

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA FARMAKOGNOZIE

DIPLOMOVÁ PRÁCE

**Screenigová studie různých rostlinných taxonů a jejich vliv
na lidské enzymatické systémy I.**

Vedoucí katedry: PharmDr. Tomáš Siatka, CSc.

Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Marcela Šafratová, Ph.D.

Hradec Králové, 2018

Václav Šíkola

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že tato diplomová práce je mým samostatně vypracovaným autorským dílem. Veškerá literatura a ostatní zdroje, z nichž jsem při jejím zpracování čerpal, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a jsou řádně citovány. Práce nebyla použita k získání stejného nebo jiného titulu.

V Hradci Králové, 2018

Václav Šikola

PODĚKOVÁNÍ

Chtěl bych na tomto místě poděkovat PharmDr. Marcele Šafratové, PhD. za vedení mé práce, cenné rady potřebné pro vypracování práce a pomoc při interpretaci výsledků. Velké dík také patří Mgr. Daniele Hulcové za asistenci a cenné rady při práci v laboratoři. Dále bych chtěl poděkovat Prof. RNDr. Lubomíru Opletalovi, CSc. za změření biologické aktivity připravených extraktů. Na posledním místě bych rád poděkoval své rodině za podporu v osobním i studijním životě.

OBSAH

PROHLÁŠENÍ.....	2
PODĚKOVÁNÍ	3
OBSAH	4
SEZNAM OBRÁZKŮ.....	7
SEZNAM TABULEK.....	7
SEZNAM ZKRATEK	8
1 ÚVOD	9
2 CÍL PRÁCE	11
3 TEORETICKÁ ČÁST	12
3.1 Alzheimerova choroba	12
3.1.1 Patofyziologie	12
3.1.2 Klinický obraz.....	14
3.1.3 Diagnostika	15
3.1.4 Terapie.....	16
3.1.4.1 Inhibitory mozkových cholinesteráz	16
3.1.4.2 Antagonisté NMDA receptorů.....	19
3.2 <i>Desmodium adscendens</i>	19
3.2.1 Popis	19
3.2.2 Účinky	20
3.2.3 Obsahové látky	21
3.3 <i>Codonopsis pilosula</i>	22
3.3.1 Popis	22
3.3.2 Účinky	23
3.3.3 Obsahové látky	23
3.4 <i>Centella asiatica</i>	24
3.4.1 Popis	24
3.4.2 Účinky	25
3.4.3 Obsahové látky	26
3.5 <i>Bacopa monnieri</i>	27
3.5.1 Popis	27
3.5.2 Účinky	27

3.5.3 Obsahové látky	28
3.6 <i>Epimedium sagittatum</i>	29
3.6.1 Popis	29
3.6.2 Účinky	30
3.6.3 Obsahové látky	30
4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	32
4.1 Všeobecné postupy	32
4.1.1 Destilace a odpařování	32
4.2 Izolace a GC/MS analýza	32
4.2.1 Materiál a vybavení	32
4.2.1.1 Rozpouštědla	32
4.2.1.2 Chemikálie	32
4.2.1.3 Detekční činidla	33
4.2.1.4 Vytvájecí soustavy pro tenkovrstvou chromatografii	33
4.2.1.5 Chromatografické adsorbenty	33
4.2.1.6 Přístroje	33
4.2.2 Biologický materiál	34
4.2.3 Příprava extraktů pro screening	34
4.2.3.1 Příprava sumárního extraktu	34
4.2.3.2 Kontrolní tenkovrstvá chromatografie	35
4.2.3.3 Příprava alkaloidního extraktu	36
4.2.4 GC/MS analýza	37
4.3 Měření inhibiční aktivity extraktů vůči HuAChE a HuBuChE	37
4.3.1 Chemikálie a materiál	37
4.3.1.1 Chemikálie	37
4.3.1.2 Pufry	38
4.3.1.3 Materiál	38
4.3.2 Přístroj použitý ke stanovení cholinesterázové inhibiční aktivity	38
4.3.3 Podmínky měření	38
4.3.4 Příprava hemolyzátu	38
4.3.5 Stanovení cholinesterázové inhibiční aktivity (hodnoty IC ₅₀)	39
4.3.5.1 Stanovení aktivity enzymů	39
4.3.5.2 Stanovení aktivity extraktů	40
5 VÝSLEDKY A DISKUZE	41

5.1 GC/MS analýza extraktů	41
5.2 Inhibiční aktivity izolovaných alkaloidních extraktů vůči HuAChE a HuBuChE	41
6 ZÁVĚR.....	43
7 ABSTRAKT.....	44
8 ABSTRACT.....	45
9 LITERATURA	46

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. č. 1	Acetylcholin.....	13
Obr. č. 2	A galantamin, B rivastigmin, C donepezil.....	18
Obr. č. 3	<i>Desmodium adscendens</i>	20
Obr. č. 4	A hordenin, B dimethyltryptamin, C dimenoxyfenylethylamin, D salsolin.....	21
Obr. č. 5	<i>Codonopsis pilosula</i>	22
Obr. č. 6	A kodonopsin, B kodonopsinin, C kodotubulosin A, D kodonopyrrolidium B.....	24
Obr. č. 7	<i>Centella asiatica</i>	25
Obr. č. 8	Deriváty kyselina asiaticové.....	26
Obr. č. 9	<i>Bacopa monnieri</i>	27
Obr. č. 10	Obecná struktura bakopasidů.....	29
Obr. č. 11	<i>Epimedium sagittatum</i>	30
Obr. č. 12	Icariin.....	31
Obr. č. 13	Kontrolní tenkovrstvá chromatografie extraktů.....	35
Obr. č. 14	Kontrolní tenkovrstvá chromatografie extraktů.....	36

SEZNAM TABULEK

Tabulka č. 1	IC ₅₀ vybraných inhibitorů.....	19
Tabulka č. 2	Přehled použitého biologického materiálu.....	34
Tabulka č. 3	Přehled označení zpracovávaných drog.....	35
Tabulka č. 4	Přehled hmotností získaných sumárních a alkaloidních extraktů.....	37
Tabulka č. 5	Inhibiční aktivita získaných alkaloidních extraktů.....	41
Tabulka č. 6	Inhibiční aktivity standardů.....	42

SEZNAM ZKRATEK

AD	Alzheimerova choroba
ACh	acetylcholin
AChE	acetylcholinesteráza
AChEI	inhibitor acetylcholinesterázy
AMK	aminokyseliny
APP	amyloidový prekurzorový protein
HuAChE	lidská acetylcholinesteráza
HuBuChE	lidská butyrylcholinesteráza
CHOPN	chronická obstrukční plicní choroba
NÚ	nežádoucí účinky
PDE-5	fosfodiesteráza-5
TČM	tradiční čínská medicína

1 ÚVOD

Rostliny hrají důležitou roli v oblasti lidského zdraví již od nepaměti. Nejstarším dokladem toho tvrzení je nález přirozeně mumifikovaného těla zamrzlého v ledu, které bylo objeveno společně s kusy houby *Piptoporus betulinus* vyznačující se projímavými a antiparazitickými účinky. Pitvou tohoto těla byla zjištěna přítomnost vajíček parazita *Trichuris trichiura*, je tedy zřejmé, že již v době kolem 3 300 let před naším letopočtem využíval člověk přírodní zdroje k léčebným účelům. Objevování léčivých rostlin probíhalo metodou pokus – omyl, lidé neměli představu o existenci obsahových látek a použití rostlin k léčení bylo založeno pouze na zkušenosti. S rozvojem vědy, především analytických metod a poznáváním chemické struktury látek, docházelo postupně k odhalování zdrojů léčebných vlastností rostlin – obsahových látek. Tyto sekundární metabolity (alkaloidy, třísloviny, flavonoidy, kardioglykosidy a další) našly uplatnění v léčbě různých onemocnění nebo se staly předlohou nových molekul s biologickou aktivitou. [1; 2]

Bezesporu nejvýznamnější skupinou sekundárních metabolitů rostlin z pohledu medicíny jsou alkaloidy, přírodní látky obvykle s heterocyklicky vázaným dusíkem, které se vyznačují velmi specifickými účinky. Dusík, který je zdrojem bazicity těchto sloučenin, se v nich může vyskytovat i ve formě alifaticky vázané aminoskupiny (např. efedrin, kolchicin) – tyto látky jsou označovány jako protoalkaloidy. Biosyntéza alkaloidů probíhá zpravidla z aminokyselin (vlastní alkaloidy), v některých případech je dusík zabudován do struktury transaminací na konci syntézy (pseudoalkaloidy). Uplatnění těchto látek zasahuje do různých oblastí medicíny, využívají se jako analgetika, narkotika, antiarytmika, chemoterapeutika, antiparazitika, lokální anestetika, anticholinergika a jiné. [3]

Významnou roli v léčbě Alzheimerovy choroby (AD) sehrály alkaloidy obsažené v taxonech čeledi *Amaryllidaceae* – především galantamin. Taxony čeledi *Amaryllidaceae* obsahují alkaloidy rozmanitých struktur vyznačující se účinky cytotoxickými, antivirovými, antibakteriálními, analgetickými a především inhibiční aktivitou vůči cholinesterázám, čehož se s úspěchem využívá při léčbě AD. Právě tento terapeutický přístup se stal klinicky nejpoužívanějším při terapii AD.

Alkaloidy inhibující cholinesterázy nejsou ovšem obsaženy pouze v čeledi *Amaryllidaceae*. Typickým příkladem je alkaloid fysostigmin, který se nachází v semenech rostliny *Fysostigma venenosum* (*Fabaceae*). Fysostigmin je ovšem pro svůj krátký biologický poločas a velké množství nežádoucích účinků pro terapii nevhodný, proto se stal spíše strukturální předlohou. Jeho derivát rivastigmin je dnes hojně používán v terapii AD. Právě strukturální rozmanitost alkaloidů schopných inhibovat lidské cholinesterázy je důvodem screeningu různých rostlinných taxonů a jejich obsahových látek za účelem nalezení nových potenciálně účinných léčiv. [4]

2 CÍL PRÁCE

1. Zpracování rešerše k problematice zadaných taxonů (výskyt, účinky, obsahové látky)
2. Příprava sumárních extraktů a alkaloidních koncentrátů
3. GC/MS analýza alkaloidních extraktů, identifikace obsahových látek
4. Stanovení inhibiční aktivity alkaloidních extraktů vůči acetylcholinesteráze a butyrylcholinesteráze
5. Vyhodnocení výsledků a sepsání práce

3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Alzheimerova choroba

Alzheimerova choroba je degenerativní onemocnění nervové soustavy, které vzniká na podkladě zániku neuronů, jehož klinickým projevem je demence. Postihuje především lidi středního a vyššího věku, je příčinou zhruba 60 % demencí. Alzheimerovou chorobou trpí přibližně 1 % populace a je 4. nejčastější příčinou smrti. Obecně je AD poddiagnostikována z důvodu přisuzování symptomů přirozenému procesu stárnutí. V lepším případě je objevena až ve vyšších stádiích, proto je účinná léčba poskytnuta pouze malému vzorku populace. [5; 6; 7]

3.1.1 Patofyziologie

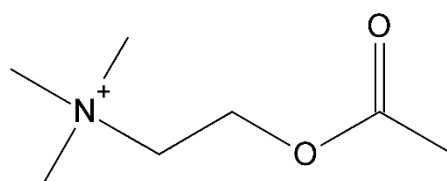
Patogeneze AD není dodnes zcela objasněna. Je úzce spojena s procesem stárnutí, kdy dochází k přirozeným změnám, jako je zmenšování velikosti mozku, atrofii neuronů a změnám na synapsích, které jsou u pacientů trpících AD znatelnější, než u zbytku populace. Dále dochází k degeneraci mozkových proteinů a tvorbě patologických proteinů, které tvoří plaky. Tyto změny u AD lze klasifikovat do dvou úrovní – makroskopické a mikroskopické. [8; 9]

Změny na makroskopické úrovni se projevují kortiko-subkortikální atrofií mozku, ztenčením mozkových gyrů a z toho plynoucího rozšíření sulků a mozkových komor, atrofií neuronů zejména v oblasti hipokampu a entorhinálního kortexu. Charakteristický nález představují extracelulární senilní plaky (tzv. Alzheimerovské plaky) tvořené především nerozpustným β -amyloidem a intracelulární depozita neurofibrilárních klubek tvořena rozpustným τ -proteinem, které jsou důsledkem změn mikroskopických. [8; 10]

