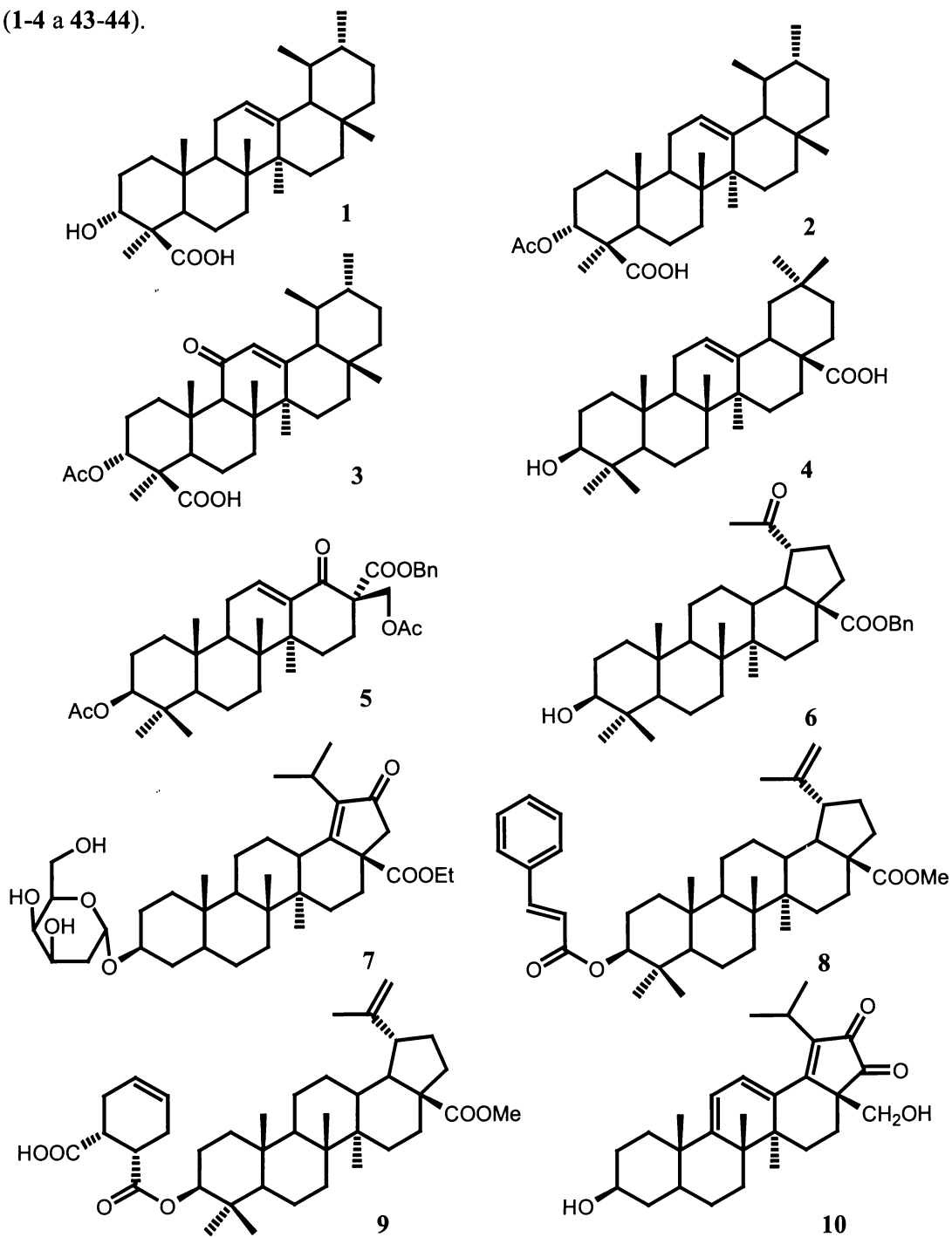
Ke zpracování naměřených hodnot byl použit software Chemorezist (verze 1.0).

