

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky**



**Česká zemědělská  
univerzita v Praze**

**Protizánětlivá aktivita přírodních látek**

**Diplomová práce**

**Autor práce: Bc. David Vrkoč**

**Obor studia: Výživa a potraviny**

**Vedoucí práce: Ing. Ivo Doskočil, Ph.D.**

© 2021 ČZU v Praze

## **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Protizánětlivá aktivita přírodních látek" jsem vypracoval samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autor uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 19. 4. 2021

---

## **Poděkování**

Rád bych touto cestou poděkoval Ing. Ivo Doskočilovi, Ph.D., za odborné vedení mé diplomové práce a cenné rady, které mi po celou dobu poskytoval a také týmu ADINACO z Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové za přípravu a poskytnutí vzorků alkaloidů čeledi *Amaryllidaceae*.

# Protizánětlivá aktivita přírodních látek

## Souhrn

Chemické látky přírodního původu vykazují široké spektrum biologicky aktivních účinků, od antioxidačního působení či anti-proliferačních účinků až po protizánětlivé působení. Alkaloidy představují jednu z nejrozmanitějších tříd sekundárních metabolitů, které jsou produkovány různými organismy, a to včetně rostlin, kde slouží především k jejich ochraně před býložravci a patogeny nebo také jako atraktanty pro opylovače. Některé alkaloidy mají schopnost inhibovat produkci oxidu dusnatého a dalších zánětlivých mediátorů v *in vitro* studiích. Tyto zánětlivé mediátory jsou nezbytné pro rozvoj zánětlivé reakce, avšak jejich nadměrná a ničím neregulovaná produkce může vést k závažným zdravotním obtížím. Zánět představuje nezbytnou obrannou reakci organismu, která je zprostředkována imunitním systémem vůči infekčním patogenům. Akutní zánětlivá reakce je nezbytná pro regeneraci poškozené tkáně a k obnovení homeostázy v organismu. Avšak pokud akutní zánětlivá reakce přetrvává, může přejít do stavu nazývaného jako chronický zánět, který může vést k rozvoji celé řady vážných civilizačních onemocnění.

Testováno bylo 11 alkaloidů čeledi *Amaryllidaceae* na jejich schopnost inhibovat produkci oxidu dusnatého pomocí Griessova činidla na buněčné linii myších makrofágů RAW 264,7. Zároveň se stanovením inhibice produkce oxidu dusnatého byla stanovena jejich toxicita pomocí tetrazol bromidu. Pro stanovení cytotoxicity byly alkaloidy testovány při koncentracích 10; 5; 2,5; 1,25; 1; 0,625; 0,5; 0,3125; 0,25; 0,125; 0,0625; 0,03125  $\mu\text{M}$ . Následně pro testování jejich schopnosti inhibice produkce oxidu dusnatého byly využity testované alkaloidy při koncentracích 10; 5; 2,5; 1,25; 0,625; 0,3125  $\mu\text{M}$  pro alkaloidy homolykorin, masonin, odulin, hippeastrin, norpluvin, haemanthidin a tazettin, při koncentracích 1; 0,5; 0,25; 0,125; 0,0625; 0,03125  $\mu\text{M}$  pro alkaloidy haemanthamin, galanthamin a montanin a při koncentracích 1,25; 0,625; 0,3125  $\mu\text{M}$  pro alkaloid lykorin.

Námi testované buněčné linie vykazaly cytotoxicitu na čtyři alkaloidy (lykorin, haemanthidin, haemanthamin a montanin) s hodnotou  $\text{IC}_{10}$  pro lykorin  $1,41 \pm 0,46 \mu\text{M}$ , respektive  $3,65 \pm 1,25 \mu\text{M}$  pro haemanthidin,  $2,35 \pm 0,84 \mu\text{M}$  pro haemanthamin a  $1,54 \pm 0,44 \mu\text{M}$  pro montanin. Inhibice produkce oxidu dusnatého byla zaznamenána nejvyšší u hippeastrinu a to o 54,3 % při koncentraci 10  $\mu\text{M}$ , dále u haemanthaminu o 52,7 % při koncentraci 1  $\mu\text{M}$ , lykorinu o 49,0 % při koncentraci 1,25  $\mu\text{M}$ , norpluvinu o 43,8 % při koncentraci 10  $\mu\text{M}$  a galanthaminu o 40,6 % při koncentraci 1  $\mu\text{M}$ . Naopak u alkaloidu tazettinu byla zjištěna indukce produkce NO o 128,8 % při koncentraci 5  $\mu\text{M}$  a o 51,0 % při koncentraci 10  $\mu\text{M}$ . Schopnost inhibovat produkci NO nebyla dále zjištěna u alkaloidů homolykorinu, masoninu, odulinu, haemanthidinu a montaninu.

Ze zjištěných výsledků vyplývá, že i při nízkých koncentracích jsou některé alkaloidy čeledi *Amaryllidaceae* schopny částečně inhibovat produkci NO a z tohoto důvodu jsou vhodné pro další podrobné testování jejich protizánětlivého působení.

**Klíčová slova:** Oxid dusnatý; protizánětlivá aktivita; RAW 264,7; lipopolysacharid; inhibice

# Anti-inflammatory activity of natural products

## Summary

Chemical products of natural origin show a wide range of biological activities, from antioxidant or anti-proliferative effects to anti-inflammatory effects. Alkaloids represent one of the most diverse classes of secondary metabolites, which are produced by various organisms, including plants, where they serve primarily to protect them from herbivores and pathogens or also as attractants for pollinators. Some alkaloids can inhibit the production of nitric oxide and other inflammatory mediators in *in vitro* studies. These inflammatory mediators are essential for the development of an inflammatory response, but their excessive and unregulated production can lead to serious health problems. Inflammation is a necessary defense response of the body, which is mediated by the immune system against infectious pathogens. An acute inflammatory reaction is necessary to regenerate damaged tissue and restore homeostasis in the body. However, if the acute inflammatory reaction persists, it can progress to a condition called chronic inflammation, which can lead to the development of several serious diseases of civilization.

Eleven alkaloids of the *Amaryllidaceae* family were tested for their ability to inhibit nitric oxide production by Griess reagent on the RAW 264,7 murine macrophages cell line. Simultaneously with the determination of the inhibition of nitric oxide production, was determined their toxicity using tetrazole bromide. Alkaloids were used for the determination of cytotoxicity at concentrations of 10; 5; 2,5; 1,25; 1; 0,625; 0,5; 0,3125; 0,25; 0,125; 0,0625; 0,03125  $\mu\text{M}$ . The alkaloids were then tested for their ability to inhibit nitric oxide production at concentrations of 10; 5; 2,5; 1,25; 0,625; 0,3125  $\mu\text{M}$  for the alkaloids homolycorine, masonine, oduline, hippeastrine, norpluvine, haemanthidine and tazettine and at concentrations of 1; 0,5; 0,25; 0,125; 0,0625; 0,03125  $\mu\text{M}$  for the alkaloids haemanthamine, galanthamine, montanine and at concentrations of 1,25; 0,625; 0,3125  $\mu\text{M}$  for alkaloid lycorine.

The tested cell lines showed cytotoxicity to four alkaloids (lycorine, haemanthidine, haemanthamine and montanine) with  $\text{IC}_{10}$  values for lycorine of  $1,41 \pm 0,46 \mu\text{M}$  and  $3,65 \pm 1,25 \mu\text{M}$  for haemanthidine,  $2,35 \pm 0,84 \mu\text{M}$  for haemanthamine and  $1,54 \pm 0,44 \mu\text{M}$  for montanine. Inhibition of nitric oxide production was recorded highest in hippeastrine by 54,3 % at a concentration of 10  $\mu\text{M}$ , then by haemanthamine by 52,7 % at a concentration of 1  $\mu\text{M}$ , lycorine by 49,0 % at a concentration of 1,25  $\mu\text{M}$ , norpluvine by 43,8 % at a concentration of 10  $\mu\text{M}$  and galanthamine by 40,6 % at a concentration of 1  $\mu\text{M}$ . In contrast, the alkaloid tazettin induced the production of NO by 128,8 % at 5  $\mu\text{M}$  and by 51,0 % at 10  $\mu\text{M}$ . The ability to inhibit NO production was not detected with the alkaloids homolycorine, masonine, oduline, haemanthidine and montanine.

The results show that even at low concentrations, the alkaloids of the *Amaryllidaceae* family are able to partially inhibit NO production and they are suitable for further detailed testing of their anti-inflammatory activity.

**Keywords:** Nitric oxide; anti-inflammatory activity; RAW 264,7; lipopolysaccharide, inhibition.

# Obsah

<b>1 Úvod .....</b>	<b>7</b>
<b>2 Vědecká hypotéza a cíle práce .....</b>	<b>8</b>
<b>3 Literární rešerše.....</b>	<b>9</b>
<b>3.1 Imunitní systém.....</b>	<b>9</b>
3.1.1 Vrozená imunita.....	9
3.1.2 Adaptivní imunita .....	10
<b>3.2 Zánět.....</b>	<b>11</b>
3.2.1 Příčiny zánětu .....	12
3.2.2 Mediátory zánětu .....	13
3.2.3 Průběh zánětu.....	15
3.2.4 Protizánětlivá léčiva.....	16
3.2.5 Sloučeniny přírodního charakteru s protizánětlivými účinky.....	17
3.2.6 Léčba zánětlivých onemocnění pomocí přírodních látek .....	18
3.2.7 Vliv stravy na zánětlivá onemocnění.....	21
<b>3.3 Alkaloidy .....</b>	<b>23</b>
3.3.1 Charakteristika .....	23
3.3.2 Biologická aktivita alkaloidů .....	24
<b>3.4 Čeleď Amaryllidaceae .....</b>	<b>26</b>
3.4.1 Alkaloidy čeledi <i>Amaryllidaceae</i> .....	26
3.4.2 Biosyntéza alkaloidů čeledi <i>Amaryllidaceae</i> .....	27
3.4.3 Základní strukturní typy <i>Amaryllidaceae</i> alkaloidů .....	29
3.4.4 Biologická aktivita alkaloidů čeledi <i>Amaryllidaceae</i> .....	30
<b>4 Metodika .....</b>	<b>34</b>
<b>4.1 Materiál.....</b>	<b>34</b>
<b>4.2 Metodika .....</b>	<b>34</b>
<b>4.3 Statistická analýza dat.....</b>	<b>35</b>
<b>5 Výsledky.....</b>	<b>36</b>
<b>5.1 Výsledky testu cytotoxicity .....</b>	<b>36</b>
<b>5.2 Výsledky stanovení produkce NO .....</b>	<b>36</b>
<b>6 Diskuze .....</b>	<b>40</b>
<b>7 Závěr .....</b>	<b>43</b>
<b>8 Literatura.....</b>	<b>44</b>
<b>9 Samostatné přílohy .....</b>	<b>I</b>

# 1 Úvod

V adaptaci proti napadení patogeny a vůči působení stresu okolního prostředí produkují rostliny látky, které vykazují různé biologické aktivity. Tyto látky jsou malé organické molekuly, které pocházejí ze sekundárního metabolismu rostlin. Léčivé rostliny tedy představují velmi zajímavý zdroj biologicky aktivních látek, které mohou být účinné v léčbě různých onemocnění, včetně těch zánětlivých (Nunes et al. 2020).

Zánět představuje základní obrannou odpověď organismu, která je zprostředkována imunitním systémem v závislosti na přítomnosti patogenu, poškození tkání či buněk. Mezi příznaky zánětu můžeme zařadit zarudnutí (*rubor*), zvýšenou teplotu (*calor*), otok (*tumor*), bolest (*dolor*) a ztrátu funkce (*functio laesa*). Zánět je pohotovou reakcí organismu, která má za úkol obnovení tkáně a znovu nastolení homeostázy v organismu, tato reakce bývá nazývána jako akutní zánět. Ovšem pokud akutní zánětlivá reakce nedokáže patřičný patogen eliminovat a zánět přetrvává, je tento stav nazýván jako chronický zánět. Chronický zánět nemusí být způsoben pouze perzistentními patogeny v organismu, ale může být výsledkem jiných příčin poškození tkáně, jako jsou například autoimunitní reakce (Kumar et al. 2014). Tento chronický stav může vést k rozvoji celé řady vážných civilizačních onemocnění, a to zejména kardiovaskulárních onemocnění, aterosklerózy, *diabetu mellitu* 2. typu, revmatoidní artritidy a nádorových onemocnění (Sugimoto et al. 2016).

Rostliny čeledi *Amaryllidaceae* byly po celá staletí využívány v lidovém léčitelství. Tradičně byly rostliny čeledi *Amaryllidaceae* používány při léčbě zánětlivých onemocnění, oběhového a nervového systému. Terapeutická hodnota těchto rostlin je připisována přítomnosti alkaloidů, jež jsou odvozeny od aminokyseliny tyrosinu. Tyto alkaloidy vykazují nejen cytotoxické a antivirové účinky, ale také mnoho dalších fyziologických účinků, jako je například protizánětlivá aktivita, antibakteriální účinky a v neposlední řadě také schopnost inhibovat acetylcholinesterázu, čehož je využíváno při léčbě Alzheimerovy choroby (Ding et al. 2017).

Nicméně potenciál amarylkovitých alkaloidů byl prozatím studován pouze částečně. Z tohoto důvodu je tedy nezbytný další vědecký výzkum, který by objasnil mechanismus působení amarylkovitých alkaloidů a vedl k objevení nových a účinných terapeutických látek.

## **2 Vědecká hypotéza a cíle práce**

Hypotéza: Chemické látky přírodního charakteru mají schopnost inhibovat produkci oxidu dusnatého.

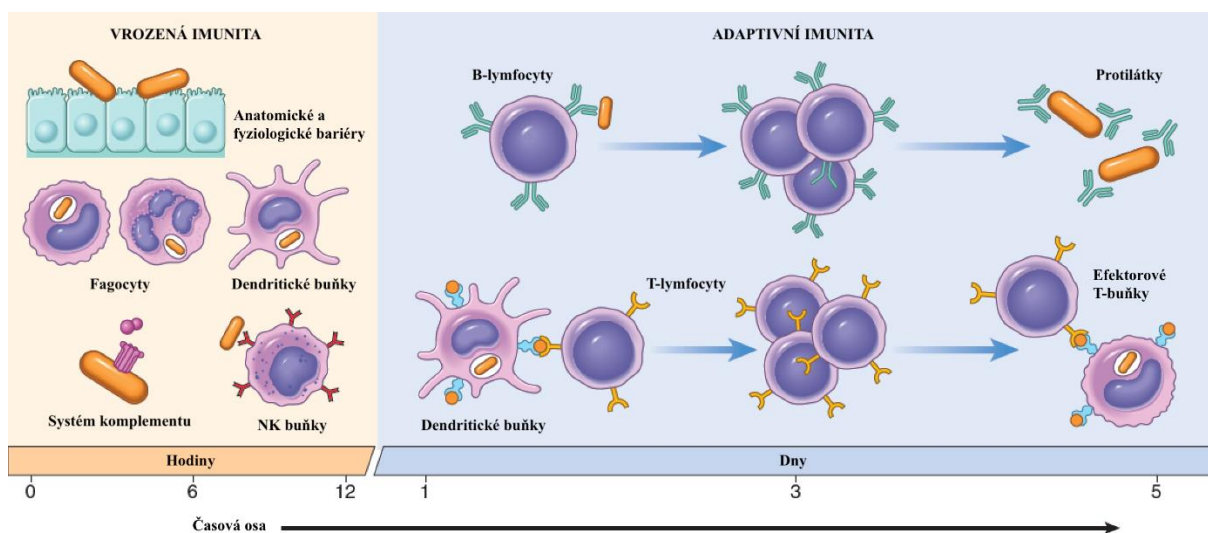
Cílem práce je pomocí *in cellulo* metod stanovit potencionální účinnost přírodních látek na inhibici produkce oxidu dusnatého na buněčné linii myších makrofágů RAW 264.7.



## 3 Literární rešerše

### 3.1 Imunitní systém

Imunitní systém představuje souhrn mechanismů, které lidský organismus chrání před cizími antigeny, jako jsou mikroorganismy, viry a toxiny. Tímto působením udržuje imunitní systém integritu organismu. Imunitní systém je tvořen nespecifickými mechanismy, které bývají nazývány jako vrozená imunita a antigenně specifickými mechanismy, nazývané jako adaptivní imunita (Obr. 1). Tyto mechanismy se vzájemně ovlivňují a doplňují, přičemž vady obou mechanismů mohou vyvolat autoimunitní onemocnění, imunodeficienci a mnohá zánětlivá onemocnění. Vrozená imunita představuje první obrannou linii proti pronikajícím patogenům. Tato imunitní reakce není závislá na antigenu, proto také bývá často nazývána imunitou nespecifickou, kterou organismus používá neprodleně po kontaktu s patogenem (Kumar et al. 2014). Naproti tomu adaptivní imunita je závislá na antigenu a je specifická pro daný antigen, proto dochází k delší časové prodlevě mezi expozicí antigenu a imunitní reakcí. Charakteristickým znakem adaptivní imunity je kapacita paměti, která umožňuje organismu dosáhnout rychlejší a efektivnější imunitní reakce po následné expozici antigenu (Marshall et al. 2018).



**Obr. 1:** Základní mechanismy vrozené a adaptivní imunity. NK buňky z anglického natural killers cells. Upraveno dle Kumar et al. (2014).

#### 3.1.1 Vrozená imunita

Vrozená imunita je v organismu přítomna od narození a je připravena poskytovat obranu proti patogenům a eliminovat poškozené buňky (Kumar et al. 2014). Vrozená imunita představuje soubor obranných mechanismů, které jsou závislé na receptorech pro rozpoznávání molekulových vzorů. Tyto receptory umožňují imunitním buňkám detekovat a rychle reagovat na širokou škálu patogenů, které mají společné struktury, známé jako molekulární struktury typické pro patogeny (PAMPs), toto označení je odvozeno z anglického názvu (pathogen-associated molecular patterns). K typickým příkladům PAMPs patří bakteriální komponenty buněčné stěny, jako jsou lipopolysacharidy (LPS). Cílem vrozené imunity je vyhledání patogenů a jejich následná eliminace. Toho je docíleno pomocí tzv. systému komplementu,

jedná se o biochemickou kaskádu, jejíž funkce spočívá v identifikaci a následné opsonizaci patogenů. Díky tomuto systému jsou patogeny následně fagocytovány. Během fagocytózy jsou odstraňovány mrtvé buňky či cizí látky přítomné v orgánech, tkáních, krvi a lymfě.

Pro reakci vrozené imunity je typický rychlý nábor imunitních buněk do míst infekce s produkcí cytokinů a chemokinů s následnou tvorbou zánětu. Produkce cytokinů mobilizuje mnoho obranných mechanismů v celém těle a zároveň aktivuje buněčné reakce v místě poranění nebo infekce. Klíčové zánětlivé cytokiny uvolňované na počátku reakce na bakteriální infekci jsou faktor nádorové nekrózy (TNF – Tumor Necrosis Factor) a interleukiny 1 (IL-1) a interleukin 6 (IL-6). Tyto cytokiny jsou důležité pro zahájení náboru buněk, které vytvářejí lokální zánět, který je nezbytný pro odstranění patogenů. Ačkoliv jsou zánětlivé cytokiny nezbytné pro tvorbu lokální zánětlivé odpovědi, která je potřebná pro odstranění infekčních patogenů, může jejich nadměrná a neregulovatelná produkce způsobovat zánětlivá a autoimunitní onemocnění.

Na reakci vrozené imunity se podílí mnoho buněk, jako jsou fagocyty (neutrofilů a makrofágy), dendritické buňky, žírné buňky, bazofily, eosinofily, NK buňky a přirozené lymfoidní buňky. Fagocyty se dělí na neutrofilů a makrofágy, tyto buňky sdílejí stejný úkol a tím je fagocytóza patogenů a jejich eliminace. Dendritické buňky jsou také schopny fagocytózy, ale zároveň mají schopnost působit jako tzv. antigen prezentující buňky (APC), toto označení je odvozené z anglického názvu (antigen presenting cell). Jedná se o buňky, které podněcují reakci získané imunity a zároveň působí jako důležití poslové mezi vrozenou a získanou imunitou (Marshall et al. 2018). Žírné buňky a bazofily sdílejí mnoho významných funkcí a obě jsou nápomocné při zahájení akutních zánětlivých reakcích. Naproti tomu eosinofily jsou granulocyty, které mají fagocytické vlastnosti a hrají důležitou roli při likvidaci parazitů, kteří mohou být až příliš velcí na to, aby mohli být fagocytováni. Taktéž NK buňky mají významnou roli při eliminaci nádorových buněk a buněk, které byly infikovány virovými patogeny. Eliminace infikovaných buněk je dosaženo uvolněním perforinů a granzymů z granúl NK buněk, které indukují apoptózu (Stone et al. 2010).