Mikroskopické změny na extracelulární úrovni jsou spojeny s ukládáním patologické bílkoviny β -amyloidu vznikající z fragmentů amyloidového prekurzorového proteinu (APP). APP je za běžných podmínek štěpen enzymem α -sekretázou na solubilní fragmenty, které obsahují 40 – 42 AMK a jsou nezbytné pro správné fungování neuronu – např. pro tvorbu nových neuronálních synapsí. Při patologickém procesu je APP štěpen

enzymy β - a γ -amylázou na fragmenty o délce 42 nebo 43 AMK. Tyto oligopeptidy nejprve oligomerují (spojení dvou částic mezi sebou) a následně koagulují v extracelulárním prostoru kortexu. Polymerací těchto neurotoxických oligomerů vznikají již zmíněné β -amyloidové senilní plaky, které jsou místem různých degenerativních procesů, jako je sterilní zánět, uvolnění excitačních AMK nebo aktivace některých proteinkináz, jejichž důsledkem je apoptóza postižených neuronů. Tento proces je rovněž popisován jako amyloidní teorie vzniku AD. [8; 9; 11; 12]

Amyloidní teorie ovšem není schopna vysvětlit poruchu kognitivních funkcí u pacientů s AD, ta vychází z cholinergní teorie. Již v raných stádiích onemocnění je porušen centrální acetylcholinergní systém, který je důležitý např. pro mechanismy krátkodobé paměti. Dochází ke snížené tvorbě a uvolňování neurotransmiteru acetylcholinu (ACh) na presynaptických zakončeních. Současně je snížena hladina enzymu cholinacetyltransferázy odpovědného za syntézu ACh z jeho prekurzorů (cholin a acetylkoenzym A). Je také zvýšeno štěpení ACh v presynaptické štěrbině enzymy cholinesterázami, které štěpí ACh na cholin a kyselinu octovou. Fyziologicky se vyskytují v lidském mozku 2 typy acetylcholinesteráz (AChE) – majoritní tetramerní forma G4 vyskytující se v rozpustné a membránové (vázané) formě a minoritní monomerní rozpustná forma G1. Jejich poměr se v různých částech mozku liší. U pacientů s AD je G4 forma v membránové formě v některých oblastech mozku selektivně snížena až o 90 %, hladina formy G1 zůstává relativně zachována. Výskyt těchto molekulárních izoform AChE je příčinou různé účinnosti inhibitorů AChE v jednotlivých částech mozku způsobené odlišnou afinitou k jednotlivým izoformám. V oblastech plaků jsou tvořeny enzymy butyrylcholinesterázy (BuChE), které výrazně přispívají k odbourávání ACh. Dále dochází k redukci počtu nikotinových cholinergních receptorů (množství muskarinových receptorů nebývá změněno). Těmito mechanismy dochází ke zřetelnému poklesu cholinergní transmise v mozku, která je příčinou klinických projevů onemocnění. [6; 13]



Obr. č. 1 - Acetylcholin

V patofyziologii AD hraje nedílnou roli také glutamátergní systém, který je důležitý pro proces učení a paměti. Jedná se o nejrozšířenější neuromediátorový systém v mozku vůbec. Aminokyselina glutamát se v tomto systému váže na 3 druhy receptorů – NMDA (N-methyl-D-aspartátový), AMPA ((S)-amino-3-hydroxyl-5-methyl-4-izoxazolepropionové) a kainátový receptor. Mechanismem dlouhodobé potenciace potom dochází k tvorbě paměťových stop. Glutamátergní neurony jsou lokalizovány především v kortexu, amygdalách, hipokampu a bazálních gangliích. Při AD dochází k nadměrnému uvolňování glutamátu i dalších excitačních aminokyselin (např. aspartát), což má za následek vznik šumů na receptorech a narušení dlouhodobé potenciace. Nadměrná stimulace glutamátergního systému také podporuje programovanou buněčnou smrt – apoptózu. [6; 14]

3.1.2 Klinický obraz

Hlavním projevem AD je demence, ta může být ovšem způsobena i jinými klinickými jednotkami – např. Parkinsonova choroba, demence s Lewyho tělísky, frontotemporální lobální demence, tumor, roztroušená skleróza, Lymská borelióza a další. Příznaky demence bývají často přisuzovány procesu stárnutí, proto bývá AD u pacientů odhalena až v pokročilejších stádiích. Demence se vyznačuje zapomínáním, poruchou prostorové představivosti a orientace, celkovou zmateností, poruchami soudnosti a poklesem intelektu. Potíže pacientů se stupňují od občasného zapomínání přes poruchy spánku, chování, logického myšlení, patických nálad až po absolutní nesoběstačnost (inkontinence moči a stolice, hygiena, potrava). Progrese onemocnění od prvních projevů do exitu je průměrně 7-10 let, tato doba může být díky včasnému zahájení terapie prodloužena až na 15 let a více. Příčinami smrti pacientů s AD bývají většinou bronchopneumonie a neobvyklé úrazy jako důsledek neurodegenerace. [9; 15]

Dle závažnosti jednotlivých projevů onemocnění lze průběh nemoci rozdělit do tří stádií. První stádium je charakteristické pouze mírnými a snadno přehlédnutelnými příznaky, jako je zhoršování paměti, prostorová desorientace, dočasná časová desorientace nebo ztráta iniciativy. Ve druhém stadiu se příznaky stupňují a brání postiženému rutinně vykonávat každodenní činnosti, např. oblékání, stravování, hygiena. Občas se vyskytují halucinace a dochází ke zhoršování řečových schopností. Třetí stádium se projevuje absolutní nesoběstačností a kognitivní poruchy vedou až

k rozpadu osobnosti. Ostrý přechod mezi stádii není možno stanovit, ne vždy se u každého pacienta projeví všechny příznaky charakteristické pro jednotlivá stadia nebo se objeví dříve či později. Přechod mezi jednotlivými stádii může být velmi rychlý nebo trvá i několik let. [16]

3.1.3 Diagnostika

Včasné stanovení diagnózy a zahájení léčby je hlavním předpokladem příznivé prognózy u pacientů s AD. Prvním krokem diagnostiky je stanovení demence a vyloučení jejích dalších možných příčin. Důležité je vyloučení stavů demenci připomínajících (jiná somatická onemocnění, psychické vyčerpání a emoční nestabilita) metodami diferenciální diagnostiky. Významný je průběh a klinický obraz, především pak rychlost progresu jednotlivých projevů. [5; 9]

Pro stanovení závažnosti onemocnění existují různá kritéria a škálovací systémy. Diagnostická kritéria NINCDS-ADRDA (National Institute of Neurological and Communicative Disorders – Alzheimer's Disease and Related Dementias Association) z roku 1984 dělí diagnózu na 4 typy – pravděpodobnou, možnou, nepravděpodobnou a jistou. Dle těchto kritérií jsou pacienti testováni klinicky i psychologicky v oblasti jednotlivých kognitivních domén, kterými jsou paměť, řeč, vnímání, pozornost, orientace, řešení problému a schopnost normálního fungování. [17] Tato kritéria byla později rozšířena o další oblast – zhodnocení biomarkerů, které se dělí do 2 skupin – markery ukládání β -amyloidu (snížení hladiny $A\beta_{42}$ v mozkomíšním moku) a markery neuronálního poškození a neurodegenerace (zvýšení koncentrace τ -proteinu a fosforylovaného τ -proteinu v mozkomíšním moku, temporální a parietální atrofie na magnetické rezonanci mozku). Biomarkery jsou považovány za podporující nálezy ke kritériím NINCDS-ADRDA. Kritéria Americké psychiatrické asociace (DSM-IV) jsou velmi podobná a mají stejné výstupy jako NINCDS-ADRDA. Symptomy demence (dle DSM-IV) jsou porucha paměti, porucha abstraktního myšlení, porucha úsudku a plánování, poruchy komunikace, apraxie, kognitivní úbytek omezující nemocného, pokles schopností oproti minulosti. Škála ASAD (Alzheimer's Disease Assessment Scale) zkoumá kognitivní i nekognitivní složku onemocnění, je tedy komplexnější. [5; 17; 18]

Na problematiku diagnostiky lze také nahlížet z pohledu testů a prováděných vyšetření. MSSE (Mini-Mental State Examination) je orientační screeningový nástroj, který testuje kognitivní funkce pomocí 30bodové škály. Zdravý jedinec by v tomto testu měl dosáhnout 24 a více bodů. Je také třeba vzít v úvahu ovlivnění výsledků různými faktory – např. dosažené vzdělání, pozornost, verbální úroveň. Dalším testem je CDT (Clock Drawing Test), který se často používá spolu s MSSE v kumulativním skóre. Pro potvrzení diagnózy jsou využívány zobrazovací metody (např. magnetická rezonance) k zjištění strukturálních změn v mozku. [19; 15]

3.1.4 Terapie

Vzhledem k neúplné znalosti etiopatogeneze AD lze použít pouze léčbu symptomatickou – zmírňující příznaky, zpomalující progresi onemocnění a oddalující nástup terminálních stádií. Kauzální léčba, která by byla schopna AD vyléčit, není zatím známa. Léčbu farmaky je možno rozdělit na kognitivní (ovlivňující postižené kognitivní funkce) a nekognitivní (řeší přidružené příznaky jako deprese, psychózy, nespavost a změny chování). Nedílnou součástí terapie jsou nefarmakologické přístupy – trénink paměti, speciální režimová opatření, rehabilitace a obecně péče o pacienta.

V současné době se k léčbě AD používají 2 skupiny látek. Jedná se o inhibitory mozkových cholinesteráz a inhibitory NMDA receptorů. [9]

3.1.4.1 Inhibitory mozkových cholinesteráz

Použití inhibitorů cholinesteráz při léčbě AD vychází z cholinergní teorie vzniku této nemoci. Mechanismem účinku této skupiny léčiv je inhibice cholinesteráz – acetylcholinesteráz (obou jejich izoform, tzn. G1 i G4) a butyrylcholinesteráz. Některé inhibitory (galantamin, donepezil) jsou relativně selektivní k acetylcholinesteráze, druhá skupina (rivastigmin) jsou koinhibitory obou typů esteráz (duální inhibitory). Působením těchto léčiv dochází ke zvýšení koncentrace ACh schopného vazby na své receptory a tedy ke zvýšení cholinergní neurotransmise, která ovšem může vyvolat závažné nežádoucí účinky (NÚ). Typickým příkladem těchto NÚ je nevolnost, zvracení, extrapyramidové symptomy, bradykardie, neklid. Frekvence výskytu výše uvedených NÚ se u jednotlivých léčiv liší a dle jejich závažnosti často bývá důvodem ukončení terapie. Inhibitory cholinesteráz významně přispívají ke zlepšení kognitivních i nekognitivních

symptomů pacientů s AD, na druhou stranu neexistují důkazy svědčící o zpomalení průběhu onemocnění. [13; 20]