Testování produkce nitritů a MTT test

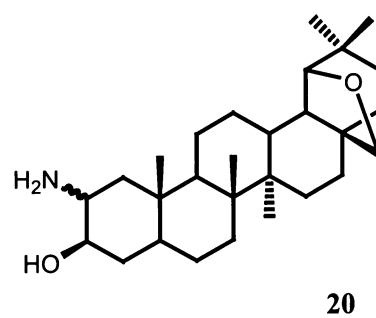
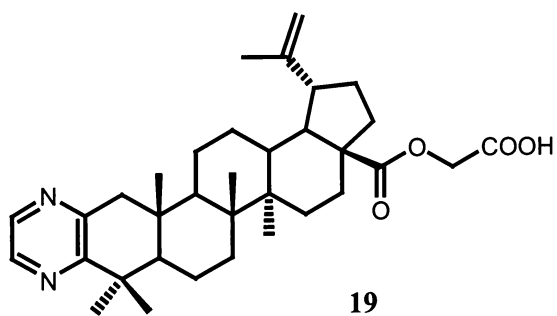
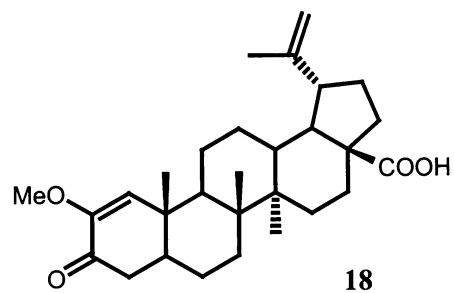
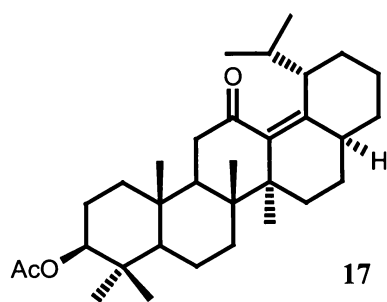
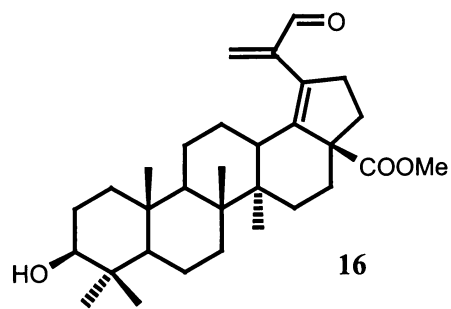
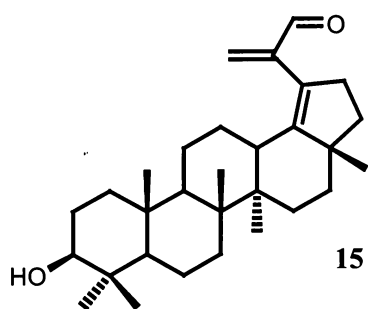
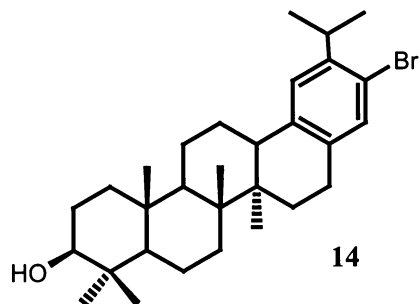
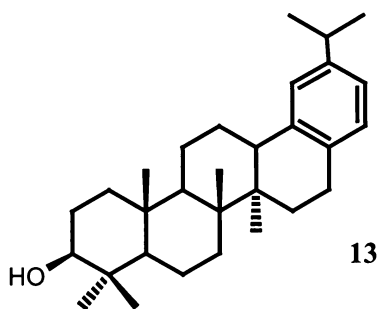
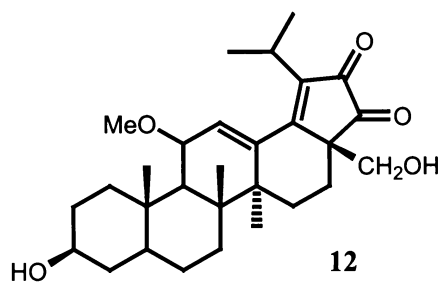
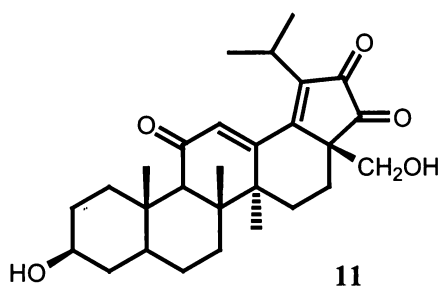
Byla připravena suspenze buněk B10R o koncentraci $3,75 \times 10^5$ buněk/ml v kultivačním médiu s lipopolysacharidem (5 µg/ml). Do 96-jamkového panelu byl napipetován roztok testované látky (20 µl) v kultivačním médiu v šesti koncentracích (nejvyšší koncentrace 250 µmol/l, roztoky s nižší koncentrací byly získány čtyřnásobným zředěním předchozího roztoku). Každá koncentrace byla testována v dubletu. Do jamek panelu byla přidána buněčná suspenze (80 µl). Jako kontrola byla použita buněčná suspenze bez testované látky (100 µl). Inkubace buněk s testovanými látkami trvala 24 hodin a probíhala v inkubátoru při 37 °C a v atmosféře 5% CO₂. Po inkubaci byly panely zcentrifugovány (7 minut, 1500 otáček/min) a 50 µl supernatantu z jednotlivých jamek bylo odpipetováno do prázdného 96-jamkového panelu. Do všech jamek se supernatantem bylo přidáno Griessovo činidlo (50 µl). Panely byly inkubovány 10 minut při laboratorní teplotě a následně byly na ELISA readeru změřeny absorbance při 540 nm. Do všech jamek panelů s buňkami a zbylým supernatantem byl přidáno 5 µl roztoku MTT (5 mg/ml) a panely byly inkubovány při 37 °C v atmosféře 5% CO₂ další 4 hodiny. Žlutá tetrazoliová sůl byla redukována na modrý formazan pouze živými buňkami. Formazanové krystaly byly rozpuštěny pomocí 50 µl 10% vodného roztoku dodecylsulfátu sodného (pH = 5,5) přes noc při 37 °C. Následně byly na ELISA readeru změřeny absorbance při 540 nm. Testování bylo prováděno ve třech opakováních, a to na buňkách z různých pasáží.

Struktury testovaných sloučenin

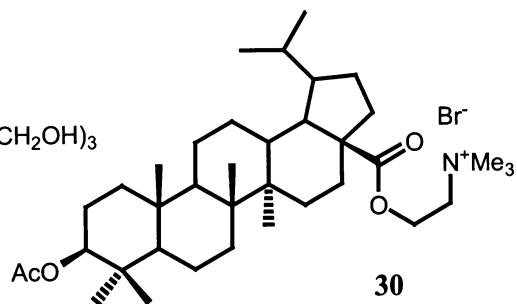
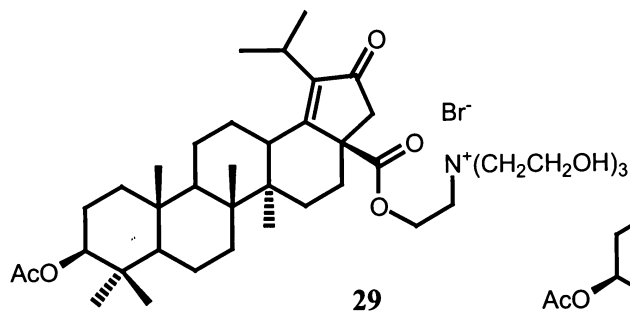
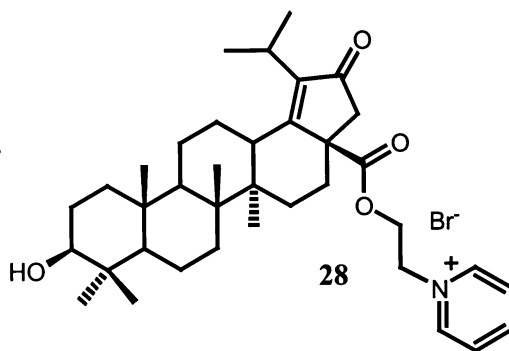
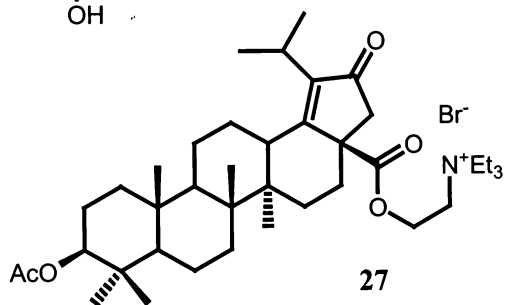
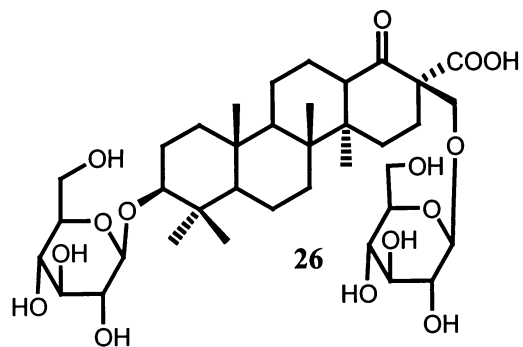
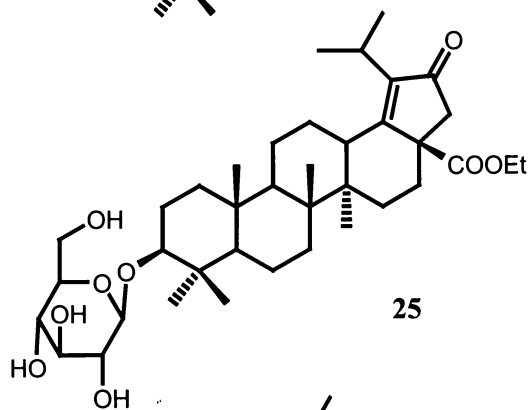
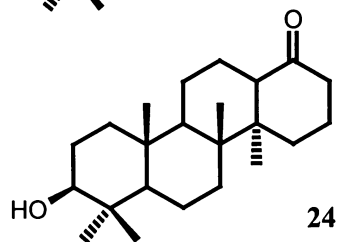
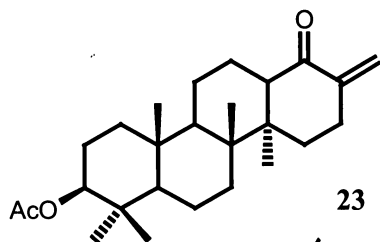
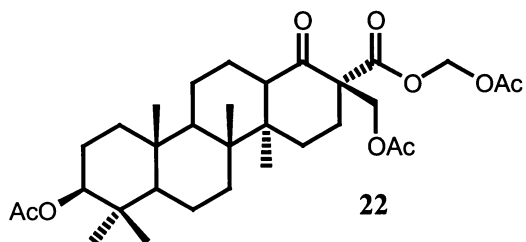
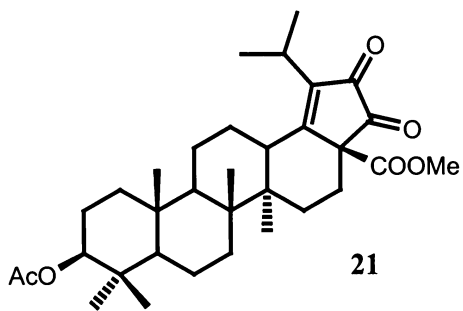
Pro testování byli vybráni zástupci sloučenin napříč spektrem připravených derivátů betulininů. Jedná se především o sloučeniny s nižší cytotoxickou aktivitou vůči linii CEM. V testování byly použity i sloučeniny se popsanou protizánětlivou aktivitou (1-4 a 43-44).