Kromě výše zmíněných mechanismů mají zásadní vliv na udržení integrity organismu anatomické a fyziologické obranné linie. Anatomické a fyziologické bariéry tvoří základní obrannou linii proti vstupu patogenů do organismu. Mezi tyto bariéry patří například neporušená kůže, mukociliární clearance, nízké pH žaludku či bakteriolytický lysozym, který je přítomný v krevní plazmě, slzách, slinách a dalších tělních tekutinách (Turvey & Broide 2010).

### **3.1.2 Adaptivní imunita**

K rozvoji adaptivní imunity napomáhá reakce vrozené imunity a její akce je zásadní, když je vrozená imunita neúčinná při eliminaci infekčních patogenů. Primární funkcí adaptivní imunitní odpovědi je rozpoznání konkrétního antigenu a vytvoření imunologické paměti, která napomáhá k rychlému rozpoznání a následné eliminaci daného patogenu při další expozici (Bonilla & Oettgen 2010). Adaptivní imunitní reakce je základem pro efektivní imunizaci proti infekčním chorobám. Buňky adaptivního imunitního systému zahrnují T-lymfocyty a B-lymfocyty (Marshall et al. 2018).

## **T-lymfocyty**

T-lymfocyty (T-buňky) se utvářejí v hematopoetických kmenových buňkách v kostní dřeni a následně putují do brzlíku, kde dozrávají. Tyto buňky exprimují na svých membránách jedinečné receptory vázající antigeny, které jsou známy jako T-buněčné receptory (TCR). Každá T-buňka exprimuje jeden typ TCR a má schopnost rychle se množit a diferencovat, pokud dochází k příjmu patřičných signálů. T-buňky vyžadují ke svému působení přítomnost APC k rozpoznání konkrétního antigenu (Marshall et al. 2018). Povrchy APC exprimují skupiny proteinů známé jako hlavní histokompatibilní komplex (MHC). MHC jsou klasifikovány do dvou tříd, lišící se zdrojem vázaného peptidu. Molekuly MHC I představují endogenní (intracelulární) peptidy, zatímco molekuly MHC II představují exogenní (extracelulární) peptidy T-buňkám. Molekuly MHC zobrazují fragmenty antigenů, v případě MHC I když je buňka infikována intracelulárním patogenem a v případě MHC II se jedná o patogeny, které byly fagocytovány (Bonilla & Oettgen 2010).

K aktivaci T-lymfocytů dochází při kontaktu s APC, které fagocytovaly antigen a „zobrazují“ fragmenty antigenu (peptidu) navázané na své molekuly MHC. Příležitost pro kontakt příslušných T-lymfocytů s APC nesoucí vhodný MHC komplex se zvyšuje cirkulací T-lymfocytů v těle prostřednictvím lymfatického systému, krevního oběhu a jejich akumulací společně s APC v mízních uzlinách. MHC komplex aktivuje TCR a T-lymfocyty začínají produkovat cytokiny, které dostávají imunitní odpověď pod svou kontrolu. Následně dochází k diferenciaci T-lymfocytů na cytotoxické T-lymfocyty (CD8+ buňky) nebo pomocné T-lymfocyty (CD4+ buňky). CD8+ se primárně podílejí na destrukci buněk infikovaných cizími látkami, jako jsou viry a zároveň se podílejí na eliminaci nádorových buněk. CD4+ nevykazují cytotoxickou nebo fagocytickou aktivitu, ale zprostředkovávají imunitní odpověď vhodným „nasměrováním“ dalších buněk k provádění těchto úkolů a tím tak regulují imunitní odpověď (Marshall et al. 2018).

## **B-lymfocyty**

B-lymfocyty (B-buňky) pocházejí stejně jako T-lymfocyty z hematopoetických kmenových buněk v kostní dřeni, kde dochází k jejich dozrávání a poté opouští kostní dřeň. Na rozdíl od T-lymfocytů mohou B-lymfocyty rozpoznávat antigeny přímo, bez potřeby APC, prostřednictvím jedinečných protilátek exprimovaných na jejich buněčném povrchu. Hlavní funkcí B-lymfocytů je produkce protilátek proti cizím antigenům, což vyžaduje jejich další diferenciaci (Bonilla & Oettgen 2010). Při aktivaci cizími antigeny, ke kterým mají vhodný receptor, dochází k jejich proliferaci a diferencují se na plazmatické buňky vylučující protilátky nebo paměťové buňky. Při opakované expozici stejného antigenu, paměťové buňky rychle reagují a produkují protilátky a eliminují antigeny (Marshall et al. 2018).

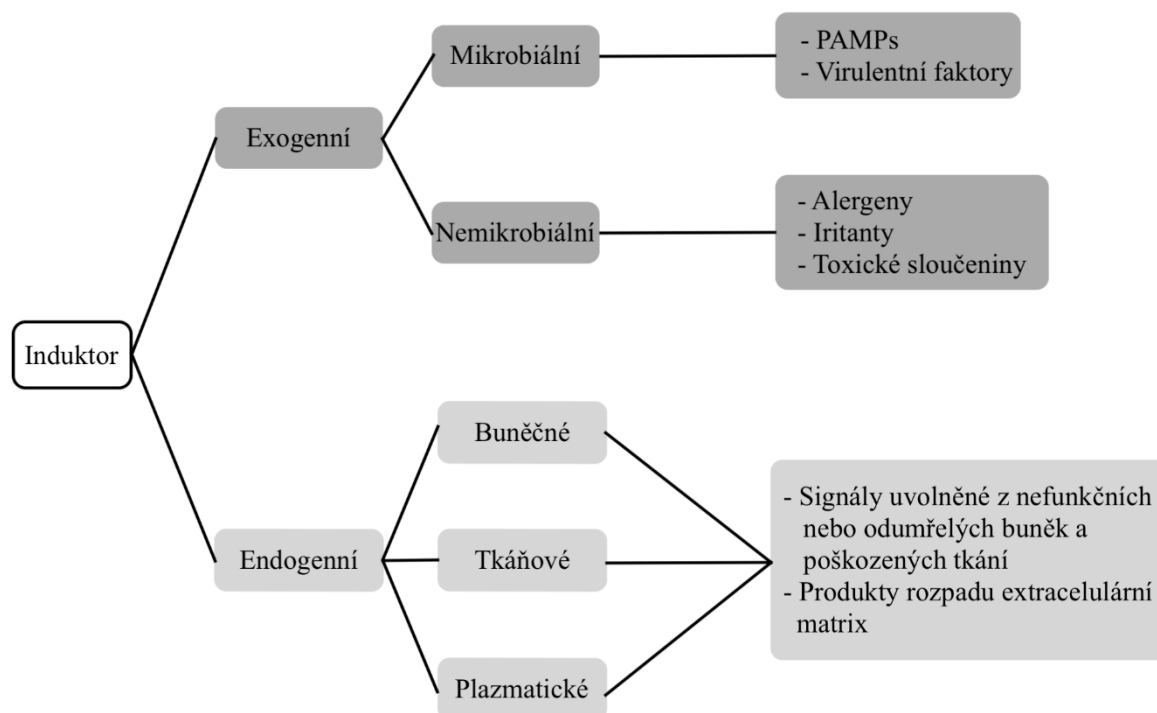
### **3.2 Zánět**

Zánět představuje základní obrannou reakci organismu, která je zprostředkována imunitním systémem v závislosti na přítomnosti patogenu, poškození tkání či buněk. Jedná se o kaskádu komplexních biologických jevů, které zahrnují různé buněčné, nervové, hormonální a humorální systémy. Z histologického hlediska zahrnuje celou řadu událostí, včetně dilatace arteriol a kapilár, extravazace tekutin a migrace plazmatických proteinů a leukocytů do poškozené oblasti. Typickými příznaky jsou zarudnutí (*rubor*), zvýšená teplota (*calor*), otok

(*tumor*), bolest (*dolor*) a ztráta funkce (*functio laesa*) (Kumar et al. 2014). Hlavní úlohou zánětlivé reakce je likvidace, zředění nebo odstranění škodlivé látky z poškozené tkáně a v neposlední řadě také obnovení struktury a funkce poškozené tkáně (Feuerstein et al. 2007). Podle délky doby trvání můžeme zánět rozdělit na akutní a chronický. Počáteční, rychlá reakce na infekci a poškození tkání se nazývá akutní zánět. Obvykle se vyvíjí během několika minut nebo hodin a má krátké trvání, nejčastěji několik hodin až několik dní. Hlavními charakteristikami akutního zánětu je exsudace tekutin a plazmatických proteinů a emigrace leukocytů, převážně neutrofilů. V momentě, kdy akutní zánět dosáhne svého cíle a odstraní infekční patogeny, zánětlivá reakce odezní, avšak pokud nedojde k odstranění infekčního patogenu, zánětlivá reakce může pokračovat do zdlouhavé fáze, která bývá nazývána chronický zánět. Chronický zánět je dlouhodobá reakce, která může trvat týdny až měsíce. Dochází k poškození tkáně a je pro něj typická přítomnost lymfocytů, makrofágů a tvorba vaziva (Kumar et al. 2014).

### 3.2.1 Příčiny zánětu

Zánětlivá reakce může být vyvolána několika faktory, jedná se o faktory biologické, chemické a fyzikální. Nejčastěji bývá zánětlivá reakce vyvolána závažným porušením homeostázy, která může být způsobena infekcemi (bakteriální, virové, plísňové, parazitární) a mikrobiálními toxiny. Induktory zánětu můžeme rozdělit podle původu na endogenní nebo exogenní (Obr. 2) (Medzhitov 2008).



Obr. 2: Příčiny zánětu. Upraveno dle Medzhitov (2008).

Různé infekční patogeny vyvolávají různé zánětlivé reakce, od mírného akutního zánětu, který způsobuje malé nebo žádné trvalé poškození a úspěšně eradikuje infekci, až po závažné systémové reakce, které mohou mít fatální následky, případně může docházet k chronickým zánětům, které způsobují rozsáhlé poškození tkáně. Dále může být zánět vyvolán nekrózou tkáně bez ohledu na příčinu buněčné smrti, která může zahrnovat ischemii, trauma nebo

fyzikální či chemické poškození, například tepelné poškození (popáleniny, omrzliny), ozáření nebo vystavení některým chemickým látkám v životním prostředí (Kumar et al. 2014).

### **3.2.2 Mediátory zánětu**

Induktory zánětu vyvolávají produkci mnoha zánětlivých mediátorů, které mění funkčnost tkání a orgánů. Buněčné mediátory mohou být produkovány specializovanými leukocyty, především tkáňovými makrofágy či žírnými buňkami nebo buňkami přítomnými v místních tkání. Některé mediátory, jako je například histamin a serotonin jsou preformováni a uloženy v granulích žírných buněk, bazofilů a krevních destiček. Jiné mediátory cirkulují jako neaktivní prekurzory v plazmě, jejich koncentrace se může výrazně zvýšit v důsledku zvýšené sekrece prekurzorů hepatocyty během akutní fáze zánětu. Další mediátory jsou produkovány přímo v reakci s induktory zánětu. Zánětlivé mediátory mohou být rozděleny na základě jejich biochemických vlastností na vazoaktivní aminy, vazoaktivní peptidy, fragmenty složek komplementu, lipidové mediátory, cytokiny, chemokiny a proteolytické enzymy (Kumar et al. 2014).

#### **Vazoaktivní aminy a peptidy**

Vazoaktivní aminy, histamin a serotonin jsou produkovány během degranulace žírných buněk a trombocytů. Komplexně působí na vaskulaturu, způsobují vaskulární permeabilitu, vazodilataci nebo vazokonstrikci (Kumar et al. 2014). Vazoaktivní peptidy mohou být skladovány v aktivní formě v sekrečních váčcích, například substance P nebo mohou být generovány proteolytickým zpracováním neaktivních prekurzorů v extracelulární tekutině, jedná se například o kininy, fibrinopeptidy a produkty degradace fibrinu. Substance P je uvolňována smyslovými neurony a může sama způsobit degranulaci žírných buněk. Další vazoaktivní peptidy jsou generovány proteolýzou Hagemanovým faktorem, trombinem nebo plazminem a způsobují vazodilataci a zvýšenou vaskulární permeabilitu. Hagemanův faktor hraje klíčovou roli při koordinaci těchto reakcí a působí jako senzor vaskulárního poškození a zároveň jako induktor zánětu. Tento faktor aktivuje kininovou kaskádu, produktem této kaskády je bradykinin, který má vliv na vaskulaturu a zároveň se podílí na vnímání bolesti. Pocit bolesti má důležitou fyziologickou roli během zánětlivé reakce, protože varuje organismus před abnormálním stavem poškozené tkáně (Medzhitov 2008).

#### **Cytokiny**

Cytokiny jsou rozpustné, nízkomolekulární glykoproteiny, které se účastní několika biologických procesů. Cytokiny jsou produkovány mnoha buněčnými typy, zejména lymfocyty, makrofágy a dendritickými buňkami, které zprostředkovávají a regulují imunitní a zánětlivé reakce (Kumar et al. 2014). Zánětlivé cytokiny jsou klasifikovány jako interleukiny (IL), IL-1, IL-2, IL-6 a IL-7, interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), faktory nádorové nekrózy (TNF), transformační růstový faktor (TGF) a chemokiny, které jsou primárně produkovány k náboru leukocytů do místa infekce nebo poranění (Turner et al. 2014). Cytokiny modulují imunitní reakci na infekci či poranění a regulují průběh zánětu. Nicméně nadměrná produkce zánětlivých cytokinů může vést k poškození tkání, hemodynamickým změnám, selhání orgánů, a nakonec mohou způsobit smrt (Chen et al. 2018a).

Jako první prozánětlivý mediátor, který je uvolněn po poškození tkáně a zahajuje zánětlivou reakci je TNF- $\alpha$ . Zvyšující se produkce TNF- $\alpha$  indukuje produkci dalších

prozánětlivých cytokinů a zároveň přispívá k produkci prostaglandinu E2 (PGE<sub>2</sub>). Podobné účinky jako TNF- $\alpha$  má IL-1, který stimuluje produkci cyklooxygenázy 2 (COX-2) a oxidu dusnatého (NO) a je následován produkcí IL-6, který je zodpovědný za vyvolání syntézy proteinů akutní fáze. Působení těchto cytokinů spouští syntézu dalších prozánětlivých mediátorů, což způsobuje šíření zánětlivé odpovědi (Ribeiro et al. 2018). Dalšími cytokiny, které hrají důležitou roli v zánětlivé reakci jsou protizánětlivé cytokiny, které regulují aktivity prozánětlivých cytokinů, tak aby bylo docíleno homeostázy. Mezi protizánětlivé mediátory se řadí například IL-4, IL-10 a IL-13 (Munroe et al. 2010).

### **Oxid dusnatý (NO)**

NO je zánětlivý mediátor, který je indukovaný prozánětlivými cytokiny v různých typech buněk včetně makrofágů (Wu et al. 2016). Vznik NO je katalyzován prostřednictvím syntáz oxidu dusnatého (NOS) a vzniká reakcí L-argininu a molekulárního kyslíku. Enzymy z rodiny NOS jsou strukturně a funkčně velmi komplikované ve srovnání s jednoduchostí molekuly, kterou produkují. V současnosti jsou známy tři izoformy NOS, neuronální NOS (nNOS), endoteliální NOS (eNOS) a indukovatelná NOS (iNOS). Neuronální a endoteliální NOS jsou konstitutivně exprimovány v nízkých koncentracích a produkují NO. Nízké koncentrace NO v organismu působí k regulaci tonusu hladkého svalstva a v nervové soustavě jako neurotransmitter v adrenergických a cholinergických nervech. Naproti tomu iNOS je aktivována působením určitých cytokinů, případně působením lipopolysacharidu (LPS) a následně syntetizuje NO ve větším množství, čímž se odlišuje od nNOS a eNOS. Hlavní fyziologickou rolí NO je cytotoxické působení vůči invazivním patogenům. V makrofázích NO reaguje se superoxidem za vzniku vysoce reaktivních volných peroxynitritových radikálů. Tyto volné radikály atakují a poškozují lipidy, proteiny a nukleové kyseliny mikrobů. Nicméně nadměrná a nekontrolovatelná produkce může cytotoxicky působit na vlastní buňky organismu (Kumar et al. 2014). Z tohoto důvodu mají látky s inhibiční aktivitou vůči NO značný potenciál stát se vhodnými terapeutickými prostředky při léčbě zánětů (Swindle & Metcalfe 2007).

### **Eikosanoidy**

Arachidonová kyselina (AA) představuje hlavní složku membránových fosfolipidů ve všech buňkách a je jedním z nejdůležitějších substrátů v syntéze biologicky aktivních mediátorů zánětu nazývané eikosanoidy. Eikosanoidy jsou syntetizovány dvěma hlavními skupinami enzymů, cyklooxygenázami, které syntetizují prostanoidy a lipoxygenázami syntetizující leukotrieny a lipoxiny (Kumar et al. 2014).

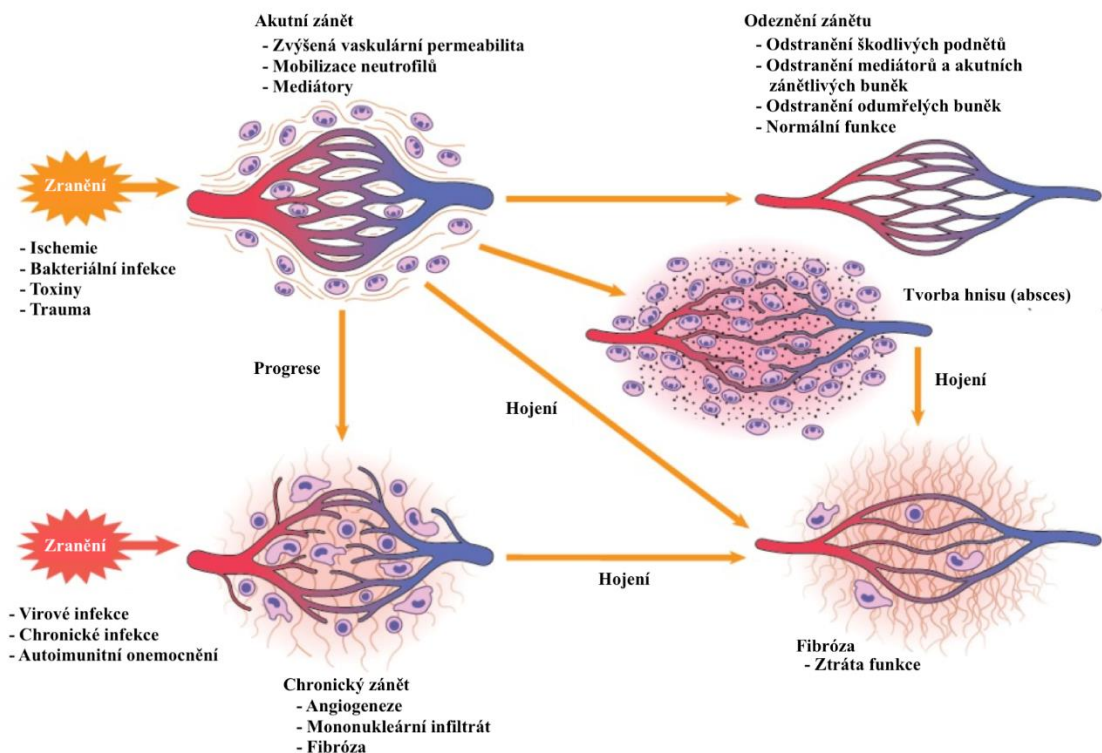
Prostanoidy se podílejí na vaskulárních a systémových reakcích zánětlivé odpovědi a jsou produkovány mastocyty, makrofágy a endoteliálními buňkami (Johnson 2018). Jsou syntetizovány působením enzymu cyklooxygenáza, který se vyskytuje ve dvou izoformách: cyklooxygenáza-1 (COX-1) a cyklooxygenáza-2 (COX-2) (Bailey 2013). COX-1 je také nazývána jako konstitutivní, protože je stabilně přítomna v organismu a je exprimována ve většině tkání, kde může sloužit k udržování homeostatické rovnováhy. Naproti tomu COX-2, která je označována jako indukibilní, není stabilně přítomna v organismu a je indukována zánětlivými cytokiny a následně generuje prostaglandiny, které jsou zapojeny v zánětlivých reakcích. Nejvýznamnějšími prostanoidy během zánětlivé reakce jsou prostaglandiny (PGE<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub>, PGF<sub>2a</sub>), prostacyklin I<sub>2</sub> a tromboxan A<sub>2</sub>, z nichž je každý odvozen od specifického enzymu. Zvýšené hladiny prostaglandinů byly zjištěny u pacientů trpící revmatoidní artritidou

a osteoartrózou (Kosaka et al. 2013). Prostaglandiny hrají také důležitou roli v patogenezi několika typů nádorových onemocnění, jako je rakovina prsu, jater a plic, zvýšenou expresí COX-2 a nadprodukcí prostaglandinu (Abdulkhaleq et al. 2018).