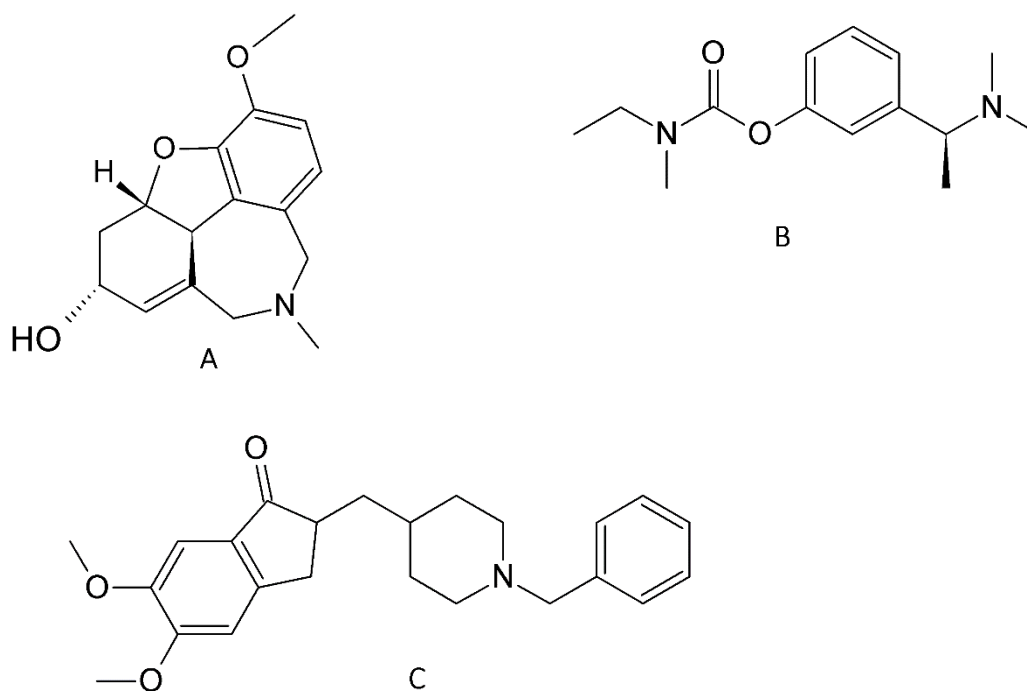
Galantamin (GALANTAMIN MYLAN©) je alkaloid, který se nachází v taxonech čeledi *Amaryllidaceae* (rody *Chlidanthus*, *Eucharis*, *Eustephia*, *Galanthus*, *Leucojum*, *Lycoris*, *Narcissus*) a některých dalších – *Agavaceae*, *Haemodoraceae*, *Hypoxidaceae*, ve kterých je zastoupen v množstvích obvykle menších než 0,01 % (obr. č. 2). Pro terapeutické účely je galantamin vyráběn synteticky. Výhodou tohoto alkaloidu je oproti ostatním inhibitorům schopnost alosterické modulace nikotinových receptorů, která vede ke zvýšení hladin ACh. Mezi další účinky galantaminu patří antagonizace dechového útlumu navozeného opioidy, antikurarový efekt a antagonizace centrálního anticholinergního syndromu způsobeného skopolaminem. Galantamin je v současnosti používán jako standard inhiční aktivity AChE pro srovnání účinnosti ostatních léčiv. [21; 22]

Donepezil (DONEPEZIL ACTAVIS©, ARICEPT©, PROMEMORE©, YASNAL) je piperidinový derivát schopný reverzibilní nekompetitivní blokády AChE, účinek na butyrylcholinesterázu je poměrně slabý (obr. č. 2). Jedná se o relativně dobře snášené léčivo s nízkou frekvencí výskytu nežádoucích účinků, které lze využít i k terapii demence s Lewyho tělísky. [23]

Rivastigmin (RIVASTIGMIN ACTAVIS©, NIMVASTID©, EXELON©, PROMETAX©) je karbamátový derivát odvozený od fysostigminu (na rozdíl od jiných analogů proniká hematoencefalickou bariérou díky terciární aminoskupině), jehož mechanismem účinku je pseudoireverzibilní inhibice cholinesteráz především v oblastech hipokampu a neokortexu (obr. č. 2). Rivastigmin je léčivo s nízkým interakčním potenciálem používané také k terapii demence s Lewyho tělísky a demence u Parkinsonovy choroby. Mezi významné nežádoucí účinky rivastigminu patří gastrointestinální poruchy. [20; 24]

Do skupiny inhibitorů cholinesteráz patří také mnoho přírodních látek, jež jsou předmětem zájmu současných studií. Alkaloid sanguinin byl objeven v rostlinách *Eucharis grandiflora* a *Galanthus nivalis* (*Amarillidaceae*), ve kterých je obsažen pouze ve stopových množstvích. Chemicky se jedná o derivát galantaminu, který vykazuje mnohonásobně vyšší inhiční aktivitu k AChE než galantamin ($IC_{50,AChE} = 0,10 \mu M$),

ovšem bylo dokázáno, že je oproti galantaminu velmi rychle metabolizován, proto nebyl zaveden do klinické praxe. Další skupinu nových potenciálních léčiv představují deriváty lykorinu (1-acetyllykorin, hamayn) nacházející se v druzích *Ammocharis conarica*, *Crinum*, *Galanthus* a *Brunsvigia*, které rovněž vykazují AChE inhibiční aktivitu. Rutaekarpin, chinolizidinový alkaloid izolovaný z plodů *Evodia rutaecarpa* (*Rutaceae*), také vykazoval inhibiční aktivitu vůči cholinesterázám, ovšem z důvodu vysoké incidence nežádoucích účinků není v terapii používán a je spíše předlohou pro přípravu semisyntetických derivátů. [22; 25]



Obr. č. 2 – **A** galantamin, **B** rivastigmin, **C** donepezil

Nadějnou látkou se jeví huperzin A, chinolizidinový alkaloid, který je obsažen v rostlinách čeledi *Lycopodiaceae* (*Huperzia serrata*, *H. herteriana*, *H. ovatifolia*) a rodu *Selaginella*. Oproti výše zmíněným léčivům se huperzin A vyznačuje nižším výskytem periferních účinků a rychlejším prostupem hematoencefalickou bariérou. Kromě inhibiční aktivity vůči AChE má další popsání účinky – antioxidační, antagonismus NMDA receptorů, regenerace a růst mozkových buněk. Tato molekula a deriváty od ní odvozené jsou v současné době předmětem mnoha klinických studií. [22; 26]

Molekula	IC ₅₀ ,AChE	IC ₅₀ ,BuChE
galantamin	0,3-0,7 μM	7-20 μM
donepezil	2-10 nM	2-10 μM
rivastigmin	0,7-1,5 μM	0,3-1,0 μM
huperzin A	0,079 μM	74,43 μM

Tabulka č. 1 – IC₅₀ vybraných inhibitorů [27; 28; 29]

3.1.4.2 Antagonisté NMDA receptorů

Jediným zástupcem této skupin používaným k terapii AD je **memantin** (MEMANTIN APOTEX©, COGNOMEN©, NEMDATINE©, POLMATINE©, a další). Memantin patří do skupiny aminoadamantanů, vyznačující se tricyklickou strukturou, do které patří také amantadin – látka používaná jako antivirotikum a u Parkinsonovy nemoci. Memantin inhibicí NMDA receptorů přispívá ke správné funkci glutamátergního systému a zlepšuje tak kognitivní schopnosti pacientů a snižuje závislost na péči. [14]

3.2 *Desmodium adscendens*

3.2.1 Popis

Desmodium adscendens (Sw.) D.C. var. *adscendens* (Stužkovec vystoupavý, Manayupa) je vytrvalá keřovitá rostlina čeledi *Fabaceae*, vyznačující se vystoupavým plazivým stonkem ovíjejícím se kolem kmenů, který často dřevnatí a je pokryt trichomy (obr. č. 3). Rostlina dosahuje vzrůstu 50—100 cm. Listy jsou oválné celokrajné se zpeřenou žilnatinou. Květy mají světle fialovou až růžovou barvu, plodem je lusk. [30; 31; 32] Rostlina je hojně rozšířena v Peru, v Jižní Americe, Austrálii a na západním pobřeží Afriky. [33] Rod *Desmodium* čítá zhruba 350 druhů rozšířených především v tropických a subtropických oblastech, právě 28 v Číně, kde se staly rozšířeným prostředkem tradiční čínské medicíny (TČM). [34]



Obr. č. 3 – *Desmodium adscendens* [35]

3.2.2 Účinky

Rody druhu *Desmodium* (*Desmodium styracifolium*, *D. gyrans*, *D. pilosum*, *D. podocarpum* a další) TČM k léčbě různých onemocnění, jako astma, horečky, malárie, tyfus a další. Číňané používali celou nať, kořeny nebo listy, ve formě nálevů nebo odvarů k vnějšímu i vnitřnímu použití, nebo v nativním stavu (šťáva z listů). [34] *Desmodium adscendens* uplatnění v TČM nenašla, jelikož se v Číně nevyskytuje, na rozdíl od Jižní Ameriky. V tradičním jihoamerickém léčitelství je tato rostlina nazývána „runa mana youpana“, což v překladu z kečuánštiny znamená „její vlastnosti jsou nesčetné“. Již Inkové ji dobře znali, především vyšší privilegované vrstvy, kde použití mělo kultovní až obřadní charakter. Tradiční jihoamerické přírodní léčitelství přisuzuje rostlině účinky na astma, na játra a žlučník (záněty), uvolnění svalových křečí, gastroprotektivní a celkově protizánětlivé účinky. Také je hojně využívána k léčbě nemocí kůže, jako je akné, ekzémy a vyrážky, dále k zástavě krvácení a urychlení hojení ran díky obsahu taninů. [31] Brazilská tradiční medicína využívá rostlinu při léčbě vaginálních zánětů, zánětů vaječníků, bolestí, kapavky a průjmu. V africkém lidovém léčitelství nachází uplatnění v léčbě astmatu a spasmů hladkého svalstva. [33]

In vivo byl prokázán hepatoprotektivní účinek ethanolického extraktu, antioxidační aktivita a schopnost vychytávat volné radikály. [36] Ethanolický extrakt rovněž vyvolává hypotermii a působí analgeticky u myší a inhibuje kontrakce hladkého svalstva. Vodný extrakt u morčat snižuje množství hladiny histaminu v plicích a inhibuje kontrakce střeva vyvolané histaminem. Účinky na lidský organismus nebyly zcela objasněny, ověřen byl analgetický a spasmolytický účinek, dále aktivace kalcium

dependentních K^+ kanálů, inhibice NADPH-dependentní oxygenace kyseliny arachidonové a role v regulaci uvolňování histaminu. [34; 37; 38; 39]

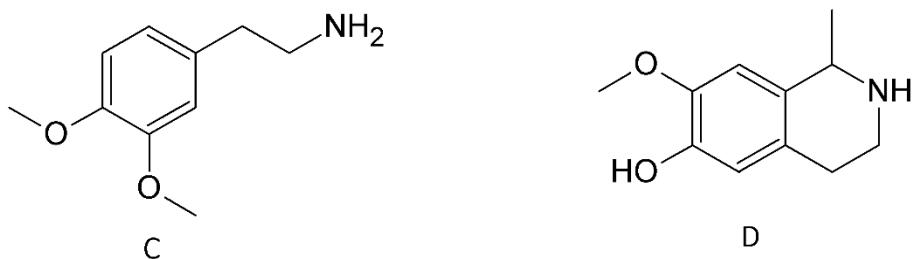
3.2.3 Obsahové látky

Rod *Desmodium* se vyznačuje obsahem flavonoidů, alkaloidů, triterpenických saponinů a aminů. Zatímco flavonoidy byly objeveny především v květech, typickým místem výskytu alkaloidů a saponinů (sojasaponinů) je list a stonek. Kvalitativní charakteristika těchto látek závisí na místě a podmínkách kultivace. Minoritně jsou pak zastoupeny terpenoidy, steroly, fenolické sloučeniny (rutin, katechin, kys. gallová), glykosidy a další. [34; 33; 40]

Skupinu flavonoidů, především pak isoflavonoidů, obsažených v taxonech rodu *Desmodium*, představují následující strukturní typy: flavony, 7,8-prenyllaktony, flavonoly, flavononoly, flavan-3-oly, isoflavony, isoflavonony, pterokarpany a kumarochromony. Jmenovitě pak byly v *D. ascendens* nalezeny vitexin, jeho izomerní forma isovitexin, apigenin, kaempferol, v méně významném množství pak diosmetin a quercetin. Většinou převažuje glykosylovaná forma v mnoha různých podobách před samotně vyskytujícími se aglykony. [34; 39; 40]

Již 40 různých alkaloidů bylo izolováno z druhů rodu *Desmodium*, typickými strukturními typy pak jsou indolový, fenylethylaminový, pyrrolidinový, amidický a alkylaminový. Zástupci alkaloidů obsažených právě v *D. ascendens* jsou hordenin, dimethyltryptamin, dimethoxyfenylethylamin a salsolin (obr. č. 4). [34; 39]





Obr. č. 4 – **A** hordenin, **B** dimethyltryptamin, **C** dimethoxyfenylethylamin, **D** salsolin

3.3 *Codonopsis pilosula*

3.3.1 Popis

Codonopsis pilosula (Franch.) Nannf. (Pazvonek chloupkatý, Dangšen) je vytrvalá 2–3 m dlouhá liána čeledi *Campanulaceae* (obr. č. 5). Rod *Codonopsis* čítá 46 druhů, které se vyskytují především ve Východní, Severovýchodní a Střední Asii, 39 druhů pak v Číně. *Codonopsis pilosula* je mimo dříve zmíněné oblasti rozšířen rovněž v Koreji a Rusku, přirozeně se vyskytuje na okraji lesů a podél vodních toků. Tradičně používanou částí rostliny je mrkvovitý, někdy kuželovitý kořen, tvarem, zbarvením a vůní připomínající kořen ženšenu. Listy jsou chlupaté, střídavé nebo vstřícné, celokrajné s vejčitými nebo eliptickými čepelemi. Listy po rozemnutí charakteristicky voní. Zvonkovité květy jsou pětičlenné, zbarvením od žluté, modré, fialové až k zelené s fialovým žilkováním. Plodem je v době zralosti třemi otvory pukající tobolka obsahující velké množství semen. [41; 42; 43]