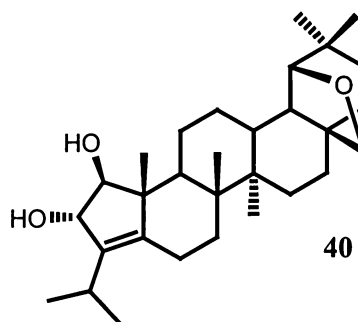
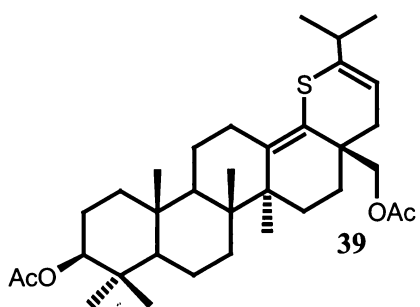
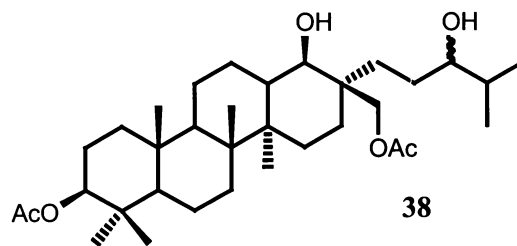
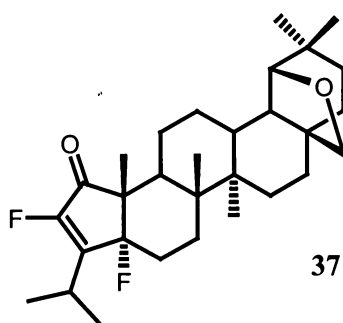
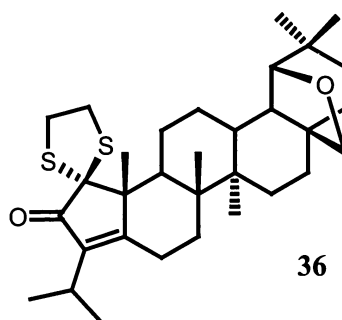
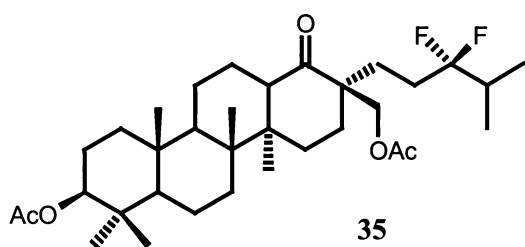
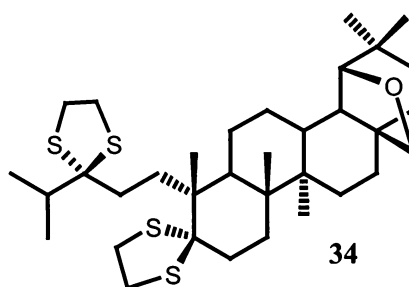
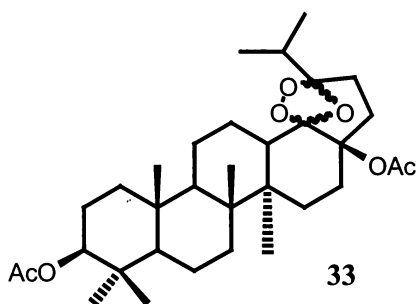
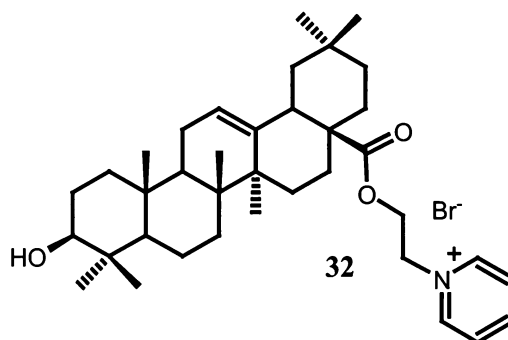
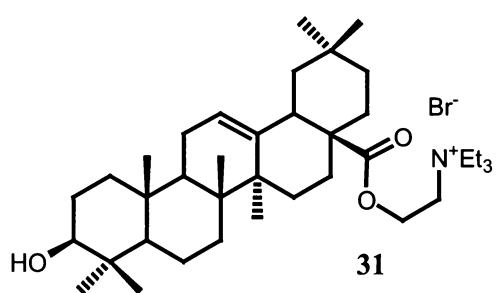
Struktury testovaných sloučenin - pokračování