Mezi eikosanoidy se také řadí leukotrieny, které jsou produkovány leukocyty a mastocyty působením enzymu lipoxygenáza a podílejí se na reakcích cév a hladkého svalstva. Existují tři různé lipoxygenázy, přičemž v neutrofilech převažuje 5-lipoxygenáza. Tento enzym převádí AA na 5-hydroxyekosatetraenovou kyselinu, která je chemotaktická pro neutrofile a je prekurzorem leukotrienů. Leukotrien B<sub>4</sub> působí jako silné chemotaktické činidlo a aktivátor neutrofilů, které způsobuje agregaci a adhezi buněk k venulárnímu endotelu, uvolnění reaktivních forem kyslíku (ROS) a uvolnění lysozomálních enzymů. Cysteinylové leukotrieny LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub> a LTE<sub>4</sub> způsobují intenzivní vazokonstrikci, bronchospasmus a zvýšenou cévní permeabilitu. Lipoxiny jsou také generovány z AA působením lipoxygenázy, ale na rozdíl od prostanoidů a leukotrienů tlumí zánětlivou reakci, tím že inhibují nábor leukocytů. (Kumar et al. 2014).

### 3.2.3 Průběh zánětu

Bez ohledu na příčinu vzniku zánětu, se zánět pravděpodobně vyvinul jako adaptivní odpověď na obnovení homeostázy (Medzhitov 2008). Typická zánětlivá reakce se skládá ze čtyř složek: induktory zánětu, senzory detekující induktory zánětu, mediátory zánětu a cílové tkáně (Obr. 3). Průběh zánětlivé reakce závisí na povaze zánětlivého induktoru (Kumar et al. 2014).



**Obr. 3:** Průběh zánětlivé reakce. Upraveno dle (Kumar et al. 2014).

Akutní zánětlivá reakce vyvolaná infekcí nebo poškozením tkáně zahrnuje koordinovaný přísun krevních složek (plazmatických bílkovin a leukocytů, zejména neutrofilů) do místa infekce nebo poranění (Kumar et al. 2014). Tato reakce může být vhodně popsána na příkladu



mikrobiální infekce, kdy je zánětlivá reakce vyvolána receptory vrozené imunity, jako jsou například Toll-like receptory a NOD (nucleotid-binding oligomerization-domain protein) receptory (Barton 2008). Toto počáteční rozpoznání infekce je zprostředkováno makrofágy a žírnými buňkami, což vede k produkci zánětlivých mediátorů jako jsou chemokiny, cytokiny, vazoaktivní aminy, eikosanoidy a produkty proteolytických kaskád. Hlavním a bezprostředním účinkem těchto mediátorů je vyvolání lokálního zánětlivého exsudátu do extracelulárního prostoru v místě poškození (Poher & Sessa 2007). V momentě, kdy se neutrofilů dostanou do postiženého místa dochází k jejich aktivaci přímým kontaktem s patogeny anebo jsou aktivovány působením cytokinů. Neutrofilů mají následně za úkol eliminovat zdroj infekce pomocí uvolnění toxického obsahu jejich granulí, které zahrnují ROS, reaktivní formy dusíku (RNS), proteinázu 3, katepsin G a elastázu. Tyto vysoce účinné efekty nedokážou rozlišit hostitelské buňky a infekční buňky, z tohoto důvodu dochází k vedlejšímu poškození tkáně (Medzhitov 2008). Akutní zánětlivá reakce bývá zpravidla ukončena, jakmile je odstraněn induktor zánětu, infekce je odstraněna a poškozená tkáň je opravena. Ukončení zánětlivé reakce a přechod do homeostatického stavu je aktivní a vysoce regulovaný proces, který je nazýván odeznění zánětu. Pro odeznění zánětu je klíčová přeměna v lipidových mediátorech z prozánětlivých prostaglandinů na lipoxiny, které působí protizánětlivě. Lipoxiny inhibují nábor neutrofilů a místo toho podporují nábor monocytů, které odstraňují odumřelé buňky a iniciují remodelaci poškozených tkání (Medzhitov 2010).

V případě, že akutní zánětlivá reakce nedokáže patogen eliminovat, zánětlivý proces přetrvává a získává nové vlastnosti. Neutrofilů jsou nahrazeny makrofágy a v případě infekce také T-lymfocyty. Pokud je kombinovaný účinek těchto buněk stále nedostatečný, následuje chronický zánětlivý stav, který zahrnuje tvorbu granulomů a terciárních lymfoidních tkání. Vlastnosti tohoto stavu se mohou lišit v závislosti na třídě efektorů přítomných T-lymfocytů. Kromě perzistentních patogenů může být chronický zánět výsledkem jiných příčin poškození tkáně, jako jsou autoimunitní reakce nebo nedegradovatelná cizí tělesa (Kumar et al. 2014). Chronický zánět může vést k rozvoji celé řady civilizačních onemocnění, jako jsou kardiovaskulární onemocnění, ateroskleróza, *diabetes mellitus* 2. typu, revmatoidní artritida a nádorová onemocnění (Sugimoto et al. 2016).

### 3.2.4 Protizánětlivá léčiva

Hlavními skupinami protizánětlivých léčiv jsou kortikosteroidy a nesteroidní antiflogistika (NSA), které se liší ve způsobu jejich působení (Lima & Alvim 2018).

Kortikosteroidy jsou jedinými terapeutickými látkami, které jasně tlumí zánět přítomný v mnoha chronických zánětlivých onemocnění různých orgánů a příčin. Kortikosteroidy se dělí na lokální a systémové kortikosteroidy, které mají podobné farmakologické účinky lišící se účinnou dávkou podanou do cílového orgánu (Caramori et al. 2019). Z obecného hlediska vede účinek kortikosteroidů k výraznému snížení počtu a aktivace infiltrujících buněk, včetně žírných buněk, makrofágů, T-buněk a eosinofilů v zanícené tkáni (Adcock & Mumby 2016). Kortikosteroidy jsou využívány při léčbě astmatu, chronické obstrukční plicní nemoci, nespecifických střevních zánětech, zánětlivých onemocnění pokožky a celé řady dalších onemocnění. Nicméně jejich užívání vede k celé řadě nepříznivých vedlejších účinků. Projev vedlejších účinků je ovlivněn režimem dávkování konkrétního kortikosteroidu a individuální náchylností pacienta. S projevem závažnějších vedlejších účinků jsou spojovány převážně



systemové kortikosteroidy, avšak i aplikace lokálních kortikosteroidů může vést k vyvolání nežádoucích účinků. Nejčastějšími vedlejšími účinky, které jsou spojovány s užíváním kortikosteroidů je systémová arteriální hypertenze, zvýšená lámavost kostí, nevolnost, zvracení, metabolické problémy (například přírůstek hmotnosti, hyperglykémie a *diabetes mellitus* druhého typu) a šedý zákal (Rice et al. 2017).

NSA jsou celosvětově nejběžněji používaná léčiva (Virshette et al. 2019) k léčbě akutní a chronické bolesti způsobené zánětem (Lima & Alvim 2018). Hlavním mechanismem působení NSA je inhibice cyklooxygenáz, interferujících s metabolismem arachidonové kyseliny na prostaglandiny, prostacykliny a tromboxany. Existuje několik způsobů, jak klasifikovat NSA, lze je rozdělit na neselektivní NSA, preferenční inhibitory COX-2 a vysoce selektivní inhibitory COX-2. Z historického hlediska byla k léčbě zánětů využívána léčiva, jako je kyselina acetylsalicylová, indomethacin, ibuprofen a piroxicam. Tato tradiční NSA působí neselektivně a inhibují obě formy COX, což vede k jejich vedlejším účinkům (Hayashi et al. 2011). Selektivní inhibitory COX-2 jsou významnými terapeutickými látkami v léčbě bolesti, zejména u pacientů s revmatoidní artritidou nebo osteoartritidou. Tyto selektivní inhibitory COX-2 výrazně snižují výskyt vedlejších účinků ve srovnání s neselektivními NSA, jejichž vedlejší účinky vedli k defektu gastrointestinální sliznice. Nicméně dlouhodobé užívání těchto selektivních inhibitorů také přináší nežádoucí vedlejší účinky. Jedná se zejména o zvýšení rizika kardiovaskulárních a cerebrovaskulárních příhod s vyšší prevalencí u pacientů se zvýšeným rizikem trombózy (Dinarello 2010).

### **3.2.5 Sloučeniny přírodního charakteru s protizánětlivými účinky**

Rostlinné fenolové sloučeniny, proantokyanidiny, alkaloidy, terpenoidy a steroidní sloučeniny jsou obvykle zodpovědné za protizánětlivé účinky rostlinných extraktů. Tyto sekundární metabolity působí na různé cíle, které se podílejí na zánětlivé reakci (Ribeiro et al. 2018).

Řada flavonoidů vykazuje protizánětlivou aktivitu jak *in vitro*, tak i v *in vivo* podmínkách. Pro vysvětlení protizánětlivých aktivit *in vivo* je navrženo několik mechanismů účinku, nicméně nejsou však zcela objasněny. Hlavním mechanismem působení pro protizánětlivou aktivitu je inhibice enzymů generujících eikosanoidy včetně fosfolipázy A<sub>2</sub>, cyklooxygenáz a lipoxygenáz, což vede ke snížení hladin prostanoidů a leukotrienů (Kim et al. 2004). Mezi další mechanismy patří inhibice uvolňování histaminu, fosfodiesterázy a proteinových kináz (Ribeiro et al. 2018). Flavonoidy mohou působit protizánětlivě prostřednictvím svých antioxidačních účinků, jako „lapače“ volných radikálů, zhášecí ROS/RNS nebo jako chelátory kovových iontů, které se připisují fenolickým hydroxylovým skupinám (Rice-Evans et al. 1997). K tvorbě volných radikálů může v lidském těle docházet právě během zánětlivé reakce. Příklady ROS zahrnují singletový kyslík, superoxid či peroxy. Volné radikály se účastní řady procesů, například oxidační fosforylace v mitochondriích, regulaci buněčného růstu a mezibuněčné signalizaci. Pokud však dojde k nerovnováze mezi tvorbou volných radikálů a obrannými mechanismy těla, mohou volné radikály napadat lipidy v buněčných membránách, proteiny v tkáních nebo mohou způsobit poškození DNA, což může vést až k mutacím. Předpokládá se, že oxidační poškození hraje důležitou roli u řady civilizačních onemocnění, jako jsou chronické záněty, nádorová onemocnění, kardiovaskulární onemocnění (Ribeiro et al.

2018) nebo také neurodegenerativní onemocnění, jako je Alzheimerova choroba a Parkinsonova nemoc (Chan et al. 2017).

Dalšími sloučeninami s protizánětlivými vlastnostmi, které můžeme nalézt v široké škále léčivých rostlin jsou terpenoidy. Protizánětlivé účinky jsou připisovány především triterpenům, konkrétně lupanového strukturního typu, protože jsou schopny inhibovat syntézu prostaglandinu E2 a oxidu dusnatého. Příkladem může být lupeol, jedná se pentacyklický triterpen izolovaný z kmenové kůry, brazilské rostliny *Pterodon emigrantus* patřící do čeledi *Fabaceae* (Bobovité). Další skupinou terpenoidů vykazující protizánětlivé aktivity, jsou seskviterpeny, které se nacházejí v široké škále silic, například v  $\alpha$ -humulenu (De Moraes et al. 2012).

Alkaloidy jsou dalšími přírodními sloučeninami vykazující protizánětlivé účinky, které byly již popsány v odborné literatuře (Ratheesh et al. 2013; Fujii et al. 2017; Andreicuț et al. 2018). Mnoho alkaloidů bylo izolováno z původních rostlin z Brazílie, které byly studovány v souvislosti s protizánětlivými účinky (Ribeiro et al. 2018). Jedná se například o alkaloid bukittinggin, který byl izolován z rostlin *Sapium baccatum* z čeledi *Euphorbiaceae* (prýšcovité), který je schopen snižovat hladiny Prostaglandinu E2 (Panthong et al. 1998).

### 3.2.6 Léčba zánětlivých onemocnění pomocí přírodních látek

Navzdory rychlému pokroku ve vývoji několika způsobů léčby zánětu, může být účinnost a snášenlivost konvenčních protizánětlivých léčiv doprovázena řadou nežádoucích vedlejších účinků. Léčivé rostliny představují pozoruhodný zdroj biologicky aktivních látek, které mohou být nápomocné v léčbě chronických zánětů a onemocněními s nimi souvisejícími (Maione et al. 2016). Hlavními výhodami užívání rostlinných léčivých přípravků jsou nízké náklady, cenová dostupnost a obvykle méně vedlejších účinků. Výzkum uskutečněný na léčivých rostlinách je velmi důležitý pro potvrzení jejich bezpečnosti a účinnosti (Bhattacharya 2017). Za posledních 10 let bylo v odborné databázi Web of Science publikováno přes 3000 odborných článků zabývajících se touto problematikou, což potvrzuje velký zájem o výzkum přírodních látek v souvislosti s léčbou zánětlivých onemocněních.

#### Zánětlivá onemocnění kloubů

U některých onemocněních imunitní systém spouští zánětlivou reakci v momentě, kdy nejsou přítomny patogeny, které by vyvolaly imunitní odpověď. Zvýšený počet zánětlivých buněk a prozánětlivých mediátorů v oblasti kloubu, má za následek úbytek kostní hmoty, destrukci chrupavky, zanícení kloubní výstelky a otok kloubního pouzdra (Benson et al. 2015). Tato onemocnění jsou nazývána autoimunitními onemocněními a příkladem může být revmatoidní artritida. Nejčastějšími typy artritidy spojené s autoimunitním zánětlivým stavem zahrnují zánětlivou artritidu, revmatoidní artritidu a psoriatickou artritidu (Buttgereit et al. 2015). Provedené *in vivo* a *in vitro* studie (Tab. 1) předkládají přesvědčivé důkazy, že při léčbě zánětlivých onemocnění kloubů hrají důležitou roli různé přírodní sloučeniny.

**Tabulka 1:** Vliv sloučenin rostlinného původu na zánětlivá onemocnění kloubů.

Botanický název	Čeleď	Použitá část	Účinná látka	Účinek	Zdroj
<i>Glycyrrhiza uralensis</i> (Lékořice uralská)	<i>Fabaceae</i> (Bobovité)	Kořen	Glycyrol	<i>In vivo</i> suprese kolagenem indukované artritidy <i>In vitro</i> snížení produkce zánětlivých mediátorů souvisejících se synoviálním zánětem	(Fu et al. 2014)
<i>Malus domestica</i> (Jabloň domácí)	<i>Rosaceae</i> (Růžovité)	Slupka	Ursolová kyselina	<i>In vitro</i> inhibice funkce monocytů	(Pádua et al. 2014)
<i>Saussurea heteromalla</i>	<i>Asteraceae</i> (Hvězdnicovité)	Celá rostlina	Chlorojanerin		(Saklani et al. 2012)

### Zánětlivá onemocnění pokožky

Zánětlivá onemocnění kůže jsou nejčastějšími dermatologickými onemocněními. Tato onemocnění zahrnují mnoho fyziologických stavů, od mírného svědění až po závažné zdravotní komplikace. Nejfrekventovanějšími onemocněními pokožky jsou atopická dermatitida a psoriáza. Běžně se vyznačují zarudnutím, vyrážkami, svěděním, otoky, puchýři a hnisavými kožními záněty (Miyagaki & Sugaya 2015). Pochopením buněčných a biochemických mechanismů, které se podílejí na zánětlivých onemocněních kůže, by bylo možné vyvinout účinnější lokální nebo injekční přípravky k léčbě těchto onemocnění (Maione et al. 2016). Příložená tabulka 2 uvádí rostliny, které vykazují tento terapeutický potenciál.

**Tabulka 2:** Vliv sloučenin rostlinného původu na zánětlivá onemocnění pokožky.

Botanický název	Čeleď	Použitá část	Účinná látka	Účinek	Zdroj
<i>Citrus unshiu</i> (Mandarinka unšiu)	<i>Rutaceae</i> (Routovité)	Plod	Citrusina XI	<i>In vitro</i> snížení produkce NO v LPS stimulované buněčné linii RAW 264,7	(Noh et al. 2015)
<i>Curcuma longa</i> (Kurkumovník dlouhý)	<i>Zingiberaceae</i> (Zázvorníkovité)	Oddenek	Kurkumin	Modulace narušení pokožky <i>in vivo/in vitro</i>	(Fang et al. 2003)
<i>Mangifera indica</i> (Mangovník indický)	<i>Anacardiaceae</i> (Ledvinovníkovité)	Plod	Mangiferin	<i>In vivo</i> inhibice produkce IgE	(Rivera et al. 2006)

### Kardiovaskulární onemocnění

Kardiovaskulární onemocnění jsou celosvětově hlavní příčinou úmrtí. Hlavním patologickým činitelem, který zapříčiňuje infarkt myokardu, cévní mozkové příhody a periferní cévní onemocnění je ateroskleróza. I když je role lipidů při rozvoji aterosklerózy dobře prostudována, zánět je považován za hlavní patologický rys ve vývoji tohoto onemocnění. Charakteristickým znakem jakéhokoliv vaskulárního ateromu nebo plaku, jsou makrofágy fagocytující modifikovaný cholesterol v částicích lipoproteinů. Předpokládá se, že apoptóza nadměrně zatížených makrofágů uvolňuje celou řadu zánětlivých mediátorů, které zhoršují tento zánětlivý proces (Feuerstein et al. 2007). V příložené tabulce 3 jsou uvedeny léčivé rostliny, o jejichž sloučeninách a způsobech jejich působení se předpokládá, že jsou účinné při léčbě kardiovaskulárních onemocněních souvisejících se záněty.

**Tabulka 3:** Vliv sloučenin rostlinného původu na kardiovaskulární onemocnění.

Botanický název	Čeleď	Použitá část	Účinná látka	Účinek	Zdroj
<i>Andrographis paniculata</i> (Právenka latnatá)	<i>Acanthaceae</i> (Paznehtíkovité)	Celá rostlina	Andrograpanin	<i>In vitro</i> inhibice produkce iNOS, TNF- $\alpha$ a IL-6	(Liu et al. 2008)
<i>Forsythia koreana</i> (Zlatice korejská)	<i>Oleaceae</i> (Olivovníkovité)	Plod	Phylligenin	<i>In vitro</i> inhibice aktivity COX-2 a iNOS	(Lim et al. 2008)
<i>Schisandra sphenanthera</i> (Klanopraška oranžová)	<i>Schisandraceae</i> (Klanopraškovité)	Plod	Schinsantheria A	<i>In vitro</i> inhibice produkce NO, IL-6 a TNF- $\alpha$	(Ci et al. 2010)

### Další zánětlivá onemocnění

Nadměrné uvolňování prozánětlivých cytokinů a mediátorů z rezidentních plicních neutrofilů a eosinofilů způsobuje akutní poškození plic, hyperreaktivitu dýchacích cest a hypersekreci hlenu (Tomassetti et al. 2015). Dalším příkladem mohou být neurodegenerativní onemocnění související se zánětem. V centrálním nervovém systému, včetně mozku a míchy, jsou nejvýznamnější imunitní buňky zastoupeny mikroglie, které se aktivují v reakci na různé podněty a mají neuroprotektivní i neurotoxické účinky. Nicméně nekontrolovaná a nadměrná aktivace mikroglie často přispívá k rozvoji neurodegenerativních onemocnění zapříčiněných zánětem (Barrientos et al. 2015). Dalšími zánětlivými onemocněními, které jsou vyvolané nevyváženou produkcí prozánětlivých mediátorů a hyperinfiltrací leukocytů jsou zánětlivá onemocnění střev. Ulcerózní kolitida a Crohnova choroba jsou dvě nejčastější formy zánětlivých onemocnění střev a bývají označovány jako idiopatické střevní záněty (IBD). Farmakologické strategie vyvinuté v posledních letech byly soustředěny na monoklonální protilátky zaměřené na prozánětlivé cytokiny a adhezni molekuly, které regulují infiltraci leukocytů do střevní sliznice (Maione et al. 2016). IBD představují chronická zánětlivá onemocnění střev, která se mohou projevovat jako Crohnova choroba (CD) nebo ulcerózní kolitida (UC). UC se projevuje jako nespecifický hemoragicko-katarální nebo ulcerózní zánět tlustého střeva a konečníku. Naproti tomu CD může postihovat jakoukoliv část gastrointestinálního traktu (GIT) a je obvykle transmurální (Kumar et al. 2014). IBD vznikají v důsledku dysfunkční interakce mezi bakteriální mikroflórou ve střevě a slizničním imunitním systémem. Normální stav imunologické tolerance vůči mikrobiálním antigenům v GIT je narušen buď přítomností dysregulované populace T buněčných efektorů sliznice, která nepřiměřeně reaguje na obvyklé mikrobiální antigeny, případně přítomností defektní populace regulačních T-buněk sliznice, která nedostatečně reaguje na obvyklé mikrobiální antigeny tak, že ani normální efektorové T-buňky nejsou korektně modulovány (Bouma & Strober 2003). Existuje několik možných faktorů, které hrají roli při vzniku IBD. Ačkoliv se tyto onemocnění liší svými klinickými příznaky, sdílejí stejnou etiologii. Předpokládá se, že za vznikem IBD stojí kombinace genetických predispozic, enviromentálních rizikových faktorů a změn střevního mikrobiomu. Mezi enviromentální rizikové faktory, které přispívají v prevalenci těchto onemocnění můžeme zařadit vliv životního stylu, gastrointestinální infekční onemocnění, užívání některých léčiv, stres, kouření a v neposlední řadě také vliv stravy (Long & Ponder 2013). V současnosti je střevní mikrobiota přijímána jako stěžejní etiologický faktor v patogenezi IBD (Denson et al. 2013). Předpokládá se, že první rok života je kritickým časovým obdobím pro vývoj mikrobiomu jedince a potencionálně napomáhá určit, zda dojde

k udržení homeostázy nebo rozvoji IBD. Jako důležité se ukázalo, že epigenetické účinky zprostředkované bakteriemi na slizniční imunitní systém v raném věku ovlivňují vývoj imunologicky zprostředkovaného onemocnění v dospělosti (Olszak et al. 2012). Dalším faktorem, který může být zodpovědný za rozvoj IBD je tzv. hygienická hypotéza. Tato hypotéza ve své podstatě navrhuje, že „čistší“ prostředí s nižší mírou infekčních činitelů je spojováno s vyšší prevalencí IBD a naopak méně „čisté“ prostředí má protektivní vliv v rozvoji těchto onemocnění (Long & Ponder 2013).