Obr. č. 5 – *Codonopsis pilosula* [44]

3.3.2 Účinky

Druhy rodu *Codonopsis* jsou součástí TČM již od dob dynastie Qing, přisuzovány jim byly účinky na slezinu, plíce a očistu krve. Používanou částí rostliny je především kořen, který připomíná vzhledem i účinky (tonikum) kořen ženšenu. Droga *Codonopsis radix* („Dang shen“) je součástí Čínského lékopisu od roku 1963, odvary z této drogy lze využít k léčbě mnoha onemocnění – žaludku, sleziny, průjmu, plic, krve. *Codonopsis radix* je v Číně velmi oblíbeným doplňkem stravy, je mu přisuzována schopnost posilovat srdce, zklidňovat mysl, očišťovat krev, snižovat noční pocení a zmírňovat nachlazení. Dále se kořen využívá k výrobě vín a náplastí – ty jsou používány jako adjuvantní terapie chronické obstrukční choroby (CHOPN), rakoviny plic, tuberkulózy a bronchiektázie (chronické rozšíření bronchů doprovázené chronickým zánětem). Kaše z kořene *C. pilosula* se používá při poruchách žaludku a sleziny, snížené chuti k jídlu, dyspnoe a při poruchách krevetvorby. Další oblíbenou tradiční rostlinou je *C. lanceolata*, používaná v Číně, Japonsku a Korei v obdobných indikacích. [41]

Provedené studie prokázaly účinky extraktu z kořene *C. pilosula* při profylaxi a léčbě peptického vředu, zlepšení paměti a procesu učení, prohlubování spánku, posílení imunity a stimulace aktivity makrofágů. Dále byla popsána inhibice oxidace proteinů, inhibice NO-syntázy, antimikrobiální a protinádorová aktivita (především pak u nádorů vaječníků), příznivé účinky při onemocněních koronárních cév a příznivé ovlivnění diabetu II. typu. [41; 45; 46; 47]

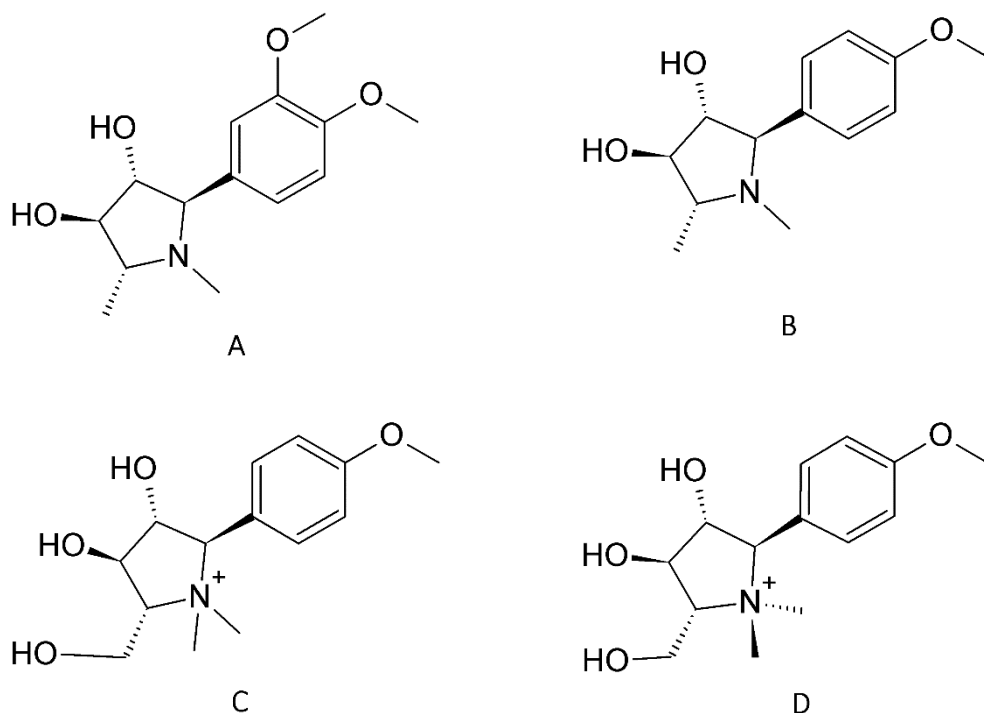
3.3.3 Obsahové látky

Druhy rodu *Codonopsis* se vyznačují přítomností celé řady sloučenin, zahrnující polyacetyleny, polyeny, sacharidy, flavonoidy (hesperidin), lignany, kumariny (angelicin, psoralen), alkaloidy, terpenoidy, steroidy, sacharidy a další (silice, aminokyseliny, prvky – Fe, Zn). [41]

Sacharidy způsobují sladkou chuť kořene, v *C. pilosula* byly objeveny monosacharidy, oligosacharidy i polysacharidy, jmenovitě např. inulin, synanthrin a levulosa. Sacharidy jsou nedílnou složkou glykosidů, v glykosidické formě se vyskytuje většina z výše uvedených látek.

Steroidy obsažené v *C. pilosula* představují steroly, sterony a jejich glykosidy. Jmenovitě pak spinasterol, stigmasterol, stigmasteron a další.

Alkaloidy obsažené v této rostlině jsou následujících strukturních typů: pyrrolidinové, indolové a chinolinové. Zástupci této skupiny obsahových látek jsou kodonopsin, kodonopsinin, kodotubulosin A, kodonopyrrolidium B a 5-hydroxy-2-hydroxymethylpiridin (obr. č. 6). [41; 48]



Obr. č. 6 – **A** kodonopsin, **B** kodonopsinin, **C** kodotubulosin A, **D** kodonopyrrolidium B

3.4 *Centella asiatica*

3.4.1 Popis

Centella asiatica (Linn.) Urban (Pupečník asijský, Gotu kola, *Hydrocotyle asiatica*) je vytrvalá bahenní popínavá rostlina čeledi *Apiaceae*, některými autory řazena do čeledi *Hydrocotylaceae* (pupečníkovité), rozšířená v jihovýchodních oblastech Asie a Jižní Africe (obr. č. 7). Přirozeně se vyskytuje v oblastech s vlhkými písčitými půdami, v záplavových oblastech a podél vodních toků. Rod *Centella* čítá 40 popsanych druhů.

Rostlina dorůstá výšky 15 cm, stonek je lysý, příčně pruhovaný, plazivý, rostlina často vytváří koberce. Listy jsou střídavé, okrouhlé s dlouhým řapíkem, dlanitou žilnatinou a vroubkovanou čepelí. Květy jsou pětičetné, bílé nebo růžové barvy, shlukující se v okoličnatém květenství. Plodem je hnědošedá okrouhlá žebrovaná dvojnažka rozpadající se na 2 semena. [38; 49; 50]



Obr. č. 7 – *Centella asiatica* [51]

3.4.2 Účinky

C. Asiatica je léčivá rostlina vyznačující se mnohými účinky na lidský organismus. Již několik století je hojně využívána různými tradičními léčitelstvími směry v různých oblastech světa k léčbě různých onemocnění. V Indii (Ajurvédské léčitelství, Unani) se používá k léčbě astmatu, nemocí kůže, onemocnění žaludku, ledvin, jater, krve a dalších ve formě nálevů z listů. Postavení v TČM zaujímá při léčbě průjmu a dysenterii, při zvracení, zánětu mandlí, krvácení z nosu, zlomeninách a tuberkulóze. V Nepálu nachází uplatnění při léčbě revmatismu, ztrátách paměti nebo lepře. *C. asiatica* je dále součástí tradiční medicíny v Malajsii, Bangladéši, Brazílii nebo na Fidži. [50]

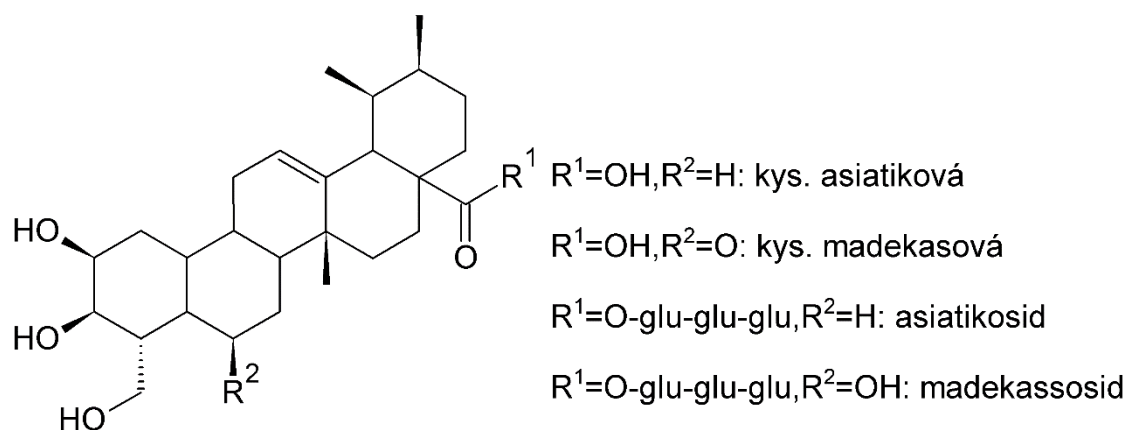
Farmakologické účinky *C. asiatica* zahrnují protinádorovou aktivitu – především pak při rakovině plic, antibakteriální a antifungální aktivitu, protizánětlivou aktivitu, neuroprotektivní aktivitu a hepatoprotektivní aktivitu. Dále působí jako antioxidant a byla prokázána i role při diabetu. Mimo jiné byl prokázán i sedativní a anxiolytický účinek, antidepresivní účinek, gastroprotektivní a kardioprotektivní účinek. Rostlina je díky své schopnosti zlepšovat paměť a mentální deficit často využívána jako podpůrná terapie při AD. [52; 53]

3.4.3 Obsahové látky

Obsahové látky druhu *Centella asiatica* jsou triterpenoidy (saponiny), silice, mastné kyseliny, alkaloidy, glykosidy, fytosteroly (stigmasterol, sitosterol, kampesterol), flavonoidy (deriváty kvercetinu a kempferolu) a další (vitamin B, AMK, tanin).

Saponiny (triterpenické) jsou nejvýznamnější sekundární metabolity obsažené v této rostlině. Tato skupina látek zahrnuje asiaticosidy (trisacharidová jednotka + aglykon kys. asiaticové, kys. madasiaticové nebo madekassosid), centellosid, thankunisid, brahmosid a brahminosid. Z rostliny bylo rovněž izolováno nepočtené množství pentacyklických triterpenických kyselin – v samostatné formě nebo jako aglykony saponinů (kys. asiaticová, kys. brahmová, kys. betulinová, thankuniová a další). Saponiny jsou zodpovědné za hojení ran, účinky na hladké svalstvo, kardiovaskulární systém a CNS. Struktura derivátů kyseliny asiaticové je znázorněna na obrázku č. 8.