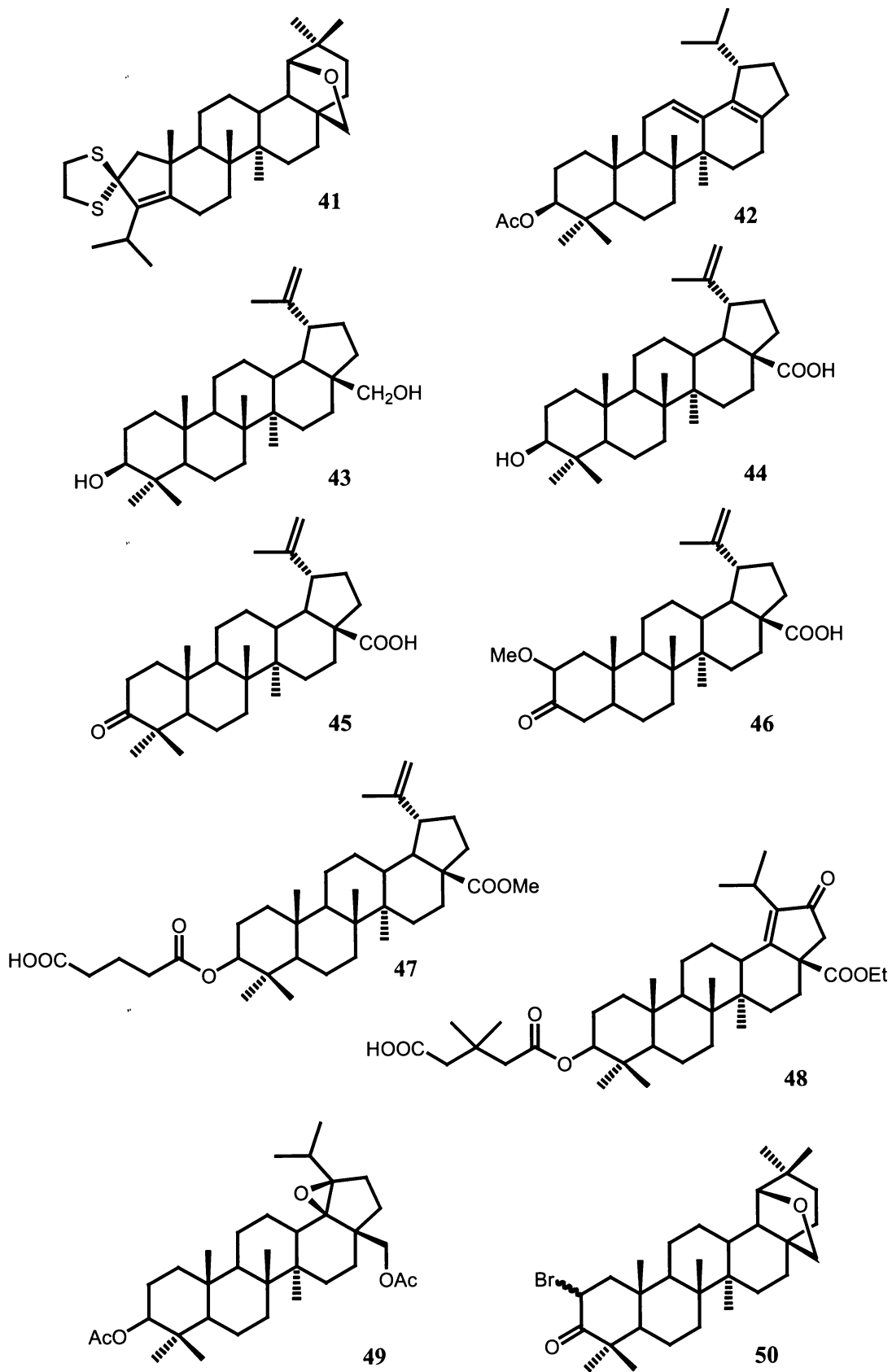
Struktury testovaných sloučenin - pokračování



Struktury testovaných sloučenin - pokračování



Struktury testovaných sloučenin - pokračování



TABULKA VÝSLEDKŮ TESTOVÁNÍ

Všechny hodnoty IC_{50} jsou uvedeny v jednotkách $\mu\text{mol/l}$. Sloupec „Produkce nitritů“ představuje výsledky testování inhibice tvorby NO za přítomnosti lipopolysacharidu. Sloupec „Index“ představuje terapeutický index – podíl IC_{50} (MTT s lipopolysacharidem) a IC_{50} („Produkce nitritů“). Sloupce SD vyjadřují hodnoty směrodatné odchylky v $\mu\text{mol/l}$.

Tabulka 1

Sloučenina	Produkce nitritů		MTT		MTT s lipopolysacharidem		Index
	IC_{50}	SD	IC_{50}	SD	IC_{50}	SD	
1	118	18	99	15	171	9,5	1,44
2	35,1	7,0	40,5	1,5	122	18	3,48
3	27,1	3,7	28	4,9	40,8	6,3	1,50
4	106	15	17,9	2,2	34,1	4,8	0,32
5	120	1,1	12,0	2,0	35,5	1,1	0,30
6	12,9	1,0	13,3	1,9	19,2	2,2	1,49
7	5,28	0,8	9,15	1,5	10,5	1,2	1,99
8	147	21	250	0	250	0	1,70
9	38,9	6,2	32,0	4,1	52,9	5,1	1,36
10	7,09	1,4	29,4	3,8	40,2	2,9	5,68
11	29,7	3,8	47,5	6,8	51,9	3,1	1,74
12	21,7	3,6	53,8	6,6	141	14	6,50
13	250	0	250	0	244	11	0,98
14	250	0	250	0	250	0	1,00
15	249	1,6	250	0	250	0	1,00
16	4,8	0,7	6,14	0,5	8,19	1,1	1,71
17	250	0	18,5	2,6	14,0	1,2	0,06
18	31,2	3,1	101	12	156	16	5,01
19	19,0	1,5	29,5	4,1	39,2	2,7	2,07
20	140	19	139	9,0	222	31	1,59
21	16,8	3,0	33,5	5,1	39,4	3,5	2,35
22	9,23	1,5	0,50	0,06	1,18	0,08	0,13
23	0,94	0,2	3,83	0,4	6,44	0,7	6,85
24	7,87	1,1	38,8	3,3	43,3	5,9	5,50
25	28,1	4,1	38,0	3,6	42,8	0,84	1,53