Léčivé rostliny, které byly zkoumány v *in vivo* a *in vitro* studiích a představují potenciální terapeutické látky v léčbě těchto zánětlivých onemocněních, jsou uvedeny v tabulce 4.

**Tabulka 4:** Vliv sloučenin rostlinného původu na zánětlivá onemocnění <sup>a</sup> plic, <sup>b</sup> centrálního nervového systému a <sup>c</sup> gastrointestinálního systému.

Botanický název	Čeleď	Použitá část	Účinná látka	Účinek	Zdroj
<sup>a</sup> <i>Eriobotrya japonica</i> (Lokvát japonský)	<i>Rosaceae</i> (Růžovité)	Listy	Ursolová kyselina	<i>In vitro</i> inhibice IL-8 a iNOS	(Lee et al. 2008)
<sup>a</sup> <i>Psoralea corylifolia</i> (Dětelník lískolistý)	<i>Fabaceae</i> (Bobovité)	Semena	Psoralidin	<i>In vitro</i> a <i>In vivo</i> inhibice aktivity COX-2 a 5-LOX	(Yang et al. 2011)
<sup>b</sup> <i>Cratoxylum formosum</i>	<i>Hypericaceae</i> (Třezalkovité)	Listy	Formosumon A	<i>In vitro</i> inhibice produkce NO v BV2 buněčné linii	(Xiong et al. 2014)
<sup>b</sup> <i>Olea europea</i> (Olivovník evropský)	<i>Oleaceae</i> (Olivovníkovité)	Plod	Masklinová kyselina	<i>In vitro</i> protizánětlivé efekty na kortikální astrocyty	(Huang et al. 2011)
<sup>c</sup> <i>Commiphora mukul</i> (Myrhovník mukul)	<i>Burseraceae</i> (Březulovité)	Pryskyřice	Guggulsteron	<i>In vitro</i> a <i>In vivo</i> regulace intestinálních efektorových T-buněk	(Mencarelli et al. 2009)
<sup>c</sup> <i>Dumortiera hirsuta</i>	<i>Marchantiaceae</i> (Porostnicovité)	Stélka	Riccardin D	<i>In vivo</i> inhibice intestinálního adenomu u myši	(Liu et al. 2012)

### 3.2.7 Vliv stravy na zánětlivá onemocnění

O některých potravinách je známo, že mají silné účinky na zánětlivé reakce v těle. Pečlivý výběr potravin, které mají protizánětlivou povahu, společně s omezením konzumace potravin, které působí zánětlivě je ústředním prvkem protizánětlivé diety (Ricker & Haas 2017).

#### Sacharidy

Jedním z hlavních stravovacích faktorů negativně ovlivňujících zánět je spotřeba rafinovaných sacharidů a sacharidů s vysokou glykemickou náloží. Pravidelná konzumace sacharidů s vysokou glykemickou náloží má za následek chronickou hyperglykémii, která prostřednictvím různých mechanismů zvyšuje produkci volných radikálů a prozánětlivých cytokinů. Ve snaze snížit hladinu glukózy v krvi vylučuje pankreas inzulín, kromě toho, že vylučuje glukózu z krevního oběhu, působí inzulín na enzymy  $\delta$ -6 a  $\delta$ -5 desaturáza, které regulují přeměnu linolové kyseliny na arachidonovou kyselinu. Čím vyšší je tedy inzulínová odpověď na vysokou glykemickou nálož, tím více arachidonové kyseliny je produkováno. Za

zmínku stojí glukagon, který má inhibiční účinek na desaturázové enzymy, čímž dochází ke snížení produkce arachidonové kyseliny (Ricker & Haas 2017).

## **Tuky**

Dalším důležitým aspektem přispívajícím k zánětu je hladina konzumovaných N-3 a N-6 mastných kyselin (MK). Obecně jsou N-3 MK považovány za protizánětlivé, zatímco N-6 MK jsou považovány za prozánětlivé. Ačkoliv jsou obě tyto skupiny MK esenciálními živinami pro lidský organismus, je to právě jejich nevyvážený poměr ve stravě, který pravděpodobně způsobuje zdravotní komplikace související se záněty (Simopoulos 2016a). Nicméně přesný poměr podporující zánět není znám, předpokládá se, že poměr N-6 : N-3 MK vyšší než 10 : 1 je považován za prozánětlivý faktor (Simopoulos 2016b). Kyselina linolová (N-6 MK) slouží jako prekurzor řady prozánětlivých eikosanoidů produkovaných kyselinou arachidonovou. Výsledkem je, že čím více N-6 MK je ve stravě konzumováno, tím vyšší je riziko výskytu zánětlivých onemocnění. Naopak N-3 MK vykazují mnoho protizánětlivých účinků. Na rozdíl od účinku inzulínu, jak bylo uvedeno v předchozí kapitole, N-3 MK inhibují enzym  $\delta$ -6 desaturáza a tím snižují produkci arachidonové kyseliny. Jakmile dojde k produkci arachidonové kyseliny, N-3 MK mohou nepřímo omezit tvorbu prozánětlivých eikosanoidů, tím že dochází ke kompetici s arachidonovou kyselinou o prostor ve fosfolipidové dvojvrstvě buněčných membrán (Ibarguren et al. 2014). Zároveň mohou N-3 MK zmírnit již existující zánět tím, že přispívají k produkci protizánětlivých eikosanoidů, známých jako resolviny (Levy 2010).

Kromě množství a poměru konzumovaných polynenasycených mastných kyselin má vliv na výskyt zánětlivých onemocnění také konzumace trans nenasycených mastných kyselin. Trans nenasycené mastné kyseliny se vyskytují v mase a mléce přežvýkavců a zároveň se vyskytují v potravinách vyrobených z částečně hydrogenovaných rostlinných olejů (Ricker & Haas 2017). V provedených studiích byla konzumace trans nenasycených mastných kyselin spojována se zvýšenými zánětlivými markery, zahrnující TNF, CRP (Baer et al. 2004; Mozaffarian & Clarke 2009; Mazidi et al. 2017) a IL-6 (Lopez-Garcia et al. 2005).

## **Energetický příjem**

Kromě vlivu uvedených skupin makroživin, chronický zánět je také ovlivněn kalorickým příjmem. Nadměrný kalorický příjem, zejména u jedinců, kteří nemají dostatečnou fyzickou aktivitu vede ke zvýšené adipozitě. Tuková tkáň je metabolicky aktivní tkáň, která přímo přispívá k rozvoji chronického zánětu uvolňováním prozánětlivých cytokinů, včetně TNF- $\alpha$  a IL-6. Během růstu adipocytů hrozí vznik zánětu v důsledku infiltrace a aktivace makrofágů, které produkují další zánětlivé cytokiny. V důsledku nadměrné tukové tkáně dochází k řadě dalších prozánětlivých změn, včetně zvýšené inzulínové rezistence a aktivace sympatického nervového systému (Ricker & Haas 2017).

Na rozdíl od nadměrného kalorického příjmu bylo u obézních pacientů prokázáno, že snížení jejich kalorického příjmu s dostatečným zastoupením makronutrientů vykazuje důležité protizánětlivé účinky. Redukce počtu adipocytů v těle snižuje hladinu prozánětlivých adipokinů a cytokinů. Redukce adipocytů vede také ke zlepšení citlivosti tkání na inzulín a snížení hladiny glukózy v plazmě, čímž snižuje produkci konečných produktů pokročilé glykace. Snížení produkce koncových produktů pokročilé glykace tlumí aktivaci drah, které by jinak

podporovaly expresi adhezních molekul a chemokinů, indukovaly oxidační stres a uvolňovaly zánětlivé cytokiny (Ricker & Haas 2017).

### **Protizánětlivá dieta**

Přes rostoucí povědomí o přínosech protizánětlivé stravy na lidské zdraví, neexistuje jednotná definice, která by protizánětlivou dietu definovala (Ricker & Haas 2017). Nedávné výzkumy navrhuji, že jako vhodná protizánětlivá dieta se jeví tzv. středomořská dieta (Esposito et al. 2004) a okinawská dieta (Willcox et al. 2009). Výsledkem je, že nejčastěji používaná definice protizánětlivé stravy v současné době zahrnuje kromě doporučení pro vyvážení poměrů makronutrientů i aspekty středomořské diety a okinawské diety (Ricker & Haas 2017). Středomořská dieta se vyznačuje vyšší konzumací zeleniny, ovoce, ryb, olivového oleje a přiměřenou konzumací červeného vína. Okinawská dieta je podobná té středomořské, liší se nižším celkovým příjmem tuků a nižší konzumací červeného masa a mléčných výrobků (Willcox et al. 2009). Naopak typická západní dieta, zahrnuje vyšší konzumaci červeného masa, jednoduchých sacharidů a nižší konzumaci ryb, zeleniny a ovoce, než je tomu u středomořské či okinawské diety (Grotto & Zied 2010).

Protizánětlivá dieta je z velké části tvořena ovocem a zeleninou. Zelenina a ovoce mají nižší energetickou a jsou bohaté na určité skupiny živin, včetně vitamínů, minerálů a fytonutrientů, jako jsou rostlinné fenolové sloučeniny, které působí protizánětlivě. V ideální protizánětlivé stravě tvoří rostlinná složka více jak polovinu kalorického denního příjmu (Sears 2015). Bylo prokázáno, že strava bohatá na ovoce a zeleninu koreluje s nižšími hladinami zánětlivých markerů v krvi (Esmailzadeh et al. 2006; Nanri et al. 2007).

Proteiny by v protizánětlivé dietě měly být primárně rostlinného původu, doplněné o vhodné druhy ryb a malé množství libového masa. Živočišné bílkoviny obsahují značné množství N-6 MK, nicméně protizánětlivá dieta by měla zahrnovat zdroje bílkovin obsahující vyšší množství N-3 MK (Ricker & Haas 2017). Z tohoto důvodu by měla být věnována zvláštní pozornost vhodnému výběru zdrojů živočišných bílkovin. Je doporučena konzumace ryb, jako je například losos, makrela, halibut či sled, přičemž by měl být brán zřetel, aby se jednalo o ryby volně ulovené, které obsahují vyšší množství N-3 MK než ryby pocházející z farem (Van Vliet & Katan 1990). Podobně jako výběr vhodných ryb, tak i výběr vhodného masa má svá specifika. Maso pocházející z ekologického chovu má nižší poměr N-6 : N-3 MK ve srovnání s chovem konvenčním (Daley et al. 2010). Ačkoliv protizánětlivá dieta umožňuje konzumaci některých živočišných bílkovin, měly by v této dietě převažovat bílkoviny rostlinného původu. Vhodnými zdroji rostlinných bílkovin jsou zejména sójové boby a potraviny z nich připravované, jako je například tempeh nebo tofu. Fytonutrienty, proteiny a vhodné složení MK v sójových bobech přispívají k jejich protizánětlivému účinku. Bylo prokázáno, že konzumace sóji souvisí s poklesem zánětlivých markerů, jako je IL-6, TNF- $\alpha$  a CRP (Wu et al. 2012; Nicastro et al. 2013).

## **3.3 Alkaloidy**

### **3.3.1 Charakteristika**

Alkaloidy jsou skupinou přirozeně se vyskytujících organických látek, které jsou produkovány různými organismy včetně rostlin, bakterií, hub a živočichů. Výzkum alkaloidů byl zahájen Friedrichem Wilhelmem Sertürnerem, který jako první dokázal izolovat alkaloid

z přírodního produktu, konkrétně se jednalo o alkaloid morfin. Autorem první definice alkaloidů byl německý farmaceut Dr. Karl Wilhelm Meißner, který jako první v roce 1819 představil termín alkaloid. Alkaloidy definoval jako látky získané z rostlin, které reagují jako alkálie. Od té doby byla definice termínu alkaloid několikrát pozměněna a v současné době je nejrozšířenější definice, že termín alkaloid představuje přirozeně vyskytující se organické sloučeniny obsahující dusík, které mají větší nebo menší stupeň zásaditosti (Hesse 2002; Aniszewski 2015).

Alkaloidy představují jednu z nejrozmanitějších tříd sekundárních metabolitů. Jsou syntetizovány specifickými metabolickými cestami, které zahrnují prekurzory aminokyselin a vykazují široké spektrum farmakologických aktivit (Wink & Roberts 1998). Alkaloidy vznikají jako sekundární metabolity rostlin a slouží především k jejich ochraně před býložravci a patogeny. Dále alkaloidy v rostlinách působí jako atraktanty pro opylovače, růstové regulátory, případně jako zásoby dusíku (Waller & Nowacki 1978; Ahmed et al. 2017).

Alkaloidy lze klasifikovat podle jejich biologické a ekologické aktivity, chemické struktury nebo biosyntézy.

Z hlediska biologické aktivity je možné alkaloidy rozdělit na neutrální nebo slabě bazické molekuly, živočišné alkaloidy, mořské alkaloidy, alkaloidy přítomné v houbách nebo mechových porostech, bakteriální alkaloidy a nepřirozeně vyskytující se alkaloidy, které jsou buď strukturně modifikované nebo se jedná o jejich analogy. V návaznosti na mnohé farmakologické výzkumy se skupina nepřirozeně vyskytujících alkaloidů velmi rychle rozrůstá. Tento trend je nezbytný z důvodu infekčních onemocnění, které jsou vyvolány mikroorganismy, které se stávají rezistentními vůči komerčně dostupným antibiotikům). Dále mohou být alkaloidy klasifikovány čistě podle jejich chemické struktury směřující na jejich alkaloidový základ a lze je rozdělit na alkaloidy akridinové, aromatické, imidazoly, indoly, chinony, chinoliny, isochinoliny, piperidiny, puriny, pyrolidiny, terpenoidy a další.

Podle způsobu biosyntézy alkaloidů, můžeme alkaloidy rozdělit na pravé alkaloidy, protoalkaloidy a pseudoalkaloidy. Pravé alkaloidy jsou sloučeniny, které jsou odvozené od aminokyselin a mají heterocyklickou strukturu, která obsahuje dusík. Jedná se o vysoce reaktivní látky, které vykazují biologickou aktivitu v nízkých dávkách. Pravé alkaloidy se vyznačují hořkou chutí, jedná se bílé pevné látky s výjimkou nikotinu, který tvoří hnědou kapalinu. V rostlinách se mohou vyskytovat ve volném stavu, jako soli nebo jako N-oxidy. Primárními prekurzory pravých alkaloidů jsou aminokyseliny, jako je například L-ornitin, L-lysin, L-fenylalanin, L-tyrosin, L-tryptofan a L-histidin. Mezi zástupce se řadí atropin, dopamin, chinin, morfin, nikotin a kokain. Protoalkaloidy jsou sloučeniny obsahující dusík odvozené od aminokyselin, který není součástí heterocyklu. Tyto alkaloidy jsou odvozeny od L-tyrosinu a L-tryptofanu. Mezi představitele této skupiny se řadí adrenalin a efedrin. Pseudoalkaloidy jsou sloučeniny, které nemají jejich základní uhlíkový skelet odvozen od aminokyselin. Jsou odvozeny od prekurzorů a postkurzorů aminokyselin. Zástupci pseudoalkaloidů jsou kofein, theobromin a kapsaicin (Aniszewski 2015; Roy 2017).

### 3.3.2 Biologická aktivita alkaloidů

Všeobecně jsou alkaloidy považovány za velmi toxické látky, nicméně jejich biologický účinek je závislý na velikosti dávky a délce jejich příjmu. V nízkých a předem určených dávkách působí alkaloidy jako léčiva.



Čisté, izolované rostlinné alkaloidy a jejich syntetické deriváty jsou využívány jako léčivé přípravky po celém světě pro své analgetické, antispasmodické a baktericidní účinky (Roy 2017). V uplynulých letech byla věnována také značná pozornost alkaloidům v souvislosti s jejich možným protizánětlivým působením. Studie Ratheesh et al. (2013) zkoumala protizánětlivé působení chinolinového alkaloidu skimmianinu, který byl izolován z routy vonné (routovité), *Ruta graveolens* (Rutaceae). V této studii byla protizánětlivá aktivita skimmianinu zkoumána pomocí otoku krysích tlapek indukovaného karagenanem, jako pozitivní kontrola byl použit diclofenac (20 mg/kg), který je komerčně využíván jako NSA. Skimmianin byl použit v různých koncentracích, konkrétně 1,0 mg/kg, 2,5 mg/kg, 5,0 mg/kg, 7,5 mg/kg a 10,0 mg/kg. Z výsledků měření otoku tlapek je patrné, že minimální koncentrace skimmianinu, která maximálně inhibovala otok byla 5,0 mg/kg, tato koncentrace se jevila značně účinnější v inhibici otoku než diclofenac. Po provedení analýzy otoku byly následně krysy usmrceny, aby mohly být tlapy a krev dále analyzovány. Výsledky provedených analýz prokázaly snížení mRNA hladin TNF- $\alpha$  a IL-6, které stojí na začátku zánětlivé reakce. Dále bylo zjištěno snížení hladiny NO a PGE<sub>2</sub> a snížení aktivit COX-2 a 5-LOX. Z výsledků této studie lze považovat skimmianin za perspektivní terapeutickou látku v léčbě mnohých zánětlivých onemocněních. Další studie provedená Andreicuț et al. (2018) se zaměřila na protizánětlivou aktivitu alkaloidů, které byly izolovány z kůry mahónie cesmínolisté (dřišťálovité), *Mahonia aquifolium* (Berberidaceae). Etanolové extrakt kůry obsahoval alkaloidy: berbamin, berberin, jatrorrhizin a palmatin. Zánětlivá reakce byla u laboratorních krys indukována pomocí terpentýnového oleje, který vyvolal produkci zánětlivých cytokinů a NO. Etanolové extrakty byly laboratorním krysám podávány orálně po dobu sedmi dní před vyvoláním zánětlivé reakce, v množství 1 ml a ve třech různých koncentracích (100%, 50% a 25%). Jako pozitivní kontrola byl v této studii použit diclofenac (10 mg/kg). Protizánětlivá aktivita byla v této *in vivo* studii stanovována inhibicí produkce NO a TNF- $\alpha$ . Etanolové extrakty o koncentraci 50% a 25% vykazovaly srovnatelný účinek v porovnání s diclofenacem v inhibici NO, avšak tyto extrakty vykazovaly slabou inhibiční aktivitu vůči TNF- $\alpha$ . Fujii et al. (2017) se zabývali protizánětlivým působením metanolového extraktu kůry korkovníku amurského (routovité), *Phellodendron amurense* (Rutaceae). V metanolovém extraktu byl identifikován isochinolinový alkaloid berberin a limonoidy limonin a obakunon, které byly následovně separovány. V této studii byla protizánětlivá aktivita stanovována pomocí monitorování inhibice produkce NO hepatocyty, které byly stimulovány IL-1  $\beta$ . Z výsledků této studie vyplývá, že alkaloid berberin a použité limonoidy významně snižovaly produkci NO. Alkaloidy mají celou řadu farmakologických účinků (Tab. 5).