Jediným alkaloidem izolovaným z listů této rostliny je hydrokotilin (C₂₂H₃₃NO₈).
[50; 53; 54]



Obr. č. 8 – Deriváty kyselina asiaticové

3.5 *Bacopa monnieri*

3.5.1 Popis

Bacopa monnieri (L.) Pennell. (Bakopa drobnolistá, Brahmi) je vytrvalá plazivá sukulentní rostlina čeledi *Scrophulariaceae*, některými autory je rod *Bacopa* řazen též do čeledi *Plantaginaceae* (obr. č. 9). Tato bylina se přirozeně vyskytuje v Indii a tropických a subtropických oblastech Afriky, Austrálie a Ameriky v místech výskytu vlhké půdy, mělkých vodách a bažinách. Rostlina dosahuje výšky 10–30 cm, listy jsou jednoduché, celokrajné, eliptické až vejčité, dužnaté, stonek je lysý. Pětičetné (někdy čtyřčetné) květy mají narůžovělou až bledě modrou barvu, plodem je tobolka s mnoha semeny. Rod *Bacopa* zahrnuje více než 100 druhů rozšířených v Indii, Nepálu, Číně, na Srí Lance, ale také na Floridě a v některých jižních státech USA. [55; 56]



Obr. č. 9 – *Bacopa monnieri* [57]

3.5.2 Účinky

B. monnieri je tradiční léčivou rostlinou ajurvédského lékařství, které ji používá již 3000 let. Rostlina poskytuje drogu Brahmi, která je tradičně používána jako nootropikum. Dále se využívá k léčbě astmatu, epilepsie, úzkosti, anorexie, anémie, kašle, artritidy a nervového vyčerpání. Tradiční použití také zahrnuje léčbu průjmů, zácpy a žaludečních problémů. Rostlině jsou rovněž přisuzovány protizánětlivé, analgetické a anxiolytické účinky. [54; 58; 59]

Hlavní farmakologické účinky *B. monnieri* byly popsány mnoha studii. Jedná se o účinky na centrální nervový systém: zlepšení paměti, inteligence a poznávacích

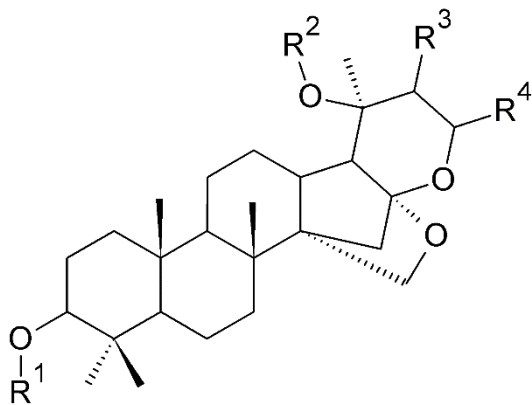
procesů, anxiolytický účinek, antidepresivní, antikonvulzivní a sedativní účinky. Rostlina hraje rovněž výraznou roli při neurodegenerativních onemocněních – byl zjištěn příznivý účinek při AD a Parkinsonově chorobě na kognitivní a behaviorální funkce, sumární extrakt z *B. monnieri* dokonce snižuje množství β -amyloidu v mozku při AD. Tyto účinky na CNS jsou přisuzovány obsaženým saponinům a alkaloidům, ale také antioxidační aktivitě (snížení oxidačního stresu neuronů) a inhibici AChE extraktu. [60; 61] Dále byly popsány protizánětlivé a analgetické účinky způsobené inhibicí prostaglandinů, účinky při léčbě a profylaxi peptických vředů, zastavení průjmu, antimikrobiální aktivita metanolového a etherového extraktu, role při regulaci uvolňování histaminu a relaxaci hladkého svalstva, cytotoxicita, reverzibilní potlačení spermatogeneze a další. [60; 62]

3.5.3 Obsahové látky

Obsahovými látkami *B. monnieri* jsou saponiny, alkaloidy, sacharidy, fenolické sloučeniny, flavonoidy, fytosteroly (stigmastanol, β -sitosterol) a další (kys. betulinová, terpenoidy, steroidy, taniny, draselné soli, proteiny).

Nejvýznamnější skupinu sekundárních metabolitů této rostliny představují saponiny (bakosidy) – bakosid A a jeho optický izomer bakosid B (kyselou hydrolýzou těchto sloučenin vzniká směs aglykonů (bakogeniny) a pravých sapogeninů - jujubogenin a pseudojujubogenin). Mezi další izolované saponiny patří bakopasaponin A, B, C, D a G, bakopasid I–V a hersaponin. Dále byla izolována skupina kukurbitacinů – bakobitaciny, cytotoxický kukurbitacin E a skupina fenolických glykosidů – monnierasid I a III, plantiosid B. Obsah saponinů v *B. monnieri* se pohybuje v rozmezí 5–22 %. Obecná struktura bakopasidů je znázorněna na obr. č. 11.

Skupinu alkaloidů reprezentují brahmin, první izolovaný alkaloid z této rostliny, herpestin a nikotin, které byly izolovány později. [60; 63; 64]



Obr. č. 11 – Obecná struktura bakopasidů

3.6 *Epimedium sagittatum*

3.6.1 Popis

Epimedium sagittatum Sieb. et Zucc. (Škornice šípolistá) je vytrvalá rostlina čeledi *Berberidaceae*. Rod *Epimedium* čítá 52 druhů přirozeně se vyskytujících v blízkosti vodních toků a horských oblastech Číny, některé druhy také v Japonsku, Korei, Indii, Severní Africe a Evropě (obr. č. 12). *E. sagittatum* dorůstá výšky 30–50 cm, stonek je lysý, listy trojčetné, vejčité s protáhlou špičkou, s kožovitým povrchem a dlouhým řapíkem, podzemní část rostliny tvoří krátký oddenek s četnými adventivními kořeny. Květy jsou růžové nebo žluté, květenství jsou řídká i bohatá, plodem je tobolka s mnoha diploidními semeny. Rostlina preferuje kyslejší půdy bohaté na živiny a vláhu, byla prokázána souvislost mezi podmínkami kultivace a obsahem sekundárních metabolitů. Droga *Epimedii herba* je součástí Čínského lékopisu, poskytuje ji 5 rodů druhu *Epimedium* včetně *E. sagittatum*. [65; 66; 67]



Obr. č. 12 – *Epimedium sagittatum* [68]

3.6.2 Účinky

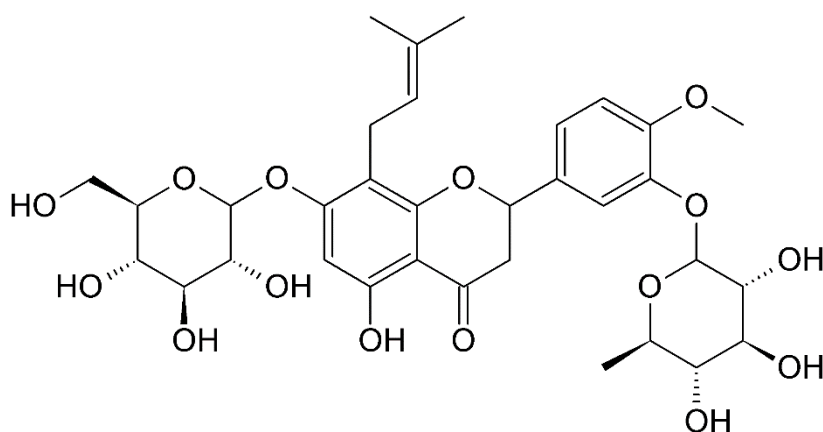
Epimedium je tradiční léčivá rostlina asijského léčitelství, jsou jí přisuzovány vlastnosti afrodisiaka. TČM používá nadzemní část *E. sagittatum* k léčbě impotence, erektilní dysfunkce, osteoporózy, revmatoidní artritidy a hypertenze, oddenek pak při revmatismu. V Číně je rovněž rostlina oblíbeným doplňkovým prostředkem posilující zdraví a tělesnou kondici ve formě odvarů, léčivých vín, kapslí nebo tablet. Také v dalších zemích jsou druhy rodu *Epimedium* hojně využívány v obdobných indikacích – např. v Korei (*E. koreanum*) nebo v Japonsku. [65]

V klinické praxi se *Epimedium* využívá k léčbě osteoporózy, mírnění příznaků klimakteria a koronárního syndromu. Byl prokázán účinek při léčbě erektilní dysfunkce inhibiční aktivitou vůči fosfodiesteráze-5 (PDE-5), také zvyšuje libido a produkci testosteronu a dalších pohlavních hormonů. Také byl dokázán účinek na kostní metabolismus – podpora činnosti osteoblastů a inhibice činnosti osteoklastů, čehož lze využít při terapii osteoporózy. Mezi další klinicky ověřené účinky rostliny patří atineoplastická, antioxidační a protizánětlivá aktivita, dále antihypertenzní, antivirový a antimikrobiální účinek. [65; 69]

3.6.3 Obsahové látky

Již více než 260 molekul bylo objeveno v druzích rodu *Epimedium*, jedná se o flavonoidy, lignany (ikarisidy E₁–E₇), jonony (ikarisidy B₁–B₁₀), fenolické glykosidy, seskviterpeny a další (steroly, fenolické kyseliny, polysacharidy, vitamin C).

Flavonoidy jsou nejvýznamnější skupinou sekundárních metabolitů této rostliny zodpovědné za většinu biologických účinků. Skupina zahrnuje tyto strukturní typy: flavonoly, flavonony, chalkony, flavanony, prenylflavonony, benzopyranony, resinoly a jejich glykosidy (cukernou složkou je glukóza, rhamnóza, xylóza a jejich deriváty). Nejvýznamnějšími zástupci jsou icariin (obr. č. 13), epimedin A, B, C, bauhousid, sagittasin A–C, breviflavon B, kaempferol. [65; 70]



Obr. č. 13 –Icariin

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Všeobecné postupy

4.1.1 Destilace a odpařování

Všechna použitá rozpouštědla byla předem predestilována. Destilační předek (cca 5%) byl zachycen – většinou s vodným azeotropem a poté byl destilován zbytek rozpouštědla. Všechna rozpouštědla byla uchovávána ve skleněných hnědých lahvích.

Rozpouštědla byla z extraktů odpařována pomocí vakuové rotační odparky Heidolph Laborta 4010 při teplotě cca 50 °C na vodní lázni za sníženého tlaku.

4.2 Izolace a GC/MS analýza

4.2.1 Materiál a vybavení

4.2.1.1 Rozpouštědla

Aceton (Penta)

Cyklohexan (Penta)

Diethylamin (Penta)

Ethanol 95% (Penta)

Ether (Penta)

Ethyl-acetát (Penta)

n-Hexan 99% (Penta)

Toluen (Penta)

4.2.1.2 Chemikálie

Amoniak (Penta)

Dusičnan bismutitý (Lach-ner)

Chlorid rtuťnatý (Lachema)

Jodid draselný (Lachema)

Kyselina chlorovodíková 35% (Penta)

Kyselina vinná (Penta)

Síran sodný (Lach-ner)

Uhličitan sodný (Lachema)

4.2.1.3 Detekční činidla

D1: Činidlo Dragendorffovo [Muniuer R.: Bull. Soc. Chim. Biol. 35, 1225 (1953)]

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

Roztok B: 16g jodidu draselného se rozpustí v 40 ml vody.

Zásobní roztok: roztoky A a B se smísí v objemovém poměru 1:1. Vzniklý roztok je uchováván v chladničce při 4 °C po dobu několika měsíců.

D2: Mayerovo činidlo [Československý lékopis, vyd. 3. díl I., Avicenum, Praha 1971]

5 g jodidu draselného se rozpustí v 30 ml vody a do vzniklého roztoku se přidá 1,35 g chloridu rtuťnatého. Objem činidla se doplní do 100 ml. Roztok musí být čirý, nažloutlé, nejvýše světle žluté barvy. Roztok je uchováván v chladničce při 4 °C po dobu několika měsíců.

4.2.1.4 Vyvíjecí soustavy pro tenkovrstvou chromatografii

S1: Toluén:Et₂NH 90:10

S2: Cyklohexan:Aceton:NH₃ 50:50:2

4.2.1.5 Chromatografické adsorbenty

Kieselgel 60 F254 (Merck)

4.2.1.6 Přístroje

Analytické váhy (Sartorius)

Elektrický vaříč (Eta)

Vakuová odparka Heidolph Laborta 4010

Plynový chromatograf Agilent 7890A GC 597 inert (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)

Akvaristický motorek

4.2.2 Biologický materiál

Pro přípravu extraktů byly použity komerčně dostupné drogy dodané firmou BylinyBylin.cz (Lednice), jejichž přehled je uveden v tabulce č. 2.