Tabulka 1 pokračování

Sloučenina	<i>Produkcce nitritů</i>		<i>MTT</i>		<i>MTT s lipopolysacharidem</i>		<i>Index</i>
	<i>IC₅₀</i>	<i>SD</i>	<i>IC₅₀</i>	<i>SD</i>	<i>IC₅₀</i>	<i>SD</i>	
26	8,61	1,3	30,8	3,2	46,5	5,8	5,41
27	138	18	245	11	248	5,9	1,79
28	30,5	4,8	27,4	2,4	32,0	1,1	1,05
29	44,9	5,9	31,2	3,8	36,6	5,7	0,82
30	133	18	230	29	248	3,7	1,87
31	29,2	5,0	30,8	2,5	31,4	2,7	1,07
32	29,7	2,0	34,7	2,5	33,9	2,7	1,14
33	221	33	44,8	5,2	40,5	5,5	0,18
34	30,3	2,9	138	3,6	156	11	5,16
35	250	0	17,5	2,5	17,3	1,9	0,07
36	250	0	250	0	250	0	1,00
37	11,7	0,3	34,4	4,0	29,4	4,3	2,51
38	20,3	2,7	37,6	1,2	39,8	6,0	1,95
39	250	0	250	0	250	0	1,00
40	33,3	3,8	38,7	4,9	41,4	2,6	1,24
41	250	0	250	0	250	0	1,00
42	250	0	250	0	250	0	1,00
43	250	0	5,94	0,7	10,5	0,7	0,04
44	250	0	0,90	0,07	2,99	0,4	0,01
45	105	13	191	25	248	4,1	2,36
46	11,6	0,8	56,5	7,5	119	4,7	10,25
47	14,2	1,3	33,4	1,7	40,9	3,7	2,88
48	68,7	8,2	51,8	7,9	46,9	6,5	0,68
49	250	0	250	0	250	0	1,00
50	226	23	250	0	250	0	1,10

DISKUZE

Z výsledků screeningu protizánětlivé aktivity testovaných derivátů je patrné, že testované deriváty můžeme rozdělit do čtyř skupin.

První skupinu tvoří deriváty, které nejevily žádný efekt inhibice tvorby NO a neměly vůči myším makrofágům B10R ani efekt cytotoxický. Do této skupiny patří deriváty s aromatizovaným E kruhem **13** a **14**, sirmé deriváty **39** a **41**, dien **42**, ozonid **49** a bromderivát **50**.

Druhou skupinou jsou látky, jejichž terapeutický index, tedy podíl hodnoty IC_{50} produkce nitritů a hodnoty IC_{50} získané MTT testem při inkubaci s lipopolysacharidem, je nižší než jedna. Tyto deriváty projevily nízkou či velmi nízkou inhibicí tvorby NO, jevily se ovšem jako silně cytotoxické. Tento zdánlivý protimluv lze vysvětlit například tím, že tyto deriváty zasahují do metabolismu mitochondrií a ovlivňují jejich schopnost redukovat MTT. Je tedy možné, že u těchto derivátů byly při MTT testu živé makrofágy s ovlivněným metabolismem mitochondrií nesprávně považovány za mrtvé buňky. Do této skupiny patří oleanolová kyselina (**4**), benzyl-ester **5**, keton **17**, diketon **21**, acetoxymethyl-ester **22**, ozonid **33**, fluorderivát **35**, betulín (**43**) a betulínová kyselina (**44**).

Do třetí skupiny spadá většina testovaných sloučenin. Tvoří ji sloučeniny s terapeutickým indexem v rozmezí hodnot 1 až 5. Tyto sloučeniny mají většinou slabý či mírný inhibiční účinek na tvorbu NO, tento efekt je však silně spojen s cytotoxicitou těchto derivátů. Výrazně je tento vztah patrný u 2-deoxygalaktosidu **7** a methyl-esteru **16**, které jsou silně cytotoxické a mají hodnotou IC_{50} inhibice tvorby NO nižší, resp. blízkou 10 $\mu\text{mol/l}$. Tato hodnota je považována za horní mez, kdy je ještě možné hovořit o aktivním derivátu, a to i v případě, že se posuzuje účinek na tvorbu NO, i posuzuje-li se cytotoxická aktivita derivátu.

Poslední, čtvrtou skupinu, tvoří osm sloučenin, jež v testování dosáhly hodnoty terapeutického indexu vyšší než 5. Nejvyšší hodnotu terapeutického indexu - 10,25 - má methoxyderivát **46**. Jeho efekt na tvorbu NO je střední ($IC_{50} = 11,6 \mu\text{mol/l}$), přesto se však stále jedná o koncentraci, které je teoreticky možno v organismu při orálním podání dosáhnout. Jako perspektivnější se jeví nenasycený diketon **10**, methylenketon **23**, strukturálně podobný heptanorketon **24** a glukosid **26**. Všechny tyto sloučeniny mají hodnotu IC_{50} inhibice tvorby NO nižší než 10 $\mu\text{mol/l}$, methylenketon **23** má dokonce hodnotu $IC_{50} = 0,94 \mu\text{mol/l}$. Další z testovaných nenasycených diketonů, derivát **12**, dále aminol **18**

a sirmý derivát **34** sice vykázaly terapeutický index vyšší než 5, jejich hodnota IC₅₀ inhibice tvorby NO je však vyšší než 10 μmol/l a nelze je tedy považovat za dostatečně účinné.

Z testování nevyplývá žádná zřetelnější závislost hodnoty terapeutického indexu či aktivity na struktuře, pozornost si zaslouží des-E-deriváty **23** a **24** a nenasycené diketony **10** a **12**, které měly hodnoty terapeutického indexu vyšší než 5. Aktivita jejich příbuzných derivátů by měla být dále studována. Pozornost zasluhují také sloučeniny příbuzné kyselině **46** pro její vysoký terapeutický index.

Závěrem je potřeba podotknout, že pouhý *in vitro* screening inhibice tvorby NO u makrofágů aktivovaných lipopolysacharidem není dostatečný k prokázání protizánětlivých účinků testovaných sloučenin. Je potřeba rozšířit testování o testování vlivu na tvorbu ROS u aktivovaných makrofágů, účinku na cyklooxygenázy či lipoxygenázy apod. Teprve tehdy může být o protizánětlivých účincích testovaných sloučenin rozhodnuto. Screeningem však bylo zjištěno několik zajímavých sloučenin, které si zaslouží další studium jejich protizánětlivé aktivity.

ZÁVĚR

1. Byla provedena literární rešerše imunosupresivních a protizánětlivých účinků přírodních i syntetických triterpenoidů.
2. U padesáti triterpenoidních derivátů byl proveden *in vitro* screening inhibice tvorby NO myšími makrofágy B10R stimulovanými lipopolysacharidem.
3. Bylo nalezeno osm sloučenin s terapeutickým indexem vyšším než 5, z nichž jeden derivát měl hodnotu terapeutického indexu vyšší než 10.
4. Sloučeniny **10**, **23**, **24** a **26** vykazují inhibici tvorby NO s hodnotou $IC_{50} < 10 \mu\text{mol/l}$ a zároveň mají terapeutický index vyšší než 5.
5. Na základě sledování závislosti účinnosti na struktuře si další studium zasluhují deriváty příbuzné des-E-derivátům **23** a **24** a nenasyceným diketonům **10** a **12**.