**Tabulka 5:** Vybrané alkaloidy a jejich farmakologické účinky.

Alkaloid	Rostlina	Čeď	Účinek	Zdroj
Ajmalin	<i>Rauwolfia verticillata</i>	<i>Apocynaceae</i> (Toješťovitě)	Antiarytmický, anti-proliferační aktivita	(Yang et al. 2018)
Anisodamin	<i>Anisodus tanguticus</i> (Pablen tangutský)	<i>Solanaceae</i> (Lilkovitě)	Cholinolytický	(Zhang et al. 2018)
Berberin	<i>Coptis chinensis</i> (Koptis čínský)	<i>Ranunculaceae</i> (Pryskyřníkovité)	Antilipidemický	(Fang et al. 2018)
Chinin	<i>Cinchona</i> (Chinovník)	<i>Rubiaceae</i> (Mořenovitě)	Antimalarikum	(Wen et al. 2018)
Efedrin	<i>Ephedra sinica</i> (Chvojník)	<i>Ephedraceae</i> (Chvojníkovité)	Stimulace srdeční kontraktility	(Wang et al. 2018a)
Kofein	<i>Coffea arabica</i> (Kávovník arabský)	<i>Rubiaceae</i> (Mořenovitě)	Stimulace CNS	(Wang et al. 2018b)
Morfin	<i>Papaver somniferum</i> (Mák setý)	<i>Papaveraceae</i> (Makovitě)	Analgetikum	(Kong et al. 2018)

V historii byly rostliny obsahující alkaloidy používány v tradičním lidovém léčitelství po celém světě (Roy 2017). Využíváno bylo velké množství rostlin z různých čeledí, například *Capparidaceae* (kaparovitě), *Rutaceae* (routovitě), *Berberidaceae* (dřišťálovité) či *Amaryllidaceae* (amaryllkovité) (Aniszewski 2015), kterým je v současnosti věnována značná pozornost zejména díky jejich protinádorovým účinkům (Nair & van Staden 2014) a také díky schopnosti inhibovat acetylcholinesterázu (Ding et al. 2017).

### 3.4 Čeď Amaryllidaceae

Rostliny čeledi *Amaryllidaceae* (Amaryllkovité) jsou víceleté, jednoděložné rostliny, které se stávají ze 3 podčeledí (*Agapanthoideae*, *Allioideae*, *Amaryllidoideae*) a přibližně z 1100 druhů v 75 rodech (Berkov et al. 2012). Čeď *Amaryllidaceae* je hojně rozšířena v tropických, subtropických a teplých oblastech světa, včetně Jižní Ameriky, Středomoří a Jižní Afriky (Nair et al. 2013). Rostliny z čeledi *Amaryllidaceae* je možno nalézt i v České republice, jedná se zejména o zástupce v podobě narcisů (*Narcissus*), bledulí (*Leucojum*) a sněženek (*Galanthus*) (Chase et al. 2009). Po celá staletí se rostliny z čeledi *Amaryllidaceae* pěstují nejen jako okrasné rostliny obsahující éterické oleje a mající krásně barevné květy, ale zejména také pro své využití v lidové medicíně proti různým chorobám. Tradičně byly různé druhy této čeledi využívány při léčbě zánětů, onemocnění oběhové soustavy a neurologických onemocnění. Farmakologický účinek rostlin z čeledi *Amaryllidaceae* je připisován přítomnosti alkaloidů odvozených od aminokyseliny tyrosinu, které jsou produkovány právě rostlinami této čeledi. Tyto alkaloidy mají nejen cytotoxické a antivirové účinky, ale také mnoho dalších fyziologických účinků, jako je například inhibice acetylcholinesterázy, protizánětlivá aktivita a antibakteriální účinky (Jin 2005).

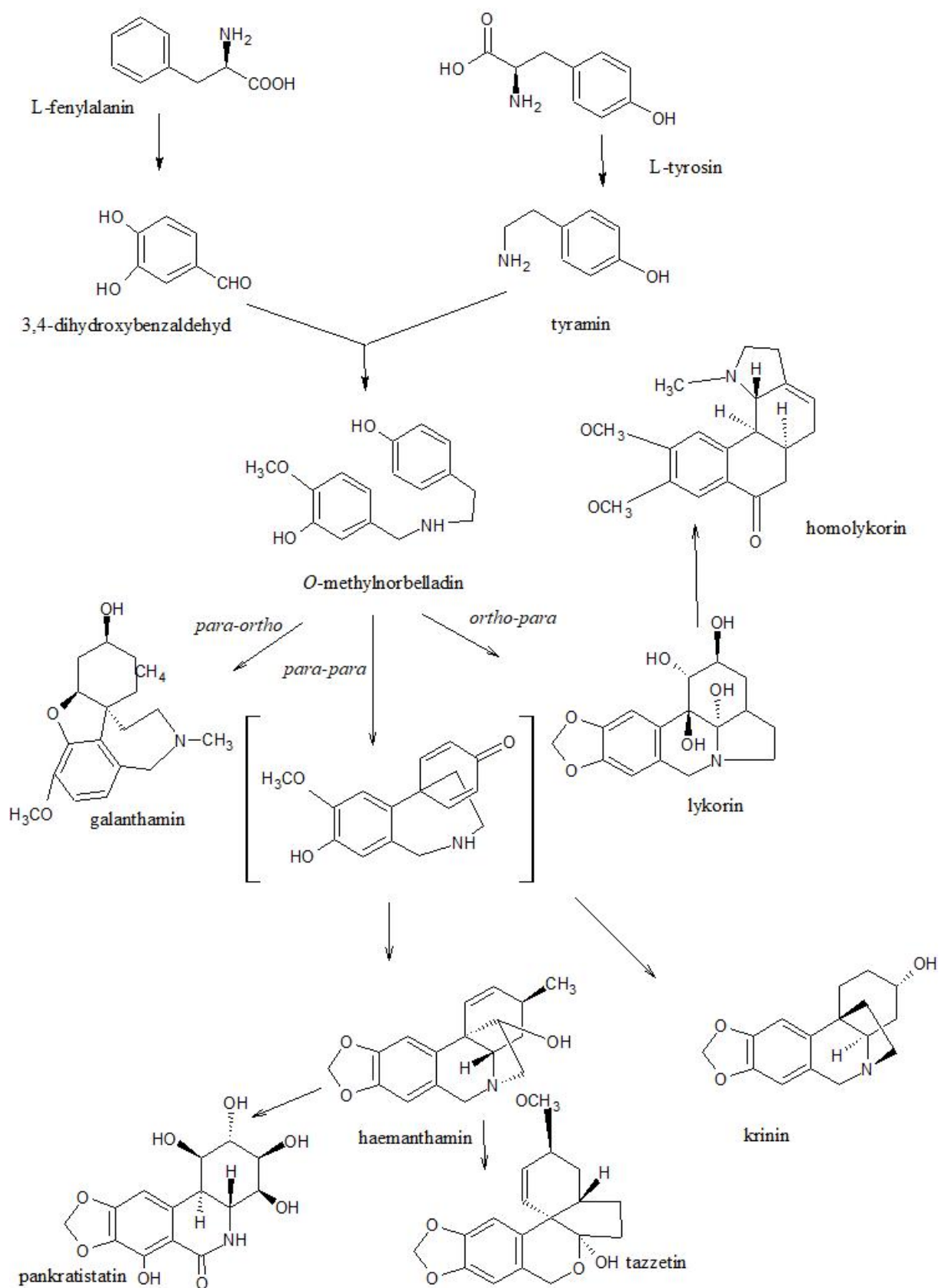
#### 3.4.1 Alkaloidy čeledi *Amaryllidaceae*

V současnosti je známo na 20 000 druhů alkaloidů, které jsou převážně rostlinného původu. Alkaloidy čeledi *Amaryllidaceae* patří do početné skupiny isochinolinových alkaloidů, isochinolinové alkaloidy se společně s indolovými alkaloidy se řadí mezi dvě největší skupiny alkaloidů. Prvním izolovaným alkaloidem z rostlin čeledi *Amaryllidaceae* byl v roce 1877 Lykordin z rostliny *Narcissus pseudonarcissus*. Do dnes bylo identifikováno na 600 alkaloidů

pocházející z rostlin čeledi *Amaryllidaceae* a tento počet jistě není konečný (Desgagné-Penix 2020).

### **3.4.2 Biosyntéza alkaloidů čeledi *Amaryllidaceae***

Alkaloidy čeledi *Amaryllidaceae* jsou tvořeny biogeneticky intramolekulární oxidační vazbou norbelladinů, které jsou odvozeny od aminokyselin L-fenylalaninu a L-tyrosinu, tento proces bývá nazýván norbelladinová cesta (Obr. 4) (Kilgore & Kutchan 2016). Během tohoto procesu se L-tyrosin mění na tyramin a L-fenylalanin na 3,4-hydroxybenzaldehyd. Po několika reakčních stupních se z tyraminu a 3,4-hydroxybenzaldehydu stává 4'-*O*-methylnorbelladin. V závislosti na způsobu oxidační cyklizace 4'-*O*-methylnorbelladinu vzniká osm elementárních strukturních typů amarylkovitých alkaloidů. Jednotlivé strukturní typy jsou pojmenovány podle svého hlavního zástupce: lykorinový typ (lykorin), homolykorinový typ (homolykorin), krininový typ (krinin), haemanthaminový typ (haemanthamin), galanthaminový typ (galanthamin), tazettinový typ (tazettin) a pankratistatinový typ (pankratistatin). Mezi další významné strukturní typy patří norbelladinový typ (belladin), ze kterého vycházejí všechny ostatní strukturní typy a montaninový typ (montanin), ale biosyntetická cesta vedoucí ke vzniku tohoto typu alkaloidů není prozatím zcela objasněna (Steglich et al. 2000; Bastida et al. 2006).



**Obr. 4:** Biosyntéza alkaloidů čeledi *Amaryllidaceae*. Upraveno dle Dalecká et al. (2013).

### 3.4.3 Základní strukturní typy *Amaryllidaceae* alkaloidů

#### Lykorinový typ

Alkaloidy patřící do této skupiny jsou deriváty pyrrolo[de]fenantridinu, který vzniká *ortho-para* oxidativním spojením *O*-methylnorbelladinu. Hlavní zástupce je alkaloid lykorin, který byl vůbec prvním izolovaným alkaloidem z čeledi *Amaryllidaceae*, roku 1877 z rostliny *Narcissus pseudonarcissus* (Narcis žlutý) a jeho struktura byla poprvé popsána v roce 1956 (Dalecká et al. 2013). Mezi další zástupce alkaloidů lykorinového typu patří například 1-*O*-acetyllykorin, pseudolykorin, lykoren, galanthin, norpluvin nebo amarbellisin (Evidente et al. 2009). Mezi zástupce rostlinných zdrojů obsahující lykorinový typ alkaloidů patří hned několik rodů, například *Ammocharis* (Machocho et al. 1999), *Crinum* (Refaat et al. 2012), *Galanthus*, *Leucojum*, *Narcissus* (Kintsurashvili & Vachnadze 2007) nebo *Lycoris* (Toriizuka et al. 2008).

#### Homolykorinový typ

Alkaloidy homolykorinového typu jsou strukturně odvozeny od 2-benzopyrano[3,4-*g*]indolu a stejně jako alkaloidy lykorinového typu vznikají oxidativní cyklizací *ortho-para* (Bastida Armengol et al. 2011). Hlavním představitelem alkaloidů tohoto typu je homolykorin, dále se do této skupiny řadí například lykorenin, masonin, hippeastrin, radiatrin, ungerin a odulin (Ramawat & Mérillon 2013). Tyto zástupce můžeme najít v rodech *Crinum* (Refaat et al. 2012), *Galanthus* (Berkov et al. 2012), *Narcissus*, *Leucojum* (Ramawat & Mérillon 2013) nebo *Hippeastrum* (Giordani et al. 2011).

#### Krininový a haemanthaminový typ

Alkaloidy krininového a haemanthaminového typu vznikají oxidativní cyklizací *para-para* a vycházejí ze stejného strukturního základu, jedná se o molekulu 5,10*b*-ethanofenantridinu. Společně s alkaloidy lykorinového typu se jedná o nejvíce rozšířené alkaloidy v rostlinách z čeledi *Amaryllidaceae* (Ramawat & Mérillon 2013). Hlavními zástupci jsou krinin a haemanthamin, mezi další zástupce patří ambellin, buphanisin, bulbispermin, flexinin, haemanthidin, krinamin, krinamidin, powellin, udulatin nebo vittatin (Refaat et al. 2012). Zástupce těchto amarylkovitých alkaloidů můžeme nalézt v rodech *Ammocharis* (Machocho et al. 1999), *Crinum* (Refaat et al. 2012), *Galanthus* (Bozkurt-Sarikaya et al. 2014), *Hippeastrum* (Giordani et al. 2011), *Nerine*, *Lycoris* (Ramawat & Mérillon 2013), *Narcissus* (Kornienko & Evidente 2008) nebo *Zephyranthes* (Herrera et al. 2001).

#### Tazzetinový typ

Tazzetinový strukturní typ zahrnuje alkaloidy, které jsou odvozeny od 2-benzopyrano[3,4-*c*]indolu, jejich základ je stejně jako u alkaloidů krininového a haemanthaminového typu odvozen od norbelladinu cyklizací typu *para-para* (Bastida Armengol et al. 2011). Hlavní zástupce této skupiny je tazzetin, který byl poprvé izolován v roce 1934 z rostliny *Narcissus tazetta* (Narcis taceta). Mezi další zástupce patří makronin, ornamin, ornazidin a kriwellin. Alkaloidy tazzetinové typu můžeme nalézt v rodech *Crinum* (Refaat et al. 2012), *Eucharis* (Ramawat & Mérillon 2013), *Galanthus*, *Hippeastrum*, *Leucojum* a *Narcissus* (Berkov et al. 2014).

## Pankratistatinový typ

Alkaloidy tohoto typu jsou odvozeny od fenanthridinu a vznikají podobně jako alkaloidy haemanthaminového či krininového typu cyklizací *para-para* (Bastida Armengol et al. 2011). Hlavním zástupcem je pankratistatin, který byl poprvé izolován z cibule *Hymenocallis littoralis* (lilie havajská), dalšími zástupci jsou například narcisklasin, trisferidin nebo bikolorin (Kornienko & Evidente 2008; Berkov et al. 2010).

## Galanthaminový typ

Pro alkaloidy galanthaminového strukturního typu je typické dibenzofuranové jádro a vznikají *para-ortho* oxidativním spojením (Bastida Armengol et al. 2011). Hlavním představitelem je galanthamin, tento alkaloid byl izolován poprvé v roce 1952 z rostliny *Galanthus wonowii* (sněžinka Woronova) (Krejčová & Ševelová 2003). Další představitele, které můžeme zařadit do této skupiny jsou norgalanthamin, narcisin, chlidantin, sanguinin, norlykoramin či leukoverin (Ramawat & Mérillon 2013). Mezi zástupce patří rody *Amaryllis*, *Crinum*, *Galanthus*, *Hippeastrum*, *Leucojum*, *Lycoris*, *Narcissus* či *Zephyrantes* (Kintsurashvili & Vachnadze 2007; Berkov et al. 2009).

### 3.4.4 Biologická aktivita alkaloidů čeledi *Amaryllidaceae*

Alkaloidy izolované z rostlin čeledi *Amaryllidaceae* vykazují celou škálu biologických aktivit, včetně antibakteriálních, antifungálních, antimalarických, antivirových, analgetických a protizánětlivých, které se odvíjejí od jejich strukturního a prostorového uspořádání. Dále vynikají výraznou protinádorovou aktivitou. Jejich předností je selektivita k nádorovým buňkám a relativně nízká toxicita vůči buňkám zdravým. V neposlední řadě mají schopnost inhibovat acetylcholinesterázu, z čehož vyplývá jejich využití v terapii Alzheimerovy choroby. (Dalecká et al. 2013; Jin & Yao 2019).

Alzheimerova choroba (AD) je nejčastější příčinou vzniku demence postihující starší populaci a je jednou z deseti nejčastějších příčin úmrtí na celém světě (Jin & Yao 2019). Jedná se neurodegenerativní onemocnění související s věkem a poruchou paměti. Cholinergní hypotéza Alzheimerovy choroby předpokládá, že poruchy paměti u pacientů s touto chorobou jsou podmětem pro léčbu zaměřenou na zlepšení cholinergní funkce v průběhu Alzheimerovy choroby (Guillou et al. 2000). Inhibitory acetylcholinesterázy (AChE), enzymu, který se podílí na metabolické hydrolyze acetylcholinu (ACh) u cholinergních synapsích podporují zvýšení koncentrace a trvání synaptické akce ACh, čímž slouží jako terapeutická látka v léčbě AD. Alkaloid galanthamin je vysoce účinný při inhibici AChE ( $IC_{50} = 1 \mu M$ ), který byl schválen pro klinickou léčbu AD v Evropské unii a USA (Houghton et al. 2006). Dále galanthamin stimuluje presynaptické a postsynaptické nikotinové receptory, které mohou zvyšovat uvolňování neurotransmiterů a přímo tak stimulovat funkci neuronů. Zároveň přichází v úvahu, že by stimulace nikotinových receptorů chránila před apoptózou vyvolanou toxicitou  $\beta$ -amyloidu, což z galanthaminu dělá slibného kandidáta pro léčbu onemocnění nervového systému (Ding et al. 2017). Vzhledem ke komerčnímu úspěchu galanthaminu je zřejmé, že rostliny z čeledi *Amaryllidaceae* vyvolávají značný zájem vědeckých kolektivů, vedoucí k objevu nových terapeutických látek (Nair et al. 2011). Dalšími alkaloidy z této čeledi, které mohou být využity jako inhibitory AChE s opravdovým potenciálem pro klinické využití je například alkaloid sanguinin ( $IC_{50} = 0,1 \mu M$ ) a 1-*O*-acetyllykorin ( $IC_{50} = 0,96 \mu M$ ) (Nair & van Staden 2012).

Alkaloidy z čeledi *Amaryllidaceae* jsou z farmakologického hlediska významné také zejména pro své protinádorové působení. Mnohé studie zabývající se protinádorovým působením amarylkovitých alkaloidů zjistili, že tyto alkaloidy působí cytotoxicky (Ang et al. 2015; Carvalho et al. 2015; Liu et al. 2015), cytostaticky (Lamoral-Theys et al. 2009) a antiproliferativně (Masi et al. 2015; Presley et al. 2016) na nádorové buňky. Účinek lykorinu proti lidské leukemické buněčné linii HL-60 spočívá v potlačení růstu buněk a snížení přežití buněk zastavením buněčného cyklu ve fázi G2/M a indukci apoptózy nádorových buněk (Nair & van Staden 2014). Byly také studovány možné mechanismy inhibičních účinků lykorinu na buněčnou linii lidského mnohočetného myelomu KM3. Rychlost růstu buněk KM3 se zjevně zpomalila v důsledku podání lykorinu, dále byly detekovány buněčné fluorescenční apoptotické morfologické změny a fragmenty degradace DNA, což naznačuje výskyt buněčné apoptózy po ošetření lykorinem (Liu et al. 2007). Studie Van Goietsenoven et al. (2010) zkoumala antiproliferativní vlastnosti amarylkovitých alkaloidů, jako je například haemanthamin, haemanthidin, amarbellisin, lykorin a pseudolykorin proti šesti odlišným buněčným liniím rakoviny, včetně A549, OE21, Hs683, U373, SKMEL a B16F10. Alkaloidy haemanthamin, haemanthidin, amarbellisin, lykorin vykazovaly cytostatickou aktivitu, přičemž pseudolykorin vykazoval cytotoxické účinky. Výsledky této studie naznačují, že vybrané alkaloidy rostlin z čeledi *Amaryllidaceae* by mohly být potenciálními terapeutickými látkami v léčbě nádorových onemocněních.

Mezi další biologické účinky amarylkovitých alkaloidů se řadí antibakteriální a antifungální účinky. Provedená studie vědeckým kolektivem (Evidente et al. 2004) se zabývala antimikrobiální aktivitou alkaloidů pocházejících z cibule rostliny *Amaryllis belladonna* L. (Amarylka spanilá). V rámci této studie byly izolovány alkaloidy, jako je amarbellisin, který byl prvně izolován právě z *Amaryllis belladonna* L., lykorin, pankracin, vittatin a 11-hydroxyvittatin. Všechny tyto alkaloidy prokázaly antimikrobiální aktivitu v diskovém difúzním testu. Alkaloidy amarbellisin, pankracin, vittatin a 11-hydroxyvittatin vykazovaly antibakteriální aktivitu proti Grampozitivní bakterií *Staphylococcus aureus*. Antibakteriální aktivitu vůči gramnegativní bakterii *Escherichia coli* vykazoval amarbellisin a vittatin. Všechny izolované alkaloidy z *Amaryllis belladonna* L. vykazovaly antifungální aktivitu proti *Candida albicans*, zejména pak lykorin (MIC = 39 µg/ml), amarbellisin (MIC = 63 µg/ml) a vittatin (MIC = 31 µg/ml). Cheesman et al. (2012) ve své studii identifikovali alkaloidy buphanidrin a distichamin pocházející z cibule rostliny *Boophone disticha*, která byla využívána v lidovém léčitelství k léčbě infekcí a hojení ran. V této studii byly testovány oba izolované alkaloidy buphanidrin a distichamin a také extrakt z cibule této rostliny, proti grampozitivním bakteriím (*Bacillus subtilis* a *Staphylococcus aureus*) a gramnegativním bakteriím (*Escherichia coli* a *Klebsiella pneumoniae*). V tomto testu působil antibakteriálně proti grampozitivním a gramnegativním bakteriím již samotný extrakt z cibule, přičemž každý alkaloid zvlášť se ukázal jako dvakrát účinnější než samotný extrakt a nejlepší naměřená MIC byla stanovena na 6,3 µg/ml.