Komerční název	Rostlina	Výrobce	Země původu
MANAYUPA 50g	<i>Desmodium adscendens</i>	Salvia paradise	Peru
DANG SHEN kořen 100 g	<i>Codonopsis pilosula</i>	Pátý Element	neuveďeno
GOTU-KOLA Pupečník asijský 250 g	<i>Centella asiatica</i>	BioRenesance.cz	neuveďeno
BACOPA monnieri (Brahmi) prášek 100g	<i>Bacopa Monnieri</i>	Hesh	Indie
Škornice šípolistá, YIN YANG HUO – Bylina prostopášného kozla 100g	<i>Epimedium sagittatum</i>	Pátý Element	Čína

Tabulka č. 2 – Přehled použitého biologického materiálu

4.2.3 Příprava extraktů pro screening

4.2.3.1 Příprava sumárního extraktu

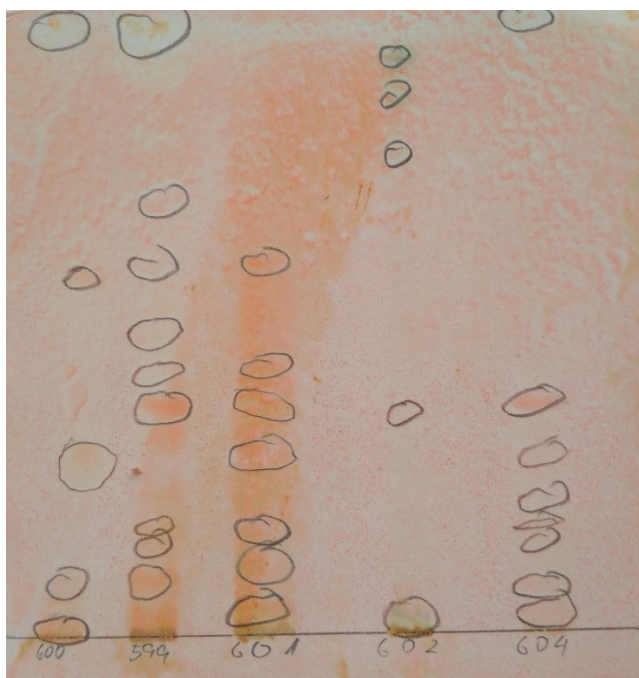
Jednotlivé drogy se rozemlely na velikost částic cca 1-2 mm a potřebné množství bylo vsypáno do destilační baňky a převrstveno EtOH 95% tak, aby hladina přesahovala rostlinný materiál přibližně o 2 cm. Po vložení varných kamínků byla směs vařena 30 min. se zpětným chladičem na vodní lázni. Po vychladnutí se směs zfiltrovala přes vliselin a postup byl opakován ještě 2x. Z výsledného filtrátu se na rotační odparce odpařilo rozpouštědlo. Vzorky těchto sumárních extraktů jsou uloženy na Katedře farmakognozie pod označeními uvedenými v tabulce č. 3.

Označení	Rostlina	Čeleď
AL-599	<i>Desmodium adscendens</i>	<i>Fabaceae</i>
AL-600	<i>Codonopsis pilosula</i>	<i>Campanulaceae</i>
AL-601	<i>Centella asiatica</i>	<i>Apiaceae</i>
AL-602	<i>Bacopa Monnieri</i>	<i>Scrophulariaceae</i>
AL-604	<i>Epimedium sagittatum</i>	<i>Berberidaceae</i>

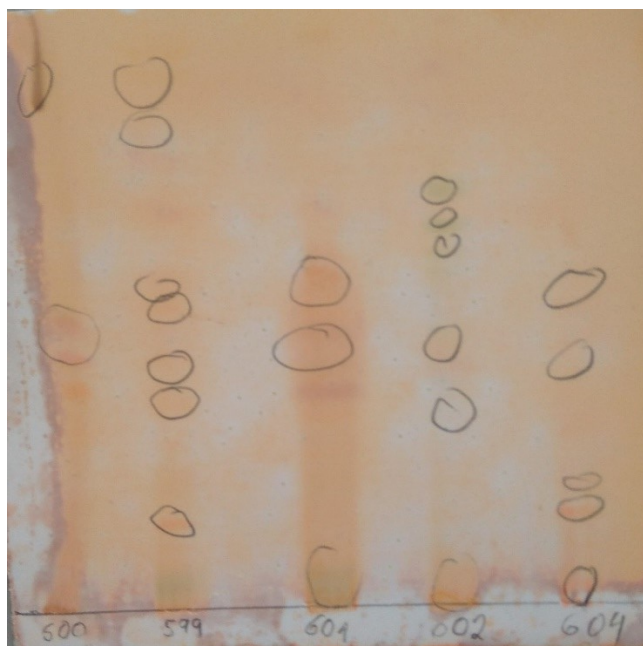
Tabulka č. 3 – Přehled označení zpracovávaných drog

4.2.3.2 Kontrolní tenkovrstvá chromatografie

Přibližně 1 mg extraktu se rozpustil v mikrozkušavce nejprve v 1-2 kapkách EtOH, následně byly přidány 1-2 kapky chloroformu. Po usazení nečistot se čirý roztok nanesl v proužku na chromatografickou desku a nechal se vyvíjet v použitých soustavách rozpouštědel Toluén:Et₂NH (90:10) a Cyklohexan:Aceton:NH₃ (50:50:2). Po vysušení vyvinutých desek se skvrny detekovaly UV zářením (254 nm, 366 nm) a Dragendorfovým činidlem (obr. č. 14 a 15).



Obr. č. 14 – Kontrolní tenkovrstvá chromatografie extraktů
Kieselgel 60 F254 – Merck, Toluén:Et₂NH 90:10, komora nasycená, detekce UV
+ Dragendorfovo činidlo



Obr. č. 15 – Kontrolní tenkovrstvá chromatografie extraktů
*Kieselgel 60 F254 – Merck, Cyklohexan:Aceton:NH₃ 50:50:2, komora nasycená,
 detekce UV + Dragendorfovo činidlo*

4.2.3.3 Příprava alkaloidního extraktu

Sumární extrakt se rozpustil v potřebném množství 2% HCl (přibližně 100 ml) a vzniklý roztok se přefiltroval přes vrstvu křemeliny ve filtračním tubusu. Čirý roztok se po zředění vodou vytřepával cca 1/3 svého objemu n-Hexanem 99 %. Toto vytřepávání se provedlo celkem třikrát z důvodu zbavení nežádoucích nečistot (silice, tuky). Spodní kyselá vodná vrstva se převedla do dělicí nálevky, do které byl přidán EtOAc a následně 10% Na₂CO₃ v množství potřebném k alkalizaci roztoku na pH 10 (univerzální pH papírek). Alkalický roztok se 3× vytřepal 1/3 svého objemu predestilovaným EtOAc. Spojené EtOAc výtřepky se vysušily přibližně 5 g Na₂SO₄, přefiltrovaly přes filtrační papír a následně se všechny EtOAc odpařil na rotační odparce. Ve zbylé vodné fázi byla po okyselení na pH 3 ověřena nepřítomnost alkaloidů reakcí s Mayerovým činidlem. Alkaloidní extrakt byl po zvážení a rozpuštění v malém množství EtOAc rozplněn do tří ampulek tak, aby v prvních dvou ampulkách bylo 10-12 mg a ve třetí zbytek výtřepku. Rozpouštědlo bylo z ampulek odpařeno na jehle v proudu vzduchu pomocí akvaristického motorku. Ampulky se sušily v exsikátoru nad perlami silikagelu po dobu 24 hod. a byla zjištěna hmotnost extraktu. Přehled hmotností získaných extraktů je uveden v tabulce č. 4.

Označení	Rostlina	Hmotnost drogy	Hmotnost sumárního extraktu	Hmotnost alkaloidního extraktu	Výtěžnost
AL-599	<i>Desmodium adscendens</i>	50 g	10,4 g	0,0469 g	0,45 %
AL-600	<i>Codonopsis pilosula</i>	200 g	13,69 g	0,0969 g	1,40 %
AL-601	<i>Centella asiatica</i>	50 g	12,4 g	0,0724 g	0,58 %
AL-602	<i>Bacopa monnieri</i>	200 g	25,45 g	0,1128 g	0,44 %
AL-604	<i>Epimedium sagittatum</i>	200 g	26,24 g	0,2352 g	0,90 %

Tabulka č. 4 – přehled hmotností získaných sumárních a alkaloidních extraktů

4.2.4 GC/MS analýza

Analýza alkaloidních extraktů vybraných druh rostlin byla provedena pomocí plynového chromatografu Agilent 7890A GC 597 inert pracující s hmotnostním detektorem při elektronové ionizaci 70 eV (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), kolona HP-5 MS (30m × 0,25 mm × 0,25 μm; Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Byl použit následující teplotní program: 100 °C – 180 °C (15 °C/min), 180 °C (1 min), 180 – 300 °C (5 °C/min), 300 °C (15 min). Nosným plynem bylo helium o průtokové rychlosti 0,8 ml/min. Nástřik vzorku byl proveden při teplotě 280 °C. Byl nastříknut 1 μl methanolického roztoku alkaloidního extraktu (koncentrace 1 mg/μl) při splitu 1:10.

4.3 Měření inhibiční aktivity extraktů vůči HuAChE a HuBuChE

4.3.1 Chemikálie a materiál

4.3.1.1 Chemikálie

Acetylthiocholin jodid 10 mM (Sigma-Aldrich)

Butyrylthiocholin jodid 10 mM (Sigma-Aldrich)

Dimethylsulfoxid p.a. (DMSO) (Sigma-Aldrich)

5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina ≥ 98 % (DNTB) (Sigma-Aldrich)

Galanthamin hydrobromid 95 % (Changsha Organic Herb Inc., China)

Huperzin A 95 % (TAZHONGHUI – Tai'an Zhonghui Plant Biochemical Co., Ltd., China)

4.3.1.2 Pufry

5mM fosfátový pufr (pH 7,4)

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

100mM fosfátový pufr (pH 7,4)

4.3.1.3 Materiál

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

4.3.2 Příklad použitého ke stanovení cholinesterázové inhibiční aktivity

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

4.3.3 Podmínky měření

Teplota 37 °C

Prostředí fosfátového pufru (pH 7,4)

Vlnová délka spektrofotometru 436 nm (AChE) a 412 nm (BuChE)

Mikrotitrační destičky

4.3.4 Příprava hemolyzátu

Erytrocyty byly získány z čerstvé lidské krve od zdravých dobrovolníků, do které byl přidán citrát sodný jako protisrážlivé činidlo (18 ml krve + 2 ml 3,4% roztoku citrátu sodného). Následně byla krev rozdělena do zkumavek po 5 ml a byla provedena centrifugace rychlostí 4000 ot./min. po dobu 10 minut pomocí centrifugy Boeco U-32R s rotorem Hettich 1611. Po centrifugaci byla oddělena plazma pro stanovení inhibiční aktivity vůči BuChE, která byla uchovávána ve zkumavkách při teplotě 4 °C, maximálně 6 hodin do dalšího zpracování. Zbytek plazmy byl odsán pomocí bezpopelného filtračního papíru a byl změřen objem erytrocytární masy. K erytrocytům byl přidán 5mM fosfátový pufr (pH 7,4) obsahující 150 mM chloridu sodného a erytrocyty jím byly

3× promyty pomocí centrifugy (12 000 ot./min.). Promyté erythrocyty byly poté smíchány s 5mM fosfátovým pufrém (pH 7,4) v poměru 1:9 (pufr:erythrocyty) a nechaly se spontánně hemolyzovat. Po ukončení hemolýzy se okamžitě změřila aktivita hemolyzátu, případně byla upravena jeho absorbance na hodnotu 0,08–0,15 pomocí 5mM fosfátového pufru, a naředěný hemolyzát byl uchováván při teplotě -22 °C. Cholinesterázová aktivita plazmy byla stanovena stejným způsobem (hodnota absorbance v rozmezí 0,15–0,20), získaná plazma byla uchovávaná stejným způsobem jako hemolyzát.

4.3.5 Stanovení cholinesterázové inhibiční aktivity (hodnoty IC₅₀)

Pro stanovení hodnoty IC₅₀ byla využita Ellmanova spektrofotometrická metoda s použitím DTNB. Jako substráty zde slouží estery thiocholinu, které jsou cholinesterázami štěpeny na thiocholin a příslušnou kyselinu.

Byla stanovena koncentrace thiolových skupin thiocholinu, které se váží na DNTB za vzniku žlutě zbarveného produktu, který se stanovuje spektrofotometricky při vlnových délkách 436 nm (HuAChE) a 412 nm (HuBuChE). Byl sledován nárůst absorbance za 1 minutu. Hodnoty IC₅₀ byly vypočítány z naměřených hodnot poklesu aktivity AChE a BuChE nelineární regresí v programu GraphPad. Prism. Výsledky byly porovnány s hodnotami IC₅₀ referenčních inhibitorů AChE – galantaminem (IC_{50 HuAChE} = 1,71 ± 0,07 μM, IC_{50 HuBuChE} = 42,30 ± 1,30 μM) a huperzinem A (IC_{50 HuAChE} = 0,033 ± 0,001 μM, IC_{50 HuBuChE} > 1000 μM). Inhibice (I) v % byla vypočtena z následujícího vzorce:

$$I = 100 - (\Delta A_{BL} / \Delta A_{SA}) \times 100$$

kde ΔA_{BL} je nárůst absorbance slepého vzorku za 1 minutu a ΔA_{SA} je nárůst absorbance měřeného vzorku.