LITERATURA

- Abe N, Ebina T, Ishida N: Interferon induction by glycyrrhizin and glycyrrhetic acid in mice. *Microbiol. Immunol.*: **26**, 535 (1982)
- Ahn KS, Noh EJ, Zhao HL, Jung SH, Kang SS, Kim YS: Inhibition of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase II by *Platycodon grandiflorum* saponins via suppression of nuclear factor- κ B activation in RAW 264.7 cells. *Life Sci.*: **76**, 2315 (2005)
- Ali MS, Ibrahim SA, Jalil S, Choudhary MI: Ursolic Acid: A Potent Inhibitor of Superoxides Produced in the Cellular System. *Phytother. Res.*: in press
- Altinier G, Sosa S, Aquino RP, Mencherini T, Della Loggia R, Tubaro A: Characterization of Topical Antiinflammatory Compounds in *Rosmarinus officinalis* L. *J. Agric. Food Chem.*: **55**, 1718 (2007)
- Altmann A, Fischer L, Schubert-Zsilavec M, Steinhilber D, Werz O: Boswellic acids activate p42(MAPK) and p38 MAPK and stimulate Ca(2+) mobilization. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*: **290**, 185 (2002)
- Ammon HP, Mack T, Sigh GB, Safayhi H: Inhibition of leukotriene B4 formation in rat peritoneal neutrophils by an ethanolic extract of the gum resin exudate of *Boswellia serrata*. *Planta Med.*: **57**, 203 (1991)
- Ammon HPT, Safayhi H, Mack T, Sabieraj J: Mechanism of antiinflammatory actions of curcumin and boswellic acids. *J. Ethnopharmacol.*: **38**, 113 (1993)
- Bae EA, Shin JE, Kim DH: Metabolism of Ginsenoside Re by Human Intestinal Microflora and Its Estrogenic Effect. *Biol. Pharm. Bull.*: **28**, 1903 (2005)
- Baricevic D, Sosa S., Della Loggia R, Tubaro A, Simonovska B, Krasna A, Zupancic A: Topical anti-inflammatory activity of *Salvia officinalis* L. leaves: the relevance of ursolic acid. *J. Ethnopharmacol.*: **75**, 125 (2001)
- Barrera LF, Kramnik I, Skamene E, Radzioch D: Nitrite production by macrophages derived from BCG-resistant and -susceptible congenic mouse strains in response to IFN- γ and infection with BCG. *Immunology*: **82**, 457 (1994)
- Bermejo Benito P, Abad Martinez MJ, Silván Sen AM, Sanz Gómez A, Fernandez L, Matellano L, Sánchez Contreras S, Díaz Lanza AM: *In vivo* and *in vitro* antiinflammatory activity of saikosaponins. *Life Sci.*: **63**, 1147 (1998)

- Bernstein PR, Edwards PD, Williams JC: Inhibitors of human leukocyte elastase. *Prog. Med. Chem.*: **31**, 59 (1994)
- Bernard P, Scior T, Didier B, Hibert M, Berthon JY: Ethnopharmacology and bioinformatic combination for leads discovery: application to phospholipase A2 inhibitors. *Phytochemistry*: **58**, 865 (2001)
- Black MM, Speer FD: Further observations on the effects of cancer chemotherapeutic agents on the in vitro dehydrogenase activity of cancer tissue. *J. Natl. Cancer. Inst.*: **14**, 1147 (1954)
- Cichewicz RH, Kouzi SA: Chemistry, Biological Activity, and Chemotherapeutic Potential of Betulinic Acid for the Prevention and Treatment of Cancer and HIV Infection. *Med. Res. Rev.*: **24**, 90 (2004)
- Dahmen U, Gu YL, Dirsch O, Fan LM, Li J, Shen K, Broelsch CE: Boswellic Acid, a Potent Antiinflammatory Drug, Inhibits Rejection to the Same Extent as High Dose Steroids. *Transplant Proc.*: **33**, 539 (2001)
- Dai JH, Iwatani Y, Ishida T, Terunuma H, Kasai H, Iwakura Y, Fujiwara H, Ito M: Glycyrrhizin enhances interleukin-12 production in peritoneal macrophages. *Immunology*: **103**, 235 (2001)
- Džubák P, Hajdúch M, Šarek J: Biologické účinky triterpenoidů: protinádorová aktivita. *Klin. Farmakol. Farm.*: **18**, 14 (2004).
- Džubák P, Hajdúch M, Vydra D, Hůšťová A, Kvasnica M, Biedermann D, Marková L, Urban M, Šarek J: Pharmacological activities of natural triterpenoids and their therapeutic implications. *Nat. Prod. Rep.*: **23** 394 (2006)
- Elliott S, Hays E, Mayor M, Sporn M, Vincenti M: The triterpenoid CDDO inhibits expression of matrix metalloproteinase-1, matrix metalloproteinase-13 and Bcl-3 in primary human chondrocytes. *Arthritis Res. Ther.*: **5**, R285 (2003)
- Fernandes AMS, Baker EA, Martin JT: Studies on plant cuticle VI. Isolation and fractionation of cuticular waxes. *Ann. Appl. Biol.*: **53**, 43 (1964).
- Fulda S, Jeremias I, Pietsch T, Debatin KM: Betulinic acid: a new cytotoxic agent against malignant brain-tumor cells. *Int. J. Cancer*: **82**, 435 (1999)
- Green SJ, Anigolu J, Raney JJ: Oxidative Metabolism of Murine Macrophages. *In Current Protocols in Immunology*, Unit 14.5, supplement 12 (1994)
- Gupta MB, Bhalla TN, Gupta GP, Mitra CR, Bhargava KP: Antiinflammatory activity of natural products (I) Triterpenoids. *Eur. J. Pharmacol.*: **6**, 67 (1969)