V neposlední řadě jsou rostliny z čeledi *Amaryllidaceae* zkoumány pro své antimalarické účinky. Malárie je infekční onemocnění lidí a zvířat, jehož výskyt se každý rok zvyšuje a je potřeba proti němu hledat nové, účinné terapeutické látky z důvodu nedostatečné účinnosti těch současných. Toto infekční onemocnění je způsobeno prvoky rodu *Plasmodium*, kteří jsou přenášeny samičkami komára rodu *Anopheles* (He et al. 2015). Studie provedená Campbell et

al. (1998) se zabývala antimalarickou aktivitou lykorinu a 1,2-di-*O*-acetyllykorinu, které byly izolované z rostliny *Brunsvigia littoralis* (Brunsvingie). Tyto alkaloidy byly testovány proti dvěma druhům *Plasmodium falciparum*, konkrétně proti chlorochin-senzitivnímu (D10) a chlorochin-rezistentním (FAC8). Lykorin a 1,2-di-*O*-acetyllykorin vykazovali solidní inhibiční koncentraci proti chlorochin-senzitivnímu D10 kmenu ( $IC_{50}$ ) = 0,62  $\mu$ g/ml (lykorin); 1,0  $\mu$ g/ml (1,2-di-*O*-acetyllykorin). Výborné hodnoty předvedly obě sloučeniny i proti chlorochin-rezistentnímu (FAC8) kmenu,  $IC_{50}$  = 0,7  $\mu$ g/ml (lykorin) a 1,0  $\mu$ g/ml (1,2-di-*O*-acetyllykorin).

Studie (Çitoğlu et al. 1998; Kang et al. 2012; Park 2014; Chen et al. 2018b) zabývající se protizánětlivou aktivitu rostlinných extraktů vychází z historických etnobotanických poznatků Rostliny čeledi *Amaryllidaceae* byly tradičně využívány při léčbě otoků, astmatu, horečky a proti bolesti, což bylo odrazovým můstkem pro výzkum protizánětlivé aktivity (Ndhlala et al. 2011). Studie Kang et al. (2012) se zabývala inhibicí exprese iNOS a COX-2 a inhibicí produkce NO a PGE<sub>2</sub> stimulované LPS v buněčné linii myších makrofágů RAW 264,7. Lykorin, který byl izolován z cibule rostliny rodu *Lycoris*, byl testován v pěti různých koncentracích (10  $\mu$ M, 5  $\mu$ M, 3  $\mu$ M, 1  $\mu$ M a 0,1  $\mu$ M). Z výsledků této studie je patrné, že inhibice iNOS a COX-2 byla závislá na koncentraci použitého lykorinu a nejúčinnější koncentrace byla 5  $\mu$ M. Lykorin vykazoval inhibiční účinek na produkci NO a PGE<sub>2</sub>, pravděpodobně v důsledku inhibice exprese iNOS a COX-2. V rámci této studie byl porovnán inhibiční účinek lykorinu a Dexamethasonu, který je kortikosteroidním léčivem, který je využíván k léčbě zánětlivých onemocněních. Bylo zjištěno, že lykorin vykazoval mnohem silnější inhibiční aktivitu vůči iNOS a COX-2 než Dexamethason. Çitoğlu et al. (1998) zkoumali protizánětlivou aktivitu alkaloidů lykorinu a haemanthidinu, které byly izolovány z cibule lužanky žluté (*Sternbergia clusina*). V této studii byla protizánětlivá aktivita zkoumána pomocí otoku myších tlapek indukovaného karagenanem. Jako pozitivní kontrola byl využit indomethacin, který je komerčně využíván jako NSA. V této studii bylo zjištěno, že alkaloid haemanthidin vykazoval vyšší protizánětlivou aktivitu než indomethacin, přičemž alkaloid lykorin vykazoval nejnižší protizánětlivý účinek z těchto testovaných látek. Chen et al. (2018b) ve své studii izolovali z cibule rostlin *Crinum latifolium* 4 nové alkaloidy odvozené od kripowellinu, konkrétně 4,8-dimethoxy-kripowellin C, 4,8-dimethoxy-kripowellin D, 9-methoxy-kripowellin B a 4-methoxy-8-hydroxy-kripowellin B. Tyto alkaloidy vykazovaly značnou schopnost inhibovat enzym COX-1 (> 64%) a COX-2 (>90%). V další provedené studii Park (2014) byla sledována protizánětlivá aktivita norberlladinu, který je prekurzorem amaryllkovitých alkaloidů. Potencionální protizánětlivý účinek norberlladinu byl zkoumán jako schopnost inhibovat COX-1. V této studii byl norberlladin porovnáván s aspirinem, který je používán jako NSA a je o něm známo, že tlumí zánětlivou reakci. Z výsledků této studie je patrné, že norberlladin silněji inhiboval COX-1 než aspirin. Obě látky byly testované v různých koncentracích (0,05  $\mu$ M, 0,25  $\mu$ M a 0,50  $\mu$ M), přičemž jako neúčinnější koncentrace se jevila koncentrace 0,25  $\mu$ M. V této koncentraci byl norberlladin schopen inhibovat COX-1 silněji než aspirin, konkrétně inhiboval COX-1 z 51%. Dále byla v této studii pozorována schopnost norberlladinu inhibovat enzym COX-2 v porovnání s NS-398, který je využíván ve vědeckých studiích jako specifický inhibitor COX-2. Podobně jako u inhibice COX-1 byly použity koncentrace (0,05  $\mu$ M, 0,25  $\mu$ M a 0,50  $\mu$ M), tak i u inhibice COX-2 byla nejúčinnější



koncentrace 0,25  $\mu\text{M}$ . Při této koncentraci norberlladin inhiboval COX-2 z 25%, podobně jako NS-398.

Z výše uvedených *in vivo* a *in vitro* studiích je zřejmé, že některé alkaloidy vykazují protizánětlivou aktivitu a mohou tak napomáhat při léčbě zánětlivých onemocněních. Alkaloidů, které vykazují protizánětlivé účinky v *in vivo* a *in vitro* studiích je poměrně velké množství, avšak alkaloidům čeledi *Amaryllidaceae* nebyla doposud věnována značná pozornost v souvislosti s protizánětlivým působením. Z tohoto důvodu je praktická část této diplomové práce věnována jejich schopnosti inhibice NO po stimulaci LPS na buněčné linii myších makrofágů RAW 264,7.

## 4 Metodika

### 4.1 Materiál

Pro testování protizánětlivé aktivity a k testu cytotoxicity (MTT) alkaloidů čeledi *Amaryllidaceae* byla použita buněčná linie myších makrofágů RAW 264,7, RPMI 1640 medium, glukosa, fetální bovinní sérum (FBS), neesenciální aminokyseliny, penicilin, streptomycin, MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyltetrazolium bromid), lipopolysacharid (LPS) *Escherichia coli* 0111:B4 vše zakoupené od Sigma-Aldrich (CZ), hydroxid sodný, šťavelan sodný, kyselina octová, metanol a dimethyl sulfoxid (DMSO) od Lach-Ner (CZ). 96-jamkové mikrotitrační destičky a kultivační lahve byly zakoupeny od Thermo-Scientific (UK).

Vzorky alkaloidů byly připraveny na Farmaceutické fakultě Univerzity Karlovy v Hradci Králové týmem ADINACO. Konkrétně se jednalo o alkaloidy: homolykorin, masonin, odulin, hippeastrin, norplavin, lykorin, haemanthidin, haemanthamin, galanthamin, tazettin a montanin, které byly izolovány z cibule rostliny *Zephyrantes robusta* Baker.

### 4.2 Metodika

#### Kultivace makrofágů buněčné linie RAW 264.7

Buněčná linie myších makrofágů RAW 264.7 byla kultivována v RPMI 1640 mediu s přídatkem 10% FBS, 1% roztokem penicilínu a streptomycinu, 1% neesenciálních aminokyselin, 2 mmol glutaminu, 2% roztoku glukózy.

Buňky byly uvolněny za použití sérologické stěrky a následně centrifugovány 10 minut při  $700 \times g$ . Původní medium bylo odstraněno a následně nahrazeno 10 ml nového media. Buňky byly kultivovány v kultivačních lahvích ( $75 \text{ cm}^2$ ) s 15 ml DMEM media, které byly vloženy do inkubátoru s řízenou atmosférou, která obsahovala 5 %  $\text{CO}_2$  a měla teplotu  $37^\circ \text{C}$ . Buňky byly sklizeny následující den mechanickým uvolněním ode dna kultivační lahve a poté byly odstředěny na centrifuze po dobu 10 minut při  $500 \times g$ . Následně bylo odstraněno staré medium a buňky byly naředěny v mediu. Z takto připravené suspenze bylo odebráno 0,5 ml media s buňkami a byly přidány k 15 ml nového media RPMI 1640 v kultivační láhvi, pro další kultivaci.

#### Cytotoxicita (MMT)

Buňky naředěné na koncentraci  $1 \times 10^5$  byly napipetovány do 96-jamkové destičky v množství 100  $\mu\text{l}$ . Po 2 h inkubaci byly přidány testované vzorky v koncentraci 10; 5; 2,5; 1,25; 1; 0,625; 0,5; 0,3125; 0,25; 0,125; 0,0625; 0,03125  $\mu\text{M}$ . Po 24 h inkubaci, byla destička centrifugována při  $500 \times g$  po dobu 5 minut. Následně bylo odstraněno staré medium a nahrazeno 100  $\mu\text{l}$  kompletním čerstvým mediem s přídatkem MTT v koncentraci 1mg/ml. Po následné 2 h inkubaci byla destička opět centrifugována a medium s MTT odstraněno a nahrazeno 100  $\mu\text{l}$  DMSO.

Následně byla měřena absorbance při 550 nm a referenční hodnotě 720 nm. Procento životaschopných buněk bylo vypočteno v porovnání s kontrolou bez testovaných látek.

### **Inhibice oxidu dusnatého**

Buňky naředěné na koncentraci  $1 \times 10^5$  byly napipetovány do 96-jamkové destičky v množství 100  $\mu\text{l}$ . Destička byla uložena v  $\text{CO}_2$  inkubátoru po dobu 2 hodin. Po uplynutí tohoto časového intervalu byly přidány zkoumané vzorky společně s LPS, obsažené v 100  $\mu\text{l}$  media tak, aby byla získána potřebná koncentrace extraktu. Koncentrace se lišila pro jednotlivé vzorky dle výsledků z MTT, pro alkaloid homolykorin, masonin, odulin, hippeastrin, norplavin, lykorin, haemanthidin a tazettin se jednalo o koncentrace 10; 5; 2,5; 1,25; 0,63; 0,3125  $\mu\text{M}$ , přičemž pro alkaloid haemanthamin, galanthamin a montanin se jednalo o koncentrace 1; 0,5; 0,25; 0,125; 0,0625; 0,03125  $\mu\text{M}$ . Destička byla následně vložena do  $\text{CO}_2$  inkubátoru na dobu 24 hodin. Poté došlo k odebrání 50  $\mu\text{l}$  supernatantu, který byl v nové 96-jamkové destičce smíchán s 50  $\mu\text{l}$  Griessova činidla. Absorbance byla měřena při 540 nm, za použití TECAN M200 Infinite reader (Tecan, CH). Stanovení koncentrace NO byla zjištěna na základě změření kalibrační křivky z dusitanu sodného.

### **4.3 Statistická analýza dat**

Naměřená data byla zpracována v programu Excel (Microsoft, WA, USA). Následná statistická analýza byla provedena v programu Statistica (ver. 12, StatSoft, Inc., OK, USA). Získané výsledky jsou vyjádřeny jako průměry a dále byly hodnoty testovány faktoriální analýzou rozptylu (ANOVA;  $p < 0,05$ ). Pro detailnější statistické vyhodnocení byl použit Dunnettův 2-stranný test a Tukeyův test.

## 5 Výsledky

Provedený *in vitro* experiment byl zaměřen na sledování vybraných alkaloidů čeledi *Amaryllidaceae* a jejich schopnosti inhibovat produkci NO, která byla vyvolána za použití LPS na buněčné linii myších makrofágu RAW 264,7. Následně byl proveden test cytotoxicity.

### 5.1 Výsledky testu cytotoxicity

V rámci stanovení cytotoxicity bylo pouze u lykorinu, haemanthidinu, haemanthaminu a montaninu byla stanovena hodnota IC<sub>10</sub>. U ostatních vzorků bylo IC<sub>10</sub> >10 μM.

**Tabulka 6:** Cytotoxicita námi zkoumaných alkaloidů.

Vzorek	Průměr ± SD (IC <sub>10</sub> μM)
Homolykorin	> 10
Masonin	> 10
Odulin	> 10
Hippeastrin	> 10
Norpluvin	> 10
Lykorin	1,41 ± 0,46
Haemanthidin	3,65 ± 1,25
Tazettin	> 10
Haemanthamin	2,35 ± 0,84
Galanthamin	> 10
Montanin	1,54 ± 0,44

Hodnota IC<sub>10</sub> u většiny vzorků (homolykorin, masonin, odulin, hippeastrin, norpluvin, tazettin, galanthamin) byla > 10 μM/ml, přičemž cytotoxický potenciál na buněčnou linii myších makrofágu RAW 264,7 byl prokázán u alkaloidů lykorinu, haemanthidinu, haemanthaminu a montaninu.

### 5.2 Výsledky stanovení produkce NO

Schopnost inhibice produkce NO alkaloidů čeledi *Amaryllidaceae* při různých koncentracích byla vyjádřena jako procento produkce NO v porovnání s kontrolou ošetřenou LPS, která činila 100 % (Tab. 7.; Příloha 1). Hodnoty uvedené v tabulce jsou průměrné hodnoty naměřené ze 4 opakování. Významnost rozdílů mezi jednotlivými vzorky byla vyhodnocena pomocí statistické faktoriální analýzy rozptylu (ANOVA,  $p < 0,05$ ).

Produkce NO ve všech vzorcích při uvedených koncentracích se v porovnání s kontrolou ošetřenou LPS pohybovala v rozmezí od 45,7 % do 228,8 %. Z námi testovaných 11 alkaloidů byla schopnost statisticky významně snižovat produkci NO zjištěna u 5 vzorků (hippeastrin, norpluvin, lykorin, haemanthamin a galanthamin), přičemž tato schopnost byla prokázána také u DMSO při koncentraci 10 μM, a to konkrétně o 47,9 %. Naopak u alkaloidu tazettinu byla prokázána statisticky významná indukce produkce NO o 128,8 % a 51,0 % při koncentracích 5 a 10 μM. Největší schopnost inhibice produkce NO byla prokázána u alkaloidu hippeastrinu a to o 54,3 % při koncentraci 10 μM, následováno alkaloidem haemanthaminem (52,7 %; 1 μM), lykorinem (49 %; 1,25 μM), norpluvinem (43,8 %; 10 μM) a galanthaminem (40,6 %; 1 μM). Grafické znázornění produkce NO v závislosti na konkrétním alkaloidu a DMSO

a příslušné koncentraci je uvedeno na obrázku 5 a 6. U ostatních vzorků nebyla prokázána schopnost inhibovat produkci NO na hladině významnosti  $p < 0,05$ .

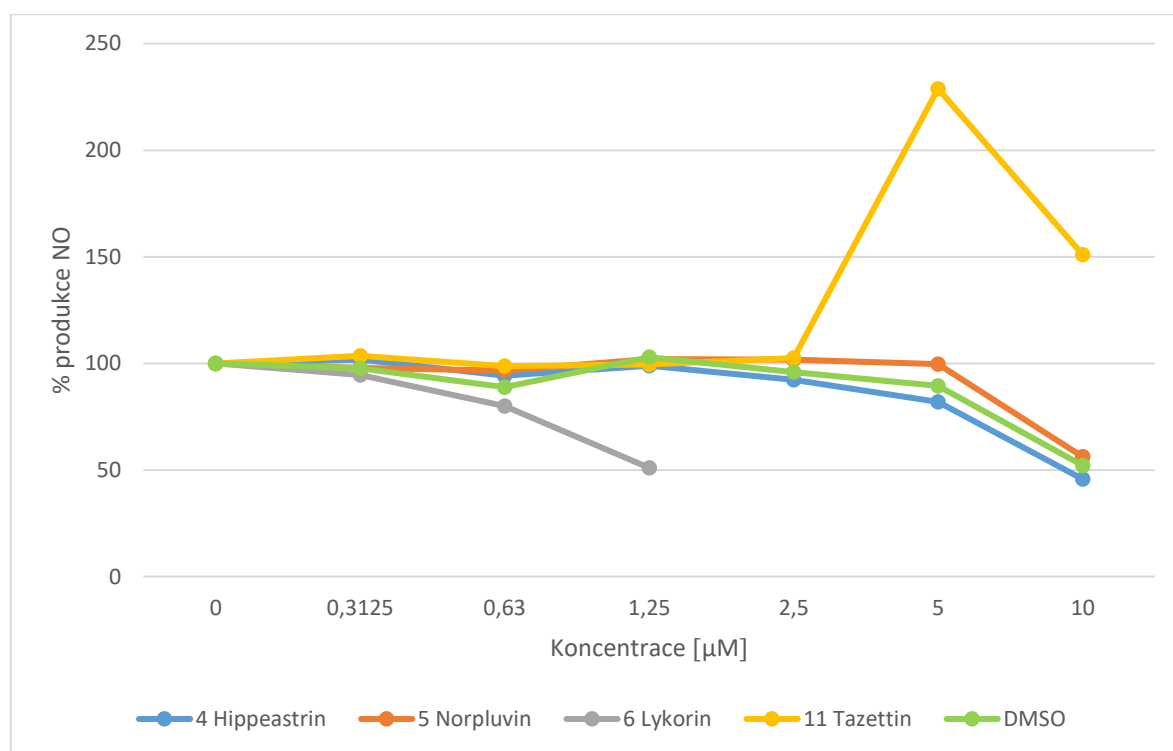
**Tabulka 7:** % Produkce NO vůči ošetřené kontrole LPS.