4.3.5.1 Stanovení aktivity enzymů

Do jamek mikrotitračních destiček se napipetovalo 8,3 μl plazmy nebo hemolyzátu, přidalo se 283 μl 5 mM DTNB, 8,3 μl DMSO (6 jamek vedle sebe). Po promíchání na mikrotřepačce po dobu jedné minuty se směs inkubovala v komoře přístroje Reader Synergy™ HT Multi-Detection Microplate Reader po dobu 5 minut při teplotě 37 °C. Následně se přidalo 33,3 μl roztoku substrátu (10 mM

acetylcholinthiojodidu nebo 10 mM butyrylthiocholinjodidu) a po 2 minutách se zjistila absorbance při příslušné vlnové délce. Výše popsaným způsobem se vypočetl rozdíl a stanovil průměr se směrodatnou odchylkou.

4.3.5.2 Stanovení aktivity extraktů

Při měření extraktů se postupovalo stejně, ředění extraktů bylo 20, 2, 0,2, 0,02 a 0,002 mg/ml v DMSO.

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 GC/MS analýza extraktů

Připravené extrakty byly podrobeny GC/MS analýze za účelem identifikace obsahových látek, ovšem výsledky této analýzy nepřinesly žádná interpretovatelná zjištění, přítomné alkaloidy se buďto nezplyňují, nebo kontrolní TLC byla falešně pozitivní, tudíž testované drogy alkaloidy neobsahovaly. To může být způsobeno kvalitou rostlinného materiálu nebo podmínkami a místem kultivace matečných rostlin, případně necitlivou extrakční metodou.

Extrakt z *Bacopa monnieri* nebyl podroben analýze, jelikož kontrolní TLC neprokázala přítomnost alkaloidů v extraktu. Dle literární rešerše byly z *Bacopa monnieri* izolovány 3 alkaloidy – brahmin, nikotin a herpestin, nicméně struktura brahminu a herpestinu nebyla identifikována, tudíž by se dalo uvažovat o nepřítomnosti alkaloidů v této rostlině. Nepřítomnost alkaloidů v testované droze mohla být také způsobena kvalitou drogy, podmínkami a místem kultivace matečné rostliny.

5.2 Inhibiční aktivity izolovaných alkaloidních extraktů vůči HuAChE a HuBuChE

Získané alkaloidní extrakty byly testované na inhibiční aktivitu vůči erytrocytární HuAChE a sérové HuBuChE. Získané výsledky jsou zaznamenány v tabulce č. 5, inhibiční aktivity standardů v tabulce č 6.

Označení	Rostlina	IC ₅₀ HuAChE	IC ₅₀ HuBuChE
AL-599	<i>Desmodium adscendens</i>	> 1000 µg/ml	211,30 ± 18,82 µg/ml
AL-600	<i>Codonopsis pilosula</i>	> 1000 µg/ml	157,05 ± 15,0 µg/ml
AL-601	<i>Centella asiatica</i>	> 1000 µg/ml	316,7 ± 35,48 µg/ml
AL-602	<i>Bacopa monnieri</i>	nebylo stanoveno	nebylo stanoveno
AL-604	<i>Epimedium sagittatum</i>	323,7 ± 18,3 µg/ml	808,13 ± 77,83 µg/ml

Tabulka č. 5 – Inhibiční aktivita získaných alkaloidních extraktů

Standard	IC ₅₀ HuAChE	IC ₅₀ HuBuChE
galanthamin	1,71 ± 0,07 μM	42,30 ± 1,30 μM
huperzin A	0,033 ± 0,001 μM	> 1000 μM.

Tabulka č. 6 – Inhibiční aktivita standardů

Naměřené hodnoty IC₅₀ jednotlivých extraktů vykazují v porovnání se standardy téměř nulovou inhibiční aktivitu vůči HuAChE, velmi slabou aktivitu vůči HuBuChE. Alkaloidní extrakt z rostliny *Desmodium adscendens* vykazoval téměř nulovou inhibiční aktivitu vůči HuAChE, aktivita vůči HuBuChE byla mírná, proto se tato rostlina nejeví jako potenciální při terapii AD. Za zmínku stojí aktivita příbuzného druhu *Desmodium gangeticum*, u které byl prokázán inhibiční účinek extraktu z kořene a listů vůči AChE u myši, sumární methanolický extrakt v koncentraci 250 μg/ml inhiboval AChE z 40,89 %, látky odpovědné za tento účinek identifikovány nebyly. [71] Z tohoto důvodu byla rostlina *D. ascendens* zařazena do screeningové studie, inhibiční aktivita alkaloidního extraktu ovšem nebyla potvrzena.

Alkaloidní extrakt z *Codonopsis pilosula* vykazoval nulovou aktivitu při inhibici HuAChE, aktivita vůči HuBuChE se rovněž nejeví použitelná v praxi. Příbuzný druh *Codonopsis lanceolata* je nadějnější rostlinou při léčbě demencí, byl prokázán pozitivní účinek při AD spojený s regulací ukládání β-amyloidu, mechanismus tohoto účinku je zatím nejasný. [72]

Alkaloidní extrakt izolovaný z rostliny *Centella asiatica* nevykazoval významnou inhibiční aktivitu, nicméně tato rostlina je tradičně používána při degenerativních onemocněních a inhibiční aktivita ethanolického extraktu vůči AChE byla popsána (IC₅₀ = 0,03 mg/ml). [73] Z naměřených hodnot lze usoudit, že alkaloidy nejsou zodpovědné za popsané inhibiční účinky.

Extrakt z rostliny *Bacopa monnieri* nebyl analyzován, jelikož kontrolní TLC neprokázala přítomnost alkaloidů.

Alkaloidní extrakt získaný z *Epimedium sagittatum* se jeví z hlediska inhibiční aktivity vůči HuAChE z testovaných extraktů jako nejnadějnější, ale aktivita je pouze mírná, proto není předpoklad jejího praktického využití v terapii a nebude podroben ani dalším fytochemickým pracem.

6 ZÁVĚR

V rámci této diplomové práce bylo připraveno pět alkaloidních extraktů z následujících taxonů: *Desmodium adscendens* (Fabaceae), *Codonopsis pilosula* (Campanulaceae), *Centella asiatica* (Apiaceae), *Bacopa monnieri* (Scrophulariaceae) a *Epimedium sagittatum* (Berberidaceae). Tyto extrakty (s výjimkou *Bacopa monnieri*) byly podrobeny GC/MS analýze a spektrofotometrickému stanovení inhibiční aktivity vůči HuAChE a HuBuChE pomocí Ellmanovy metody. Extrakt z *Bacopa monnieri* při kontrolní TLC neprokazoval přítomnost alkaloidů, proto nebyl dále analyzován.

Provedená GC/MS analýza extraktů nevedla k identifikaci struktury alkaloidů, to mohlo být způsobeno tím, že přítomné alkaloidy se nezplyňují, nebo jejich nepřítomností (možnost falešně pozitivní kontrolní TLC).

Změřené inhibiční aktivity připravených alkaloidních extraktů (tabulka č. 5) se nejeví použitelné v praxi. Inhibiční aktivita extraktů vůči HuAChE a BuChE byla oproti referenčním inhibitorům (galanthamin, huperzin A) téměř zanedbatelná, z toho lze vyvodit, že alkaloidy obsažené v analyzovaných extraktech nejsou zodpovědné za již popsané inhibiční účinky některých rostlin, nebo nebyly v připravených extraktech nebo použitých drogách obsaženy vůbec.

7 ABSTRAKT

Šíkola V.: Screeningová studie různých rostlinných taxonů a jejich vliv na lidské enzymatické systémy I. Diplomová práce, Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra farmakognozie, Hradec Králové 2018, 52 s.

Předmětem této diplomové práce byl screening 5 vybraných rostlinných taxonů (*Desmodium adscendens*, *Codonopsis pilosula*, *Centella asiatica*, *Bacopa monnieri*, *Epimedium sagittatum*) za účelem identifikace obsahových látek (alkaloidů) a stanovení inhibiční aktivity extraktů vůči lidské acetylcholinesteráze (HuAChE) a butyrylcholinesteráze (HuBuChE).

Sumární extrakt z rostlin byl připraven extrakcí do ethanolu, přítomnost alkaloidů byla ověřena kontrolní TLC (detekce UV, Dragendorfovo činidlo). Ze sumárních extraktů byly připraveny alkaloidní extrakty vytřepáváním alkalického roztoku sumárních extraktů do ethylacetátu. Jednotlivé extrakty byly podrobeny GC/MS analýze a byla stanovena jejich inhibiční aktivita vůči lidským cholinesterázám pomocí Ellmanovy metody.

Výsledky GC/MS analýzy nepřinesly informace o obsažených alkaloidech – alkaloidy se nezplyňovaly nebo nebyly obsažené vůbec. Výsledky měření inhibiční aktivity jednotlivých extraktů po porovnání se standardy (galantamin, huperzin A) vyloučily možnost používání alkaloidů v praxi, jelikož aktivita jednotlivých extraktů byla mnohonásobně nižší než u standardů. Extrakt z *Bacopa monnieri* analýzám podroben nebyl, protože kontrolní TLC neprokázala přítomnost alkaloidů.

Klíčová slova: alkaloidy, Alzheimerova choroba, *Desmodium adscendens*, *Codonopsis pilosula*, *Centella asiatica*, *Bacopa monnieri*, *Epimedium sagittatum*, acetylcholinesteráza.

8 ABSTRACT

Šikola V.: Screening of various plant taxa and their influence on human enzyme systems
I. Diploma thesis, Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové,
Department of Pharmacognosy, Hradec Králové 2018, 52 pages.

The object of this diploma thesis was the screening of 5 chosen plant taxa (*Desmodium adscendens*, *Codonopsis pilosula*, *Centella asiatica*, *Bacopa monnieri*, *Epimedium sagittatum*) to identify chemical constituents (alkaloids) and to define inhibitory activity against human acetylcholinesterase (HuAChE) and butyrylcholinesterase (HuBuChE).

Summary extract of plants was prepared by extraction to ethanol, the presence of alkaloids was verified by control TLC (UV, Dragendorff's reagent). Alkaloidal extracts were prepared by extraction of an alkaline solution of summary extracts to ethyl acetate. Alkaloidal extracts were subjected to GC/MS analysis and tested for their inhibitory activity on human cholinesterases by Ellman's method.

Results of GS/MS analysis did not provide information on contained alkaloids – the alkaloids did not gasify or were not contented. Conclusions of measuring inhibition activity of extracts in comparison to standards (galantamine, huperzine A) eliminated an usage of alkaloids in a clinical praxis because the activity was many times lower than standards. The extract of *Bacopa monnieri* was not analyzed, because control TLC did not confirm the presence of alkaloids.

Keywords: alkaloids, Alzheimer's disease, *Desmodium adscendens*, *Codonopsis pilosula*, *Centella asiatica*, *Bacopa monnieri*, *Epimedium sagittatum*, acetylcholinesterase.