- Gupta SS: Prospects and perspectives of natural plants products in medicine. *Indian J. Pharmacol.*: **26**, 1 (1994)
- Hajduch M, Sarek J: Triterpenoid derivatives. PCT Int. Patent Appl. WO0190136, 23 May 2001
- Hodges LD, Kweifio-Okai G, Macrides TA: Antiprotease effect of anti-inflammatory lupeol esters. *Mol. Cell. Biochem.*: **252**, 97 (2003)
- Honda T, Finlay HJ, Gribble GW, Suh N, Sporn MB: New enone derivatives of oleanolic acid and ursolic acid as inhibitors of nitric oxide production in mouse macrophages. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*: **7**, 1623 (1997)
- Honda T, Honda Y, Favalaro FG, Gribble GW, Suh N, Place AE, Rendi MH, Sporn MB: A Novel Dicyanotriterpenoid, 2-Cyano-3,12-dioxooleana-1,9(11)-dien-28-onitrile, Active at Picomolar Concentrations for Inhibition of Nitric Oxide Production. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*: **12**, 1027 (2002)
- Honda T, Liby KT, Su X, Sundararajan C, Honda Y, Suh N, Risingsong R, Williams CR, Royce DB, Sporn MB, Gribble GW: Design, synthesis, and anti-inflammatory activity both *in vitro* and *in vivo* of new betulinic acid analogues having an enone functionality in ring A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*: **16**, 6306 (2006)
- Honda T, Rounds BV, Bore L, Favalaro FG, Gribble GW, Suh N, Wang Y, Sporn MB: Novel synthetic oleanane triterpenoids: a series of highly active inhibitors of nitric oxide production in mouse macrophages. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*: **9**, 3429 (1999)
- Honda T, Rounds BV, Gribble GW, Suh N, Wang Y, Sporn MB: Design and synthesis of 2-cyano-3,12-dioxoolean-1,9-dien-28-oic acid, a novel and highly active inhibitor of nitric oxide production in mouse macrophages. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*: **8**, 2711 (1998)
- Chevrier MR, Ryan AE, Lee DYW, Zhongze M, Wu-Yan Z, Via CS: *Boswellia carterii* Extract Inhibits TH1 Cytokines and Promotes TH2 Cytokines In Vitro. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*: **12**, 575 (2005)
- Ikeda Y, Murakami A, Nishizawa T, Ohigashi H: Ursolic Acid Enhances Cyclooxygenases and Tumor Necrosis Factor- α Expression in Mouse Skin. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*: **70**, 1033 (2006)
- Ikeda Y, Murakami A, Ohigashi H: Ursolic acid promotes the release of macrophage migration inhibitory factor via ERK2 activation in resting mouse macrophages. *Biochem. Pharmacol.*: **70**, 1497 (2005)

- Itoh K, Kumagai K: Augmentation of NK activity by several anti-inflammatory agents. *Excerpta Med.*: **641**, 460 (1983)
- Ivanov VM: The 125th Anniversary of the Griess Reagent. *J. Anal. Chem.*: **59**, 1002 (2004)
- Leung CY, Liu L, Wong RNS, Zeng YY, Li M, Zhou H: Saikosaponin-d inhibits T cell activation through the modulation of PKC θ , JNK, and NF- κ B transcription factor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*: **338**, 1920 (2005)
- Matsui S, Matsumoto H, Sonoda Y, Ando K, Aizu-Yokota E, Sato T, Kasahara T: Glycyrrhizin and related compounds down-regulate production of inflammatory chemokines IL-8 and eotaxin 1 in a human lung fibroblast cell line. *Int. Immunopharmacol.*: **4**, 1633 (2004)
- Park EK, Choo MK, Han MJ, Kim DH: Ginsenoside Rh1 Possesses Antiallergic and Anti-Inflammatory Activities. *Int. Arch. Allergy Immunol.*: **133**, 113 (2004)
- Park EK, Choo MK, Kim EJ, Han MJ, Kim DH: Antiallergic Activity of Ginsenoside Rh2. *Biol. Pharm. Bull.*: **26**, 1581 (2003)
- Park EK, Shin YW, Lee HU, Kim SS, Lee YC, Lee BY, Kim DH: Inhibitory Effect of Ginsenoside Rb1 and Compound K on NO and Prostaglandin E2 Biosyntheses of RAW264.7 Cells Induced by Lipopolysaccharide. *Biol. Pharm. Bull.*: **28**, 652 (2005)
- Park KH, Park J, Koh D, Lim Y: Effect of Saikosaponin-A, a Triterpenoid Glycoside, Isolated from *Bupleurum falcatum* on Experimental Allergic Asthma. *Phytother. Res.*: **16**, 359 (2002)
- Place AE, Suh N, Williams CR, Risingsong R, Honda T, Honda Y, Gribble GW, Leesnitzer LM, Stimmel JB, Willson TM, Rosen E, Sporn MB: The Novel Synthetic Triterpenoid, CDDO-Imidazolide, Inhibits Inflammatory Response and Tumor Growth *in Vivo*. *Clin. Cancer Res.*: **9**, 2798 (2003)
- Pozharitskaya ON, Ivanova SA, Shikov AN, Makarov VG: Separation and quantification of terpenoids of *Boswellia serrata* Roxb. extract by planar chromatography techniques (TLC and AMD). *J. Sep. Sci.*: **29**, 2245 (2006)
- Regner B, Dušek L, Hajdúch M: Software chemorezist (verze 1.0) - komplexní nástroj pro analýzu dat a management testů chemorezistence nádorů. *Klin. Onkol.*: **13**, 30 (2000)
- Ringbom T, Segura L, Noreen Y, Perera P, Bohlin L: Ursolic Acid from *Plantago major*, a Selective Inhibitor of Cyclooxygenase-2 Catalyzed Prostaglandin Biosynthesis. *J. Nat. Prod.*: **61**, 1212 (1998)

- Safayhi H, Mack T, Sabieraj J, Anazodo MI, Subramanian LR, Ammon HP: Boswellic acids: novel, specific, nonredox inhibitors of 5-lipoxygenase. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*: **261**, 1143 (1992)
- Safayhi H, Rall B, Sailer ER, Ammon HPT: Inhibition by boswellic acids of human leukocyte elastase. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*: **281**, 460 (1997)
- Safayhi H, Sailer ER, Ammon HP: Mechanism of 5-lipoxygenase inhibition by acetyl-11-keto-beta-boswellic acid. *Mol. Pharmacol.*: **47**, 1212 (1995)
- Sami A, Taru M, Salme K, Jari YK: Pharmacological properties of the ubiquitous natural product betulin. *Eur. J. Pharm. Sci.*: **29**, 1 (2006)
- Shishodia S, Majumdar S, Banerjee S, Aggarwal BB: Ursolic Acid Inhibits Nuclear Factor- κ B Activation Induced by Carcinogenic Agents through Suppression of I κ B Kinase and p65 Phosphorylation: Correlation with Down-Regulation of Cyclooxygenase 2, Matrix Metalloproteinase 9, and Cyclin D1. *Cancer Res.*: **63**, 4375 (2003)
- Spáčilová P: Bakalářská práce, Univerzita Karlova v Praze, Praha 2006
- Stýskalová L: Doktorská dizertační práce, Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc 2006
- Subbaramaiah K, Michaluart P, Sporn MB, Dannenberg AJ: Ursolic Acid Inhibits Cyclooxygenase-2 Transcription in Human Mammary Epithelial Cells. *Cancer Res.*: **60**, 2399 (2000)
- Suh N, Wang Y, Honda T, Gribble GW, Dmitrovsky E, Hickey WF, Maue RA, Place AE, Porter DM, Spinella MJ, Williams CR, Wu G, Dannenberg AJ, Flanders KC, Letterio JJ, Mangelsdorf DJ, Nathan CF, Nguyen L, Porter WW, Ren RF, Roberts AB, Roche NS, Subbaramaiah K, Sporn MB: A Novel Synthetic Oleanane Triterpenoid, 2-Cyano-3,12-dioxolean-1,9-dien-28-oic Acid, with Potent Differentiating, Antiproliferative, and Anti-Inflammatory Activity. *Cancer Res.*: **59**, 336 (1999)
- Syrovets T, Büchele B, Krauss C, Laumonier Y, Simmet T: Acetyl-Boswellic Acids Inhibit Lipopolysaccharide-Mediated TNF- α Induction in Monocytes by Direct Interaction with I κ B Kinases. *J. Immunol.*: **174**, 498 (2005)
- Šarek J, Klinot J, Džubák P, Klinotová E, Nosková V, Křeček V, Kořínková G, Thomson JO, Janošťáková A, Wang S, Parsons S, Fisher PM, Zhelev NZ, Hajdúch M: New lupane derived compounds with pro-apoptotic activity in cancer cells: synthesis and structure-activity relationships. *J. Med. Chem.*: **46**, 5402 (2003)