Vzorek	Koncentrace ( $\mu\text{M}$ )						
	0	0,3125	0,63	1,25	2,5	5	10
Homolykorin	100	105,8	97,9	98,4	99,7	95,0	95,3
Masonin	100	106,0	103,3	100,1	96,4	97,5	93,2
Odulin	100	97,6	99,2	99,1	98,5	95,9	93,5
Hippeastrin	100	101,8	94,2	98,9	92,3	81,9	45,7*
Norpluvin	100	97,9	96,7	102,0	101,7	99,6	56,2*
Lykorin	100	94,5	79,9	51,0*	-	-	-
Haemanthidin	100	105,3	106,3	101,0	105,7	99,1	106,0
Tazettin	100	103,6	98,7	99,5	102,5	228,8*	151,0*
DMSO	100	97,7	88,9	102,9	95,9	89,5	52,1*

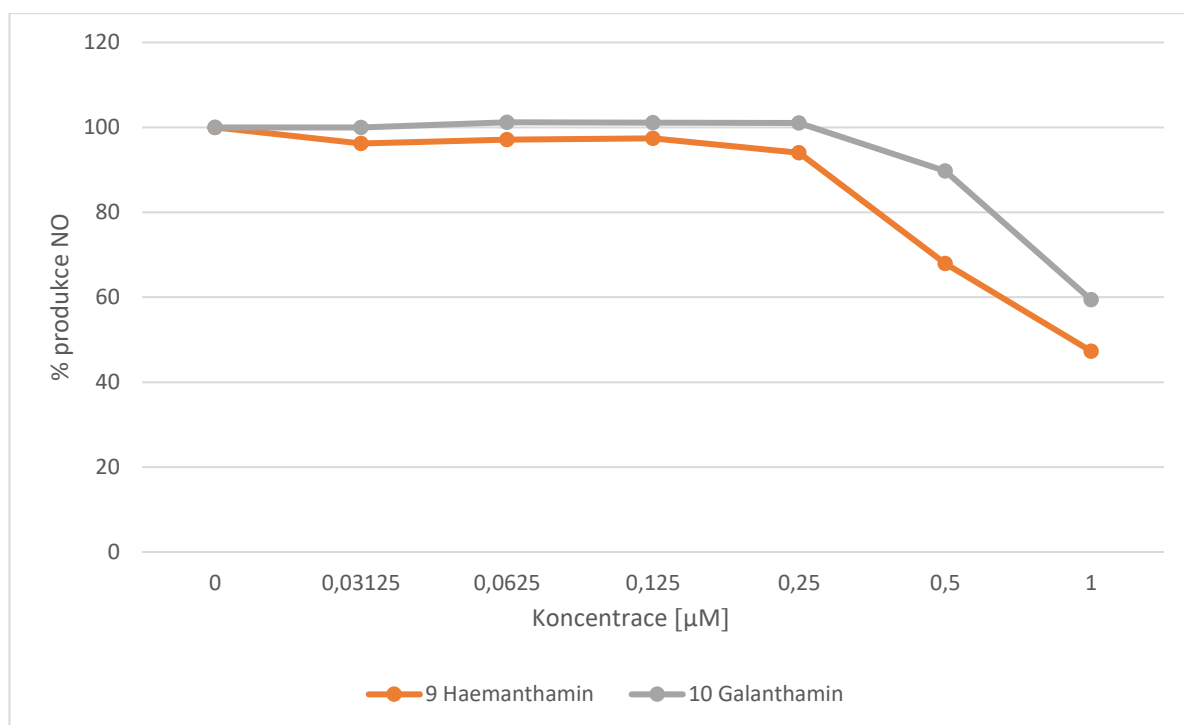
  

Vzorek	Koncentrace ( $\mu\text{M}$ )						
	0	0,03125	0,0625	0,125	0,25	0,5	1
Haemanthamin	100	96,2	97,1	97,4	94,0	67,9	47,3*
Galanthamin	100	100,0	101,2	101,1	101,0	89,7	59,4*
Montanin	100	102,4	103,9	101,8	101,8	96,4	64,7

\* statistická významnost  $p < 0,05$  oproti ošetřené kontrole LPS



**Obr. 5:** Křivky znázorňují produkci NO v závislosti na rozdílných koncentracích daného vzorku.



**Obr. 6:** Křivky znázorňují produkci NO v závislosti na rozdílných koncentracích daného vzorku.

Schopnost inhibice produkce NO v závislosti na koncentraci konkrétního alkaloidu byla dále hodnocena pomocí faktoriální analýzy rozptylu (Příloha 2). Výsledky statistického hodnocení prokázaly významné rozdíly mezi testovanými alkaloidy, proto byl následně pro detailnější vyhodnocení použit Tukeyův test (Příloha 3). Statistické hodnocení potvrdilo, že mezi jednotlivými vzorky alkaloidů existují významné rozdíly v inhibici produkce NO. Významně nejvíce inhiboval produkci NO alkaloid hippeastrin při koncentraci 10  $\mu\text{M}$ , následovaný alkaloidem haemanthaminem při koncentraci 1  $\mu\text{M}$ , alkaloidem lykorinem (1,25  $\mu\text{M}$ ) a norpluvinem (10  $\mu\text{M}$ ). Tyto alkaloidy se při uvedených koncentracích od sebe významně nelišily.

Statisticky významně se lišil alkaloid hippeastrin při koncentraci 10  $\mu\text{M}$ , který inhiboval produkci NO o 54,3 % téměř od všech analyzovaných vzorků vyjma alkaloidu homolykorinu (10; 5  $\mu\text{M}$ ), masoninu (10; 2,5  $\mu\text{M}$ ), odulinu (10; 5  $\mu\text{M}$ ), hippeastrinu (5; 2,5; 0,63  $\mu\text{M}$ ), norpluvinu (10; 0,63  $\mu\text{M}$ ), Lykorinu (1,25; 0,63; 0,3125  $\mu\text{M}$ ), haemanthaminu (1; 0,5; 0,25; 0,0625; 0,03125  $\mu\text{M}$ ), galanthaminu (1; 0,5  $\mu\text{M}$ ) a montaninu (1  $\mu\text{M}$ ).

Alkaloid haemanthamin, který při koncentraci 1  $\mu\text{M}$  významně inhiboval produkci NO a to o 52,7 % se významně lišil od alkaloidu homolykorinu (2,5; 0,3125  $\mu\text{M}$ ), masoninu (1,25; 0,63; 0,3125  $\mu\text{M}$ ), odulinu (1,25; 0,63  $\mu\text{M}$ ), hippeastrinu (5  $\mu\text{M}$ ), norpluvinu (5; 2,5; 1,25  $\mu\text{M}$ ), haemanthidinu (10; 5; 2,5; 1,25; 0,63; 0,3125  $\mu\text{M}$ ), galanthaminu (0,25; 0,125; 0,0625; 0,03125  $\mu\text{M}$ ), tazettinu (10; 5; 2,5; 1,25; 0,3125  $\mu\text{M}$ ) a montaninu (0,25; 0,125  $\mu\text{M}$ ).

Dále také alkaloid lykorin, který při koncentraci 1,25  $\mu\text{M}$  významně potlačoval produkci NO o 49 % se významně lišil od alkaloidu homolykorinu (0,3125  $\mu\text{M}$ ), masoninu (0,63; 0,3125  $\mu\text{M}$ ), haemanthidinu (10; 2,5; 0,63; 0,3125  $\mu\text{M}$ ), tazettinu (10; 5; 0,3125  $\mu\text{M}$ ) a montaninu (0,0625  $\mu\text{M}$ ).

Alkaloid norpluvin, který inhiboval produkci NO o 43,8 % při koncentraci 10  $\mu\text{M}$  a galanthamin, který inhiboval produkci NO o 40,6 % při koncentraci 1  $\mu\text{M}$  se statisticky

významně lišily od alkaloidu tazettinu při koncentraci 10 a 5  $\mu\text{M}$ . Tazettin, který indukoval produkci NO při koncentraci 5  $\mu\text{M}$  o 128,8 % se statisticky významně lišil od všech alkaloidů ve všech koncentracích.

V neposlední řadě DMSO, který při koncentraci 10  $\mu\text{M}$  také významně inhiboval produkci NO, se statisticky významně lišil od alkaloidu homolykorinu (0,3125  $\mu\text{M}$ ), masoninu (0,3125  $\mu\text{M}$ ), haemanthidinu (10; 2,5; 0,63; 0,3125  $\mu\text{M}$ ), tazettinu (10; 5  $\mu\text{M}$ ) a montaninu (0,0625  $\mu\text{M}$ ).

## 6 Diskuze

Léčivé rostliny představují cenný zdroj biologicky aktivních látek, které mohou být účinné při léčbě řady onemocnění. Z tohoto důvodu je na ně v současnosti zaměřen výzkum. Mezi hlavní výhody a přednosti užívání rostlinných léčivých přípravků jsou nízké náklady, cenová dostupnost a obvykle méně vedlejších účinků. Výzkumné studie prováděné na léčivých rostlinách jsou nezbytné pro potvrzení jejich účinnosti a bezpečnosti.

Je známo, že komerčně používaná protizánětlivá léčiva, jako jsou kortikosteroidy a NSA mnohdy nemají patřičný účinek v léčbě zánětlivých onemocnění a jsou často doprovázeny vedlejšími účinky, z tohoto důvodu je nezbytný výzkum látek přírodního původu. Výchozím bodem pro objev nových protizánětlivých látek přírodního původu by mohly být historické etnobotanické poznatky.

V této diplomové práci bylo analyzováno celkem 11 vzorků alkaloidů čeledi *Amaryllidaceae* v souvislosti se schopností inhibovat produkci NO na buněčné linii myších makrofágů RAW 264,7. Při koncentracích 0,03125; 0,0625; 0,125; 0,25; 0,3125; 0,5 a 0,63  $\mu\text{M}$  nebyl nalezen statisticky významný rozdíl v inhibici produkce NO u žádného z námi testovaných alkaloidů v porovnání s kontrolou, která byla ošetřena LPS a činila 100 %. Schopnost statisticky významně snižovat produkci NO byla prokázána při koncentracích  $\geq 1$   $\mu\text{M}$  u 5 alkaloidů. Konkrétně se jednalo o alkaloidy hippeastrin, norpluvin, lykorin, haemanthamin a galanthamin. Nejvýznamněji inhiboval produkci NO alkaloid hippeastrin, konkrétně o 54,3 % při koncentraci 10  $\mu\text{M}$ , následovaný alkaloidem haemanthaminem (52,7 %; 1  $\mu\text{M}$ ), lykorinem (49 %; 1,25  $\mu\text{M}$ ), norpluvinem (43,8; 10  $\mu\text{M}$ ) a galanthaminem (40,6; 1  $\mu\text{M}$ ). V rámci této diplomové práce byla také testována schopnost DMSO inhibovat produkci NO, ke statisticky významnému rozdílu došlo při koncentraci 10  $\mu\text{M}$  a to o 47,9 %. Naopak tomu bylo u alkaloidu tazettinu, který statisticky významně indukoval produkce NO o 128,8 % při koncentraci 5  $\mu\text{M}$  a o 51 % při koncentraci 10  $\mu\text{M}$ . Statistická analýza dále prokázala vzájemné rozdíly mezi jednotlivými alkaloidy při určitých koncentracích. Statisticky významně se od sebe nelišily alkaloidy, u nichž byla prokázána významná inhibice produkce NO. Naopak alkaloid tazettin, který při koncentraci 5  $\mu\text{M}$  indukoval produkci NO o 128,8 % se statisticky významně lišil od všech alkaloidů. DMSO, který při koncentraci 10  $\mu\text{M}$  také významně inhiboval produkci NO, se statisticky významně lišil od alkaloidu homolykorinu (0,3125  $\mu\text{M}$ ), masoninu (0,3125  $\mu\text{M}$ ), haemanthidinu (10; 2,5; 0,63; 0,3125  $\mu\text{M}$ ), tazettinu (10; 5  $\mu\text{M}$ ) a montaninu (0,0625  $\mu\text{M}$ ).

Protizánětlivému působení alkaloidu hippeastrinu, který se v rámci této diplomové práce jevil jako nejúčinnější testovaná látka v inhibici produkce NO a norpluvinu, nebyla doposud věnována přílišná pozornost vědeckého výzkumu v souvislosti s protizánětlivým působením. Karthikeyan et al. (2016) ve své studii použili etanolový extrakt z květu rostliny *Hymenocallis littoralis* (Jacq.) Salisb. Tento etanolový extrakt obsahoval kromě alkaloidu hippeastrinu také alkaloidy jako je lykorin, homolykorin, haemanthamin, vittatin, littoralin, tazettin, pretazettin a dva flavonoidy kvercetin 3-glykosid a rutin. Z výsledků této studie je patrné, že potencionální protizánětlivý účinek etanolového extraktu na buněčné linii RAW 264,7 byl přímo úměrný použité koncentraci. Zkoumaný etanolový extrakt při koncentraci 500  $\mu\text{g/ml}$  inhiboval produkci NO z 68 %, jako standart byl použit diclofenac, který je komerčně využíván jako NSA, jež inhiboval produkci NO z 87 %. Při koncentraci 100  $\mu\text{g/ml}$  inhiboval etanolový extrakt produkci



NO z 45 %, přičemž diclofenac inhiboval produkci NO z 61 %. Nicméně z těchto výsledků nelze jasně usoudit, jaký vliv na inhibici produkce NO měl právě alkaloid hippeastrin a další amarylkovité alkaloidy, z důvodu poměrně širokého spektra účinných látek obsažených v etanolovém extraktu.

Podobně jako hippeastrin, tak ani haemanthamin nebyl podroben mnoha studiím, které by se zabývali jeho protizánětlivým působením. Kaya et al. (2017) ve své studii zkoumali možné protizánětlivé působení extraktů alkaloidů cibule a nadzemní části rostliny *Galanthus cillicicus* Baker. Oba extrakty se lišily v obsahu alkaloidů, v extraktu z nadzemních částí byl nejhojněji zastoupený alkaloid haemanthamin (48,3 %) a tazettin (11,12 %), zatímco v extraktu z cibule byl nejvíce zastoupeným alkaloidem galanthamin (18,16 %) a opět tazettin (15,84 %). Následně byly tyto extrakty podrobeny *in vitro* testu, ve kterém byla pozorována adheze monocytů na endotel. V tomto testu byla využita buněčná linie THP-1 monocytů a lidské endoteliální buňky z pupečnickové žíly, které byly stimulovány TNF- $\alpha$ . Oba tyto extrakty vykazovaly statisticky významný rozdíl v porovnání s neošetřenou kontrolou při koncentraci 3  $\mu\text{g/ml}$  ve schopnosti snižovat adhezi monocytů na lidské endoteliální buňky z pupečnickové žíly. Předpokládá se, že tyto extrakty snižovaly povrchovou expresi molekuly adheze endotelu, která zprostředkovává interakci monocytů a endoteliálních buněk. Avšak podobně jako ve studii Karthikeyan et al. (2016) nelze zcela jistě určit do jaké míry měli jednotlivé alkaloidy vliv na protizánětlivé působení. Nicméně tazettin, který v této diplomové práci indukoval produkci NO o 128,8 % při koncentraci 5  $\mu\text{M}$  a o 51 % při koncentraci 10  $\mu\text{M}$ , vykazoval v uvedené studii protizánětlivé účinky v kombinaci s jinými alkaloidy.

Naopak alkaloid lykorin, který v této diplomové práci statisticky významně snižoval produkci NO o 49 % při koncentraci 1,25  $\mu\text{M}$ , je častějším podnětem k pozorování protizánětlivé aktivity než předchozí alkaloidy. Studie Kang et al. (2012) se zabývala inhibicí exprese iNOS a COX-2 a inhibicí produkce NO a PGE<sub>2</sub> stimulované LPS v buněčné linii myších makrofágů RAW 264,7. Lykorin, který byl izolován z cibule rostliny rodu *Lycoris*, byl testován v pěti různých koncentracích (10  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$ , 3  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$  a 0,1  $\mu\text{M}$ ). Z výsledků této studie je patrné, že inhibice iNOS a COX-2 byla závislá na koncentraci použitého lykorinu a nejúčinnější koncentrace byla 5  $\mu\text{M}$ . Lykorin vykazoval inhibiční účinek na produkci NO a PGE<sub>2</sub>, pravděpodobně v důsledku inhibice exprese iNOS a COX-2. V rámci této studie byl porovnán inhibiční účinek lykorinu a Dexamethasonu, který je kortikosteroidním léčivem a je využíván k léčbě zánětlivých onemocněních. Bylo zjištěno, že lykorin vykazoval mnohem silnější inhibiční aktivitu vůči iNOS a COX-2 než Dexamethason. Çitoğlu et al. (1998) ve své *in vivo* studii zkoumali protizánětlivý účinek lykorinu a haemanthidinu, které byly izolovány z cibule lužanky žluté (*Sternbergia clusina*). V této studii byla protizánětlivá aktivita zkoumána pomocí otoku myších tlapek indukovaného karagenanem. Jako pozitivní kontrola byl využit indomethacin, který je komerčně využíván jako NSA. Výsledky této *in vivo* studie udávají, že haemanthidin vykazoval vyšší protizánětlivou aktivitu než indomethacin a lykorin. Což není v souladu s výsledky této diplomové práce, kde haemanthidin nevykazoval žádné protizánětlivé účinky, přičemž u lykorinu byl potvrzen statisticky významný rozdíl v inhibici produkce NO oproti ošetřené kontrole LPS.

Alkaloid galanthamin, který v rámci této diplomové práce inhiboval produkci NO o 40,6 % při koncentraci 1  $\mu\text{M}$  je komerčně využíván jako terapeutická látka v léčbě AD. Sangaleti et al. (2021) se ve své randomizované, dvojitě zaslepené, placebem kontrolované studii zabývali

možným protizánětlivým působením galanthaminu. Této studii se účastnili dobrovolníci trpící metabolickým syndromem, kteří byli rozděleni do dvou skupin. První skupině byl podáván galanthamin po dobu 4 týdnů v množství 8 mg denně s následným navýšením dávky galanthaminu na 16 mg po dobu 8 týdnů, druhá skupina obdržela placebo a užívala ho ve stejném režimu jako první skupina. V této studii byla analyzována plazma dobrovolníků a bylo zjištěno, že došlo ke statisticky významnému zvýšení hladiny adiponektinu o 2,30  $\mu\text{g/ml}$  u dobrovolníků, kterým byl podáván galanthamin v porovnání se skupinou, které bylo podáváno placebo. Naopak u skupiny, které bylo podáváno placebo došlo ke snížení hladiny adiponektinu. Adiponektin se řadí mezi hormony a vyznačuje se protizánětlivým působením. Dále byla v rámci této studie analyzována hladina TNF- $\alpha$  v plazmě. U skupiny, které byl podáván galanthamin došlo ke statisticky významnému poklesu hladiny TNF- $\alpha$  o 2,50  $\text{pg/ml}$  v porovnání se skupinou, která užívala placebo. Ke zlepšení sledovaných hodnot došlo pravděpodobně v důsledku antioxidačního působení galanthaminu, jež zhasel volné radikály, které jsou zapojeny do zánětlivých stavů.

Je tedy zřejmé, že některé alkaloidy čeledi *Amaryllidaceae* mají schopnost při určitých koncentracích potlačovat produkci NO a dalších zánětlivých mediátorů v *in vitro* a *in vivo* studiích a tím přispívat k tlumení zánětu. Nicméně je potřeba více *in vivo* studií, které by potvrdily protizánětlivé působení těchto látek na živé organismy a mohly by tak být nápomocné při léčbě zánětlivých onemocnění u lidí.

## 7 Závěr

Cílem této diplomové práce bylo pomocí *in cellulo* metod stanovit potencionální účinnost přírodních látek na inhibici produkce oxidu dusnatého na buněčné linii myších makrofágů RAW 264,7. V rámci této diplomové práce byla testována schopnost vybraných alkaloidů čeledi *Amaryllidaceae* inhibovat produkci oxidu dusnatého.

Z výsledků je patrné, že některé amarylkovité alkaloidy mají schopnost inhibovat produkci NO na buněčné linii myších makrofágů RAW 264,7. Konkrétně se jednalo o alkaloidy hippeastrin, který inhiboval produkci oxidu dusnatého o 54,3 % při koncentraci 10  $\mu\text{M}$ , následovaný alkaloidem haemanthaminem (52,7 %; 1  $\mu\text{M}$ ), lykorinem (49 %; 1,25  $\mu\text{M}$ ), norpluvinem (43,8 %; 10  $\mu\text{M}$ ) a galanthaminem (40,6 %; 1  $\mu\text{M}$ ). Tyto alkaloidy statisticky významně snižovaly produkci oxidu dusnatého v porovnání s ošetřenou kontrolou LPS a byla tedy prokázána jejich protizánětlivá aktivita *in vitro*, což potvrzuje hypotézu této diplomové práce, že chemické látky přírodního charakteru mají schopnost inhibovat produkci oxidu dusnatého. Mezi výše uvedenými alkaloidy nebyl nalezen statisticky významný rozdíl. Naopak alkaloid tazettin při koncentracích 5 a 10  $\mu\text{M}$  indukoval produkci NO o 128,8 % a 51,0 %, z čehož lze usuzovat jeho možné prozánětlivé účinky *in vitro*. Alkaloid tazettin při koncentraci 5  $\mu\text{M}$  se statisticky významně lišil od všech námi testovaných alkaloidů.

Přestože protizánětlivé působení amarylkovitých alkaloidů bylo doposud studováno pouze v omezené míře, z výsledků této diplomové práce a z výsledků vědeckých *in vitro* a *in vivo* studií je zřejmé, že některé amarylkovité alkaloidy mají schopnost působit protizánětlivě. Je tedy nezbytný další vědecký výzkum, zejména analýza těchto látek v *in vivo* studiích, aby bylo prokázáno jejich protizánětlivé působení na živých organismech.