9 LITERATURA

1. Castleman M.: Velká kniha léčivých rostlin. Columbus, Praha (2004).
2. Suchý V.: Farmakognosie: Část všeobecná. Univerzita Komenského, Bratislava (1994).
3. Spilková J., Martin J., Siatka T., Tůmová L., Kašparová M.: Farmakognosie. Karolinum, Praha (2016).
4. Dalecká M., Havelek R., Královec K., Brůčková L, Cahlíková L.: Alkaloidy rostlin čeledi *amaryllidaceae* jako potenciální léčiva v terapii nádorových onemocnění. Chemické listy 107, 701 (2013).
5. Nevšímalová S., Růžička E., Tichý J.: Neurologie. Galén, Praha (2002).
6. Jiráček R.: Farmakoterapie Alzheimerovy choroby. Klinická farmakologie a farmacie 18, 212 (2004).
7. Čechová L., Bartoš A., Doležil D., Řípková D.: Alzheimerova nemoc a mírná kognitivní porucha: diagnostika a léčba. Neurologie pro praxi 12, 175 (2011).
8. Preiss M., Kučerová H.: Neuropsychologie v neurologii. Grada, Praha (2006). s. 129-130.
9. Jiráček R.: Diagnostika a terapie Alzheimerovy choroby. Neurologie pro praxi 9, 240 (2008).
10. Zvěřová M.: Alzheimerova demence. Grada, Praha (2017).
11. Cibičková L., Palička V.: Alzheimerova choroba, cholesterol a apolipoprotein E - nové souvislosti. Klinická Biochemie a Metabolismus 3, 127 (2005).
12. Raboch J., Pavlovský P.: Psychiatrie. Galén, Praha (2001). s. 622.
13. Brunovský M.: Inhibitory cholinesteráz v léčbě Alzheimerovy nemoci. Neurologie pro praxi 2, 112 (2007).
14. Petrovič M., Sedláček M., Horák M., Vyklický L.: Neurofarmakologická podstata působení memantinu v léčbě Alzheimerovy demence. Klinická farmakologie a farmacie 18, 81 (2014).

15. Vyhnálek M., Laczó J., Nikolai T., Sheardová K., Hort J.: Časná diagnostika Alzheimerovy nemoci ve světle nových diagnostických kritérií. *Neurologie pro praxi* 13, 325 (2012).
16. Holmerová I., Jarolímová E., Nováková H.: Alzheimerova choroba v rodině. Pfizer, Praha (2004). s. 13–17.
17. Jiráček R.: Stará a nová diagnostická kritéria pro Alzheimerovu chorobu v podmínkách ČR. *Neurologie pro praxi* 12, 135 (2011).
18. Ressler P.: Alzheimerova choroba - diagnostika a léčba. *Neurologie pro praxi* 5, 11 (2004).
19. Ressler P.: Alzheimerova choroba - diagnostika a léčba. *Neurologia pre prax* 1, 14 (2004).
20. Vnoučková K., Jiráček R.: Rivastigminum. *Remedia* 6 (2003).
21. Krejčová G., Ševelová L.: Současné poznatky o galantaminu, reverzibilním inhibitoru acetylcholinesterázy. *Vojenské zdravotnické listy* 1, 37 (2003).
22. Martin J., Kršková Z., Dušek J.: Huperzin a jiné přírodní látky v léčbě Alzheimerovy nemoci. *Praktické lékařství* 7, 39 (2011).
23. Jiráček R., Slíva J.: Donepezilum. *Remedia* 6 (2014).
24. Doležal M., Opletalová V., Miletín M., Zimčík P., Kučerová M.: Farmaceutická chemie léčiv působících na centrální nervový systém. Karolinum, Praha (2013). s. 59–66.
25. Lopez S., Bastida J., Viladomat F.: Acetylcholinesterase inhibitory activity of some *Amaryllidaceae* alkaloids and *Narcissus* extracts. *Life Science* 71, 2521 (2002).
26. Drtinová L., Pohanka M.: Možnosti využití huperzinu A v léčbě Alzheimerovy choroby. *Chemické listy* 107, 12 (2013).
27. Blackwell W.: Neuroprotective Effects Phytochemicals in Neurological Disorders. John Wiley and Sons, New Jersey (2017).
28. Brahmachari G.: Discovery and Development of Neuroprotective Agents from Natural Products. Elsevier (2017). s. 192.

29. Tang X. C., Han Y. F.: Pharmacological profile of huperzine A, a novel acetylcholinesterase inhibitor from chinese herb. *CNS Drug Reviews* 3, 281 (1999).
- 30: <http://www.tropical.theferns.info/viewtropical.php?id=Desmodium+adscendens>, staženo 16.1.2018.
31. Arndt T.: Stůžkovec vystoupavý (*Desmodium adscendens*). Dostupné z: <https://www.celostnimediceina.cz/stuzkovec-vystoupavy-desmodium-adscendens.html>, staženo 16.1.2018.
32. <http://www.tipdisease.com/2017/01/manayupa-desmodium-adscendens-overview.html>, staženo 16.1.2018
33. Muanda N. F., Bouayed J., Djilani A., Yao C., Soulimani R., Dicko A.: Chemical Composition and Cellular Evaluation of the Antioxidant Activity of *Desmodium adscendens* Leaves. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2011, 1 (2011).
34. Xueqin M., Zheng C., Hu Ch., Rahman K., Qin L.: The genus *Desmodium* (*Fabaceae*) – traditional uses in Chinese medicine. *Journal of Ethnopharmacology* 138, 314 (2011).
35. <http://www.vigorous-tech.com/extract-powder/desmodium-extract.html>, staženo 22.2.2018.
36. François C., Fares M., Baiocchi C., Maixent J. M.: Safety of *Desmodium adscendens* extract on hepatocytes and renal cells. Protective effect against oxidative stress. *Journal of Intercultural Ethnopharmacology* 4, 1 (2014).
37. Zhu Z-Z., Ma K-J., Zhang H., Zheng Ch-J., Han T., Zhang Q-Y., Qin L-P.: Analgesic, antiinflammatory and antipyretic activities of the petroleum ether fraction from the ethanol extract of *Desmodium podocarpum*. *Journal of Ethnopharmacology* 133, 1126 (2011).
38. Jahodář L.: *Farmakobotanika*. Karolinum, Praha (2009).
39. Baiocchi C., Medana C., Giancotti V., Aigotti R., Bello F. D., Massolino C., Gastaldi D., Grandi M.: Qualitative characterization of *Desmodium adscendens* constituents by high-performance liquid chromatography-diode array ultraviolet-electrospray ionization multistage mass spectrometry. *European Journal of Mass Spectrometry* 19, 1 (2013).

40. Zielińska-Pisklak M. A., Kaliszewska D., Stolarczyk M., Kiss A. K.: Activity-guided isolation, identification and quantification of biologically active isomeric compounds from folk medicinal plant *Desmodium adscendens* using high performance liquid chromatography with diode array detector, mass spektrometry and multidimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 102, 54 (2015).
41. Gao S-M., Liu J.-S., Wang M., Cap T-T., Qi Y-D., Zhang B-G., Sun X-B., Liu H-T., Xiao P-G.: Traditional uses, phytochemistry, pharmacology and toxicology of *Codonopsis*: A review. *Journal of Ethnopharmacology* (2018).
42. Hekalová E.: Léčivé rostliny tradiční čínské medicíny, bakalářská práce. Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Lednice (2007). s. 24-25.
43. Jablonský I.: Rostliny pro posílení organismu a zdraví. Grada Publishing a.s., Praha (2007). s. 90.
44. https://www.salviaparadise.cz/herbar-rostlin-dangsen-codonopsis-pilosula-c-736_912.html, staženo 8.3.2018.
45. Tůmová L., Holcová L.: Přehled účinků a bezpečnosti užívání přírodních léčiv v průběhu těhotenství a laktace – 3. část. *Praktické lékárenství* 10, 20 (2014).
46. Jiang Y., Liu Y., Guo Q., Jiang Z., Xu C., Yang Y., Lin S., Shi J.: Acetylenes and fatty acids from *Codonopsis pilosula*. *Acta Pharmaceutica Sinica B* 5, 215 (2015).
47. Yang C., Gou Y., Chen J., An J., Chen W., Hu F.: Structural characterization and antitumor activity of a pectic polysaccharide from *Codonopsis pilosula*. *Carbohydrate Polymers* 98, 886 (2014).
48. Gao S., Wang H., Zeng C., Zhang Y.: Phytochemical and Pharmacological Properties of Radix Codonopsis: A Review. *Journal of Chinese Medicine Research and Development* 1, 16 (2012).
49. Sudhakaran M. V.: Botanical Pharmacognosy of *Centella asiatica* (Linn.) Urban. *Pharmacognosy Journal* 9, 546 (2017).

50. Singh S., Gautam A., Sharma A., Batra A.: *Centella asiatica* (L.): A plant with immense medicinal potential but threatened. International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research 4, 9 (2010).
51. <https://www.lipotherapie.com/centella/>, staženo 30.3.2018.
52. Prakash V., Jaiswal N., Srivastava M.: A Review on medicinal properties of *Centella asiatica*. Asian Journal of Pharmaceutical and clinical Resesearch 10, 69 (2017).
53. Roy A., Bharadvaja N.: *Centella asiatica*: A Pharmaceutically Important Medicinal Plant. Current Trends in Biomedical Engineering & Biosciences 5, 1 (2017).
54. Gohil K. J., Patel J. A., Gajjar A. K.: Pharmacological Review on *Centella asiatica*: A Potential Herbal Cure-all. Indian Journal of Pharmaceutical Sciences 2010, 546 (2010).
55. Jain P. K., Das D.: Pharmacognostic and pharmacological aspect of *Bacopa monnieri*: A Review. Innovare Journal of Ayurvedic Sciences 4, 7 (2016).
56. Gohil K. J., Patel J. A.: A review on *Bacopa monniera*: Current research and future prospects. International Journal of Green Pharmacy 2010, 1 (2010).
57. <https://indiabiodiversity.org/species/show/32964>, staženo 1.4.2018.
58. Srivastava A.: In vitro shoot culture of *Bacopa Monnieri* and *Cassia Senna* and their phytochemical and biological evaluation as compared to field grown plants, thesis. Maharaja Krishnakumarsinhji Bhavnagar University, 2009. s. 20-24.
59. Kottapali J.: Medicinal plants from Deccan ecoregion, India: Traditional knowledge, ethnopharmacology, cultivation, utilization, conservation and Biotechnology – opportunities and impediments. Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology 1, 156 (2007).
60. Krishna K. L.: Pharmacological profiles of *Bacopa monnieri*: A Review. International Journal of Pharmacy 1, 15 (2011).
61. Sandhya G., Manju T., Ruchira Ch., Shanta A., Anjali N.: Acetylcholinesterase inhibitory potential of *Bacopa monnieri* and acephate in heart of chick. The Pharma Innovation Journal 5, 34 (2016).

62. Al-Snafi A. E.: The pharmacology of *Bacopa monniera*. A review. International Journal of Pharma Sciences and Research 4, 154 (2013).
63. Russo A., Borrelli F.: *Bacopa monniera*, a reputed nootropic plant: an overview. Phytomedicine 12, 305 (2005).
64. Murthy P. B., Raju V. R., Ramakrisana T., Chakravarthy M. S., Kumar K. V., Kannababu S., Subbaraju G. V.: Estimation of twelve bacopa saponins in *Bacopa monnieri* extracts and formulations by high-performance liquid chromatography. Chemical and Pharmaceutical Bulletin (Tokyo) 54, 907 (2006).
65. Ma H., He X., Yang Y., Li M., Hao D., Jia Z.: The genus *Epimedium*: An ethnopharmacological and phytochemical review. Journal of Ethnopharmacology 134, 519 (2011).
66. Junsheng Y., Bouffort D. E., Brach A. R.: 8. *Epimedium linnaeus*, Sp. Pl. 1: 117. 1753. Flora of China 19, 787 (2011).
67. Sekerka P.: Škornice - bylinné příbuzné dřívěšálů. Živa 1, 15 (2007).
68.
<https://agriculture.indiabizclub.com/catalog/763060~epimedium+sagittatum~xiamen>, staženo 1.4.2018.
69. Jiang J., Zhao B-J., Song J., Jia X-B.: Pharmacology and Clinical Application of Plants in *Epimedium* L. Chinese Herbal Medicines 8, 12 (2016).
70. Wang G. J., Tsai T. H., Lin L. C.: Prenylflavonol, acylated flavonol glycosides and related compounds from *Epimedium sagittatum*. Phytochemistry 68, 2455 (2007).
71. Ranjan N., Kumari M: Inhibitory activity of acetylcholinesterase and Antioxidant activity of methanolic extract of *Desmodium gangeticum* (L.). International Journal of Bioassays 6.01, 5208 (2017).
72. Weon J. B., Eom M. R., Jung Y. S., Hong E-U., Ko H-J., Lee H. Y., Park D-S., Ma C-J.: Steamed and fermented ethanolic extract from *Codonopsis lanceolata* attenuates amyloid- β -Induced memory impairment in mice. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine 2016, 1 (2016).

73. Sulaiman A. Z. B., Ziad A.: Antioxidant and anti-acetylcholinesterase activities of *Centella asiatica* (Pegaga) to treat memory dysfunction. Researchgate.net (2012).