- Takada Y, Aggarwal BB: Betulinic Acid Suppresses Carcinogen-Induced NF- κ B Activation Through Inhibition of I κ B α Kinase and p65 Phosphorylation: Abrogation of Cyclooxygenase-2 and Matrix Metalloprotease-9. *J. Immunol.*: **171**, 3278 (2003)
- Thuong PT, Min BS, Jin WY, Na MK, Lee JP, Seong RS, Lee YM, Song KS, Seong YH, Lee HK, Bae KH, Kang KS: Anti-complementary Activity of Ursane-Type Triterpenoids from *Weigela subsessilis*. *Biol. Pharm. Bull.*: **29**, 830 (2006)
- Tolstikova TG, Sorokina IV, Tolstikov GA, Tolstikov AG, Flekhter OB: Biological Activity and Pharmacological Prospects of Lupane Terpenoids: I. Natural Lupane Derivatives. *Russ. J. Bioorganic Chem.*: **32**, 37 (2006)
- Tolstikova TG, Sorokina IV, Tolstikov GA, Tolstikov AG, Flekhter OB: Biological Activity and Pharmacological Prospects of Lupane Terpenoids: II. Semisynthetic Lupane Derivatives. *Russ. J. Bioorganic Chem.*: **32**, 261 (2006)
- Urban M: Dizertační práce, Univerzita Karlova v Praze, Praha 2005
- Wasserman SI: Mediators of immediate hypersensitivity. *J. Allergy. Clin. Immunol.*: **72**, 101 (1983)
- Weniger B, Lobstein A, Um BH, Vonthron-Sénéchau C, Anton R, Jiménez Usuga N, Basaran H, Lugnier C: Bioactive Triterpenoids from *Vochysia pacifica* Interact with Cyclic Nucleotide Phosphodiesterase Isozyme PDE4. *Phytother. Res.*: **19**, 75 (2005)
- Yamashita K, Lu H, Lu J, Chen G, Yokoyama T, Sagara Y, Manabe M, Kodama H: Effect of three triterpenoids, lupeol, betulin, and betulinic acid on the stimulus-induced superoxide generation and tyrosyl phosphorylation of proteins in human neutrophils. *Clin. Chim. Acta*: **325**, 91 (2002)
- Yang ZG, Li HR, Wang LY, Li YH, Lu SG, Wen XF, Wang J, Daikonya A, Kitanaka S: Triterpenoids from *Hippophae rhamnoides* L. and Their Nitric Oxide Production - Inhibitory and DPPH Radical-Scavenging Activities. *Chem. Pharm. Bull.*: **55**, 15 (2007)
- Yim JS, Kim YS, Moon SK, Cho KH, Bae HS, Kim JJ, Park EK, Kim DH: Metabolic Activities of Ginsenoside Rb1, Baicalin, Glycyrrhizin and Geniposide to Their Bioactive Compounds by Human Intestinal Microflora. *Biol. Pharm. Bull.*: **27**, 1580 (2004)
- Ying QL, Rinehart AR, Simon RR, Cheronis JC: Inhibition of human leucocyte elastase by ursolic acid. *Biochem. J.*: **277**, 521 (1991)

- You HJ, Choi CY, Kim JY, Park SJ, Hahm KS, Jeong HG: Ursolic acid enhances nitric oxide and tumor necrosis factor- α production via nuclear factor- κ B activation in the resting macrophages. *FEBS Lett.*: **509**, 156 (2001)
- Yun Y, Han S, Park E, Yim D, Lee S, Lee CK, Cho K, Kim K: Immunomodulatory Activity of Betulinic Acid by Producing Pro-Inflammatory Cytokines and Activation of Macrophages. *Arch. Pharm. Res.*: **26**, 1087 (2003)
- Zdzisińska B, Rzeski W, Paduch R, Szuster-Ciesielska A, Kaczor J, Wejksza K, Kandefer-Szerszeń M: Differential effect of betulin and betulinic acid on cytokine production in human whole blood cell cultures. *Pol. J. Pharmacol.*: **55**, 235 (2003)

PODĚKOVÁNÍ

Závěrem bych ráda poděkovala všem těm, kteří mi byli nápomocni při sepisování této práce. Především chci poděkovat doc. MUDr. Mariánu Hajdúchovi, Ph.D. za mnohé konzultace a rady a zvláště za to, že mi umožnil pracovat na velmi zajímavém tématu na ještě zajímavějším pracovišti.

Stejně velký dík patří i RNDr. Janu Šarkovi, Ph.D. za velkou podporu a ochotu vyjít vstříc jak při práci v laboratoři, tak při sepisování práce. Děkuji i za rady při výběru testovaných sloučenin.

Děkuji také Bc. Anně Janošťákové za pečlivé vysvětlování a sledování mých prvních počinů v biologické laboratoři, Jiřímu Lipertovi a Veronice Drábkové za cenné rady při vlastním testování a všem dalším pracovníkům Laboratoře experimentální medicíny za příjemné a přátelské pracovní prostředí.

Svým kolegům ze Skupiny přírodních látek děkuji za ochotu podělit se o své cenné produkty a za zájem o mou práci.

V neposlední řadě bych ráda poděkovala doc. Mgr. Janu Černému, Ph.D. za to, že nejen pro mne, ale i pro ostatní studenty udělal z biologie zajímavou, dobrodružnou a krásnou vědu.

Nemohu také opomenout své rodiče, jimž vděčím za umožnění studia na vysoké škole, za pochopení a zázemí po celou dobu studia.