## 8 Literatura

- Abdulkhaleq LA, Assi MA, Abdullah R, Zamri-Saad M, Taufiq-Yap YH, Hezmee MNM. 2018. The crucial roles of inflammatory mediators in inflammation: A review: A review. *Veterinary world* **11**:627.
- Adcock IM, Mumby S. 2016. Glucocorticoids. 171-196 in *Pharmacology and Therapeutics of Asthma and COPD*. Springer.
- Ahmed E, Arshad M, Khan MZ, Amjad MS, Sadaf HM, Riaz I, Sabir S, Ahmad N. 2017. Secondary metabolites and their multidimensional prospective in plant life. *J. Pharmacogn. Phytochem* **6**:205-214.
- Andreicuț A-D, Pârvu AE, Moț AC, Parvu M, Fischer-Fodor E, Feldrihan V, Florinela A, Catoi MC, Irimie A. 2018. Anti-inflammatory and antioxidant effects of Mahonia aquifolium leaves and bark extracts. *Farmacia* **66**.
- Ang S, Liu X-M, Huang X-J, Zhang D-M, Zhang W, Wang L, Ye W-C. 2015. Four New Amaryllidaceae Alkaloids from *Lycoris radiata* and Their Cytotoxicity. *Planta Medica* **81**:1712-1718.
- Aniszewski T. 2015. *Alkaloids: chemistry, biology, ecology, and applications: chemistry, biology, ecology, and applications*. Elsevier.
- Baer DJ, Judd JT, Clevidence BA, Tracy RP. 2004. Dietary fatty acids affect plasma markers of inflammation in healthy men fed controlled diets: a randomized crossover study. *The American Journal of Clinical Nutrition* **79**:969-973.
- Bailey JM. 2013. *Prostaglandins, Leukotrienes, Lipoxins, and PAF: Mechanism of Action, Molecular Biology, and Clinical Applications: Mechanism of Action, Molecular Biology, and Clinical Applications*. Springer Science & Business Media.
- Barrientos RM, Kitt MM, Watkins LR, Maier SF. 2015. Neuroinflammation in the normal aging hippocampus. *Neuroscience* **309**:84-99.
- Barton GM. 2008. A calculated response: control of inflammation by the innate immune system: control of inflammation by the innate immune system. *The Journal of clinical investigation* **118**:413-420.
- Bastida Armengol J, Berkov S, Torras Claveria L, Pigni NB, Andrade JP de, Martínez V, Codina Mahrer C, Viladomat Meya F. 2011. Chemical and biological aspects of Amaryllidaceae alkaloids. *Recent Advances in Pharmaceutical Sciences*:65-100.
- Bastida J, Lavilla R, Viladomat F. 2006. Chemical and biological aspects of Narcissus alkaloids. *The alkaloids: chemistry and biology* **63**:87-179.
- Benson RA, McInnes IB, Brewer JM, Garside P. 2015. Cellular imaging in rheumatic diseases. *Nature Reviews Rheumatology* **11**:357.
- Berkov S, Codina C, Bastida J. 2012. The genus *Galanthus*: a source of bioactive compounds: a source of bioactive compounds. in *Phytochemicals-A Global Perspective of Their Role in Nutrition and Health*. IntechOpen.

- Berkov S, Georgieva L, Kondakova V, Atanassov A, Viladomat F, Bastida J, Codina C. 2009. Plant sources of galanthamine: phytochemical and biotechnological aspects: phytochemical and biotechnological aspects. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* **23**:1170-1176.
- Berkov S, Martínez-Francés V, Bastida J, Codina C, Ríos S. 2014. Evolution of alkaloid biosynthesis in the genus *Narcissus*. *Phytochemistry* **99**:95-106.
- Berkov S, Pavlov A, Georgiev V, Weber J, Bley T, Viladomat F, Bastida J, Codina C. 2010. Changes in apolar metabolites during in vitro organogenesis of *Pancreaticum maritimum*. *Plant Physiology and Biochemistry* **48**:827-835.
- Bhattacharya S. 2017. Medicinal plants and natural products in amelioration of arsenic toxicity: a short review: a short review. *Pharmaceutical Biology* **55**:349-354.
- Bonilla FA, Oettgen HC. 2010. Adaptive immunity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **125**:S33-S40.
- Bouma G, Strober W. 2003. The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. *Nature Reviews Immunology* **3**:521-533.
- Bozkurt-Sarikaya B, Kaya GI, Onur MA, Bastida J, Berkov S, Unver-Somer N. 2014. GC/MS analysis of Amaryllidaceae alkaloids in *Galanthus gracilis*. *Chemistry of Natural Compounds* **50**:573-575.
- Buttgereit F, Smolen JS, Coogan AN, Cajochen C. 2015. Clocking in: chronobiology in rheumatoid arthritis: chronobiology in rheumatoid arthritis. *Nature Reviews Rheumatology* **11**:349-356.
- Campbell WE, Nair JJ, Gammon DW, Bastida J, Codina C, Viladomat F, Smith PJ, Albrecht CF. 1998. Cytotoxic and antimalarial alkaloids from *Brunsvigia littoralis*. *Planta Medica* **64**:91-93.
- Caramori G, Mumby S, Girbino G, Chung KF, Adcock IM. 2019. Corticosteroids. 661-688 in Nijkamp and Parnham's Principles of Immunopharmacology. Springer.
- Carvalho KR, Silva AB, Torres MCM, Pinto FCL, Guimarães LA, Rocha DD, Silveira ER, Costa-Lotufo LV, Braz-Filho R, Pessoa ODL. 2015. Cytotoxic Alkaloids from *Hippeastrum solandriiflorum* Lindl. *Journal of the Brazilian Chemical Society* **26**:1976-1980.
- Ci X, Ren R, Xu K, Li H, Yu Q, Song Y, Wang D, Li R, Deng X. 2010. Schisantherin A exhibits anti-inflammatory properties by down-regulating NF- $\kappa$ B and MAPK signaling pathways in lipopolysaccharide-treated RAW 264.7 cells. *Inflammation* **33**:126-136.
- Çitoğlu G, Tanker M, Gümüşel B. 1998. Antiinflammatory effects of lycorine and haemanthidine. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives* **12**:205-206.

- Dalecká M, Havelek R, Královec K, Brůčková L, Cahlíková L. 2013. Alkaloidy rostlin čeledi Amaryllidaceae jako potenciální léčiva v terapii nádorových onemocnění. *Chemické listy* **107**:701-708.
- Daley CA, Abbott A, Doyle PS, Nader GA, Larson S. 2010. A review of fatty acid profiles and antioxidant content in grass-fed and grain-fed beef. *Nutrition journal* **9**:10.
- De Moraes WF, Galdino PM, Nascimento MVM, Vanderlinde FA, Bara MTF, Costa EA, de Paula JR. 2012. Triterpenes involved in the anti-inflammatory effect of ethanolic extract of *Pterodon emarginatus* Vogel stem bark. *Journal of natural medicines* **66**:202-207.
- Denson LA et al. 2013. Challenges in IBD Research. *Inflammatory Bowel Diseases* **19**:677-682.
- Desgagné-Penix I. 2020. Biosynthesis of alkaloids in Amaryllidaceae plants: a review. *PHYTOCHEMISTRY REVIEWS*.
- Dinarello CA. 2010. Anti-inflammatory agents: present and future: present and future. *Cell* **140**:935-950.
- Ding Y, Qu D, Zhang K-M, Cang X-X, Kou Z-N, Xiao W, Zhu J-B. 2017. Phytochemical and biological investigations of Amaryllidaceae alkaloids: a review. *Journal of Asian natural products research* **19**:53-100.
- Esmailzadeh A, Kimiagar M, Mehrabi Y, Azadbakht L, Hu FB, Willett WC. 2006. Fruit and vegetable intakes, C-reactive protein, and the metabolic syndrome. *The American journal of clinical nutrition* **84**:1489-1497.
- Esposito K, Marfella R, Ciotola M, Di Palo C, Giugliano F, Giugliano G, D'Armiento M, D'Andrea F, Giugliano D. 2004. Effect of a Mediterranean-style diet on endothelial dysfunction and markers of vascular inflammation in the metabolic syndrome: a randomized trial. *Jama* **292**:1440-1446.
- Evidente A, Andolfi A, Abou-Donia AH, Touema SM, Hammouda HM, Shawky E, Motta A. 2004. (-)-Amarbellisine, a lycorine-type alkaloid from *Amaryllis belladonna* L. growing in Egypt. *Phytochemistry* **65**:2113-2118.
- Evidente A, Kireev AS, Jenkins AR, Romero AE, Steelant WFA. 2009. Biological evaluation of structurally diverse amaryllidaceae alkaloids and their synthetic derivatives: discovery of novel leads for anticancer drug design. *Planta medica* **75**:501.
- Fang J-Y, Hung C-F, Chiu H-C, Wang J-J, Chan T-F. 2003. Efficacy and irritancy of enhancers on the in-vitro and in-vivo percutaneous absorption of curcumin. *Journal of pharmacy and pharmacology* **55**:593-601.
- Fang L-H, Wang J-H, Du G-H. 2018. Berberine. 371-377 in *Natural Small Molecule Drugs from Plants*. Springer.
- Feuerstein GZ, Ruffolo RR, Coughlin C, Wang J, Miller D. 2007. Inflammation. *Encyclopedia of Stress*:530-535.

- Fu Y, Zhou H, Wang S, Wei Q, Bobé P. 2014. Glycyrol Suppresses Collagen-Induced Arthritis by Regulating Autoimmune and Inflammatory Responses. *PLoS ONE* **9**.
- Fujii A, Okuyama T, Wakame K, Okumura T, Ikeya Y, Nishizawa M. 2017. Identification of anti-inflammatory constituents in *Phellodendri Cortex* and *Coptidis Rhizoma* by monitoring the suppression of nitric oxide production. *Journal of natural medicines* **71**:745-756.
- Giordani RB, de Andrade JP, Verli H, Dutilh JH, Henriques AT, Berkov S, Bastida J, Zuanazzi JAS. 2011. Alkaloids from *Hippeastrum morelianum* Lem.(Amaryllidaceae). *Magnetic Resonance in Chemistry* **49**:668-672.
- Grotto D, Zied E. 2010. The standard American diet and its relationship to the health status of Americans. *Nutrition in Clinical Practice* **25**:603-612.
- Guillou C, Mary A, Renko DZ, Gras E, Thal C. 2000. Potent acetylcholinesterase inhibitors: design, synthesis and structure–activity relationships of alkylene linked bis-galanthamine and galanthamine–galanthaminium salts: design, synthesis and structure–activity relationships of alkylene linked bis-galanthamine and galanthamine–galanthaminium salts. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **10**:637-639.
- Hayashi S, Sumi Y, Ueno N, Murase A, Takada J. 2011. Discovery of a novel COX-2 inhibitor as an orally potent anti-pyretic and anti-inflammatory drug: Design, synthesis, and structure–activity relationship: Design, synthesis, and structure–activity relationship. *Biochemical pharmacology* **82**:755-768.
- He M, Qu C, Gao O, Hu X, Hong X. 2015. Biological and pharmacological activities of amaryllidaceae alkaloids. *RSC Advances* **5**:16562-16574.
- Herrera MR, Machocho AK, Brun R, Viladomat F, Codina C, Bastida J. 2001. Crinane and lycorane type alkaloids from *Zephyranthes citrina*. *Planta medica* **67**:191-193.
- Hesse M. 2002. *Alkaloids: nature's curse or blessing?* John Wiley.
- Houghton PJ, Ren Y, Howes M-J. 2006. Acetylcholinesterase inhibitors from plants and fungi. *Natural Product Reports* **23**:181-199.
- Huang L, Guan T, Qian Y, Huang M, Tang X, Li Y, Sun H. 2011. Anti-inflammatory effects of maslinic acid, a natural triterpene, in cultured cortical astrocytes via suppression of nuclear factor-kappa B. *European journal of pharmacology* **672**:169-174.
- Chan C-K, Tan LT-H, Andy SN, Kamarudin MNA, Goh B-H, Kadir HA. 2017. Anti-neuroinflammatory Activity of *Elephantopus scaber* L. via Activation of Nrf2/HO-1 Signaling and Inhibition of p38 MAPK Pathway in LPS-Induced Microglia BV-2 Cells. *Frontiers in Pharmacology* **8**:397-411.
- Chase MW, Reveal JL, Fay MF. 2009. A subfamilial classification for the expanded asparagalean families Amaryllidaceae, Asparagaceae and Xanthorrhoeaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society* **161**:132-136.
- Cheesman L, Nair JJ, van Staden J. 2012. Antibacterial activity of crinane alkaloids from *Boophone disticha* (Amaryllidaceae). *Journal of Ethnopharmacology* **140**:405-408.



- Chen L, Deng H, Cui H, Fang J, Zuo Z, Deng J, Li Y, Wang X, Zhao L. 2018a. Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. *Oncotarget* **9**:7204.
- Chen M-X, Huo J-M, Hu J, Xu Z-P, Zhang X. 2018b. Amaryllidaceae alkaloids from *Crinum latifolium* with cytotoxic, antimicrobial, antioxidant, and anti-inflammatory activities. *Fitoterapia* **130**:48-53.
- Ibarguren M, López DJ, Escribá PV. 2014. The effect of natural and synthetic fatty acids on membrane structure, microdomain organization, cellular functions and human health. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* **1838**:1518-1528.
- Jin Z, Yao G. 2019. Amaryllidaceae and Sceletium alkaloids. *Natural product reports* **36**:1462-1488.
- Jin Z. 2005. Amaryllidaceae and Sceletium alkaloids. *Natural product reports* **22**:111-126.
- Johnson MH. 2018. Essential reproduction. John Wiley.
- Kang J, Zhang Y, Cao X, Fan J, Li G, Wang Q, Diao Y, Zhao Z, Luo L, Yin Z. 2012. Lycorine inhibits lipopolysaccharide-induced iNOS and COX-2 up-regulation in RAW264. 7 cells through suppressing P38 and STATs activation and increases the survival rate of mice after LPS challenge. *International immunopharmacology* **12**:249-256.
- Karthikeyan R, Koushik OS, Babu PS. 2016. Anti-Inflammatory Activity of Ethanolic Extract of Flowers *Hymenocallis Littoralis* (Jacq.) Salisb. By Hrbc Membrane Stabilization Method. *Transl Biomed* **7**:2.
- Kaya GI, Uzun K, Bozkurt B, Onur MA, Somer NU, Glatzel DK, Fürst R. 2017. Chemical characterization and biological activity of an endemic Amaryllidaceae species: *Galanthus cilicicus*. *South African Journal of Botany* **108**:256-260.
- Kilgore MB, Kutchan TM. 2016. The Amaryllidaceae alkaloids: biosynthesis and methods for enzyme discovery. *Phytochemistry reviews* **15**:317-337.
- Kim HP, Son KH, Chang HW, Kang SS. 2004. Anti-inflammatory Plant Flavonoids and Cellular Action Mechanisms. *Journal of Pharmacological Sciences* **96**:229-245.
- Kintsurashvili L, Vachnadze V. 2007. Plants of the Amaryllidaceae family grown and introduced in Georgia: a source of galanthamine. *Pharmaceutical Chemistry Journal* **41**:492-494.
- Kong L-L, Wang J-H, Du G-H. 2018. Morphine. 295-302 in *Natural Small Molecule Drugs from Plants*. Springer.
- Kornienko A, Evidente A. 2008. Chemistry, biology, and medicinal potential of narciclasine and its congeners. *Chemical reviews* **108**:1982-2014.
- Kosaka M, Sugahara T, Schmidt KL, Simon E. 2013. *Thermotherapy for neoplasia, inflammation, and pain*. Springer Science & Business Media.
- Krejčová G, Ševelová L. 2003. Současné poznatky o galantaminu, reverzibilním inhibitoru acetylcholinesterázy. *Vojenské zdravotnické listy* **72**:37-44.



- Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Aster JC. 2014. Robbins and Cotran pathologic basis of disease, professional edition e-book. Elsevier health sciences.
- Lamoral-Theys D et al. 2009. Lycorine, the Main Phenanthridine Amaryllidaceae Alkaloid, Exhibits Significant Antitumor Activity in Cancer Cells That Display Resistance to Proapoptotic Stimuli: An Investigation of Structure–Activity Relationship and Mechanistic Insight. *Journal of Medicinal Chemistry* **52**:6244-6256.
- Lee C-H, Wu S-L, Chen J-C, Li C-C, Lo H-Y, Cheng W-Y, Lin J-G, Chang Y-H, Hsiang C-Y, Ho T-Y. 2008. Eriobotrya japonica leaf and its triterpenes inhibited lipopolysaccharide-induced cytokines and inducible enzyme production via the nuclear factor- $\kappa$ B signaling pathway in lung epithelial cells. *The American journal of Chinese medicine* **36**:1185-1198.
- Levy BD. 2010. Resolvins and protectins: natural pharmacophores for resolution biology. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids (PLEFA)* **82**:327-332.
- Lim H, Lee JG, Lee SH, Kim YS, Kim HP. 2008. Anti-inflammatory activity of phylligenin, a lignan from the fruits of *Forsythia koreana*, and its cellular mechanism of action. *Journal of ethnopharmacology* **118**:113-117.
- Lima AS, Alvim HGO. 2018. Review on non-steroid antiinflammatory: Acetylsalicylic acid. *Rev. Inic. Ciente. Ext* **1**:169-174.
- Liu H-P, Gao Z-H, Cui S-X, Sun D-F, Wang Y, Zhao C-R, Lou H-X, Qu X-J, Abdel-Naim AB. 2012. Inhibition of Intestinal Adenoma Formation in APCMin/+ Mice by Riccardin D, a Natural Product Derived from Liverwort Plant *Dumortiera hirsuta*. *PLoS ONE* **7**.
- Liu J, Li Y, Tang LJ, Zhang GP, Hu WX. 2007. Treatment of lycorine on SCID mice model with human APL cells. *Biomedicine & pharmacotherapy* **61**:229-234.
- Liu J, Wang Z-T, Ge B-X. 2008. Andrograpanin, isolated from *Andrographis paniculata*, exhibits anti-inflammatory property in lipopolysaccharide-induced macrophage cells through down-regulating the p38 MAPKs signaling pathways. *International Immunopharmacology* **8**:951-958.
- Liu Z-M, Huang X-Y, Cui M-R, Zhang X-D, Chen Z, Yang B-S, Zhao X-K. 2015. Amaryllidaceae alkaloids from the bulbs of *Lycoris radiata* with cytotoxic and anti-inflammatory activities. *Fitoterapia* **101**:188-193.
- Long M, Ponder A. 2013. A clinical review of recent findings in the epidemiology of inflammatory bowel disease. *Clinical Epidemiology* **5**:237-247.
- Lopez-Garcia E, Schulze MB, Meigs JB, Manson JAE, Rifai N, Stampfer MJ, Willett WC, Hu FB. 2005. Consumption of trans fatty acids is related to plasma biomarkers of inflammation and endothelial dysfunction. *The Journal of nutrition* **135**:562-566.
- Machocho A, Chhabra SC, Viladomat F, Codina C, Bastida J. 1999. Alkaloids from *Ammocharis tinneana*. *Phytochemistry* **51**:1185-1191.
- Maione F, Russo R, Khan H, Mascolo N. 2016. Medicinal plants with anti-inflammatory activities. *Natural product research* **30**:1343-1352.

- Marshall JS, Warrington R, Watson W, Kim HL. 2018. An introduction to immunology and immunopathology. *Allergy, Asthma & Clinical Immunology* **14**:1-10.
- Masi M et al. 2015. Jonquiline, a new pretazettine-type alkaloid isolated from *Narcissus jonquilla* quail, with activity against drug-resistant cancer. *Fitoterapia* **102**:41-48.
- Mazidi M, Gao H-kai, Kengne AP. 2017. Inflammatory Markers Are Positively Associated with Serum trans -Fatty Acids in an Adult American Population. *Journal of Nutrition and Metabolism* **2017**:1-6.
- Medzhitov R. 2008. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* **454**:428-435.
- Medzhitov R. 2010. Inflammation 2010: new adventures of an old flame. *Cell* **140**:771-776.
- Mencarelli A, Renga B, Palladino G, Distrutti E, Fiorucci S. 2009. The plant sterol guggulsterone attenuates inflammation and immune dysfunction in murine models of inflammatory bowel disease. *Biochemical pharmacology* **78**:1214-1223.
- Miyagaki T, Sugaya M. 2015. Recent advances in atopic dermatitis and psoriasis: genetic background, barrier function, and therapeutic targets. *Journal of Dermatological Science* **78**:89-94.
- Mozaffarian D, Clarke R. 2009. Quantitative effects on cardiovascular risk factors and coronary heart disease risk of replacing partially hydrogenated vegetable oils with other fats and oils. *European journal of clinical nutrition* **63**:S22-S33.
- Munroe ME, Businga TR, Kline JN, Bishop GA. 2010. Anti-inflammatory effects of the neurotransmitter agonist Honokiol in a mouse model of allergic asthma. *The Journal of Immunology* **185**:5586-5597.
- Nair JJ, Aremu AO, van Staden J. 2011. Isolation of narciprimine from *Cyrtanthus contractus* (Amaryllidaceae) and evaluation of its acetylcholinesterase inhibitory activity. *Journal of Ethnopharmacology* **137**:1102-1106.
- Nair JJ, Bastida J, Codina C, Viladomat F, van Staden J. 2013. Alkaloids of the South African Amaryllidaceae: a review. *Natural product communications* **8**.
- Nair JJ, van Staden J. 2012. Acetylcholinesterase inhibition within the lycorine series of Amaryllidaceae alkaloids. *Natural product communications* **7**.
- Nair JJ, van Staden J. 2014. Cytotoxicity studies of lycorine alkaloids of the Amaryllidaceae. *Natural product communications* **9**.
- Nanri A, Moore MA, Kono S. 2007. Impact of C-reactive protein on disease risk and its relation to dietary factors: literature review. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* **8**:167.
- Ndhlala AR, Finnie JF, Van Staden J. 2011. Plant composition, pharmacological properties and mutagenic evaluation of a commercial Zulu herbal mixture: Imbiza ephuzwato. *Journal of Ethnopharmacology* **133**:663-674.
- Nicastro HL, Mondul AM, Rohrmann S, Platz EA. 2013. Associations between urinary soy isoflavonoids and two inflammatory markers in adults in the United States in 2005–2008. *Cancer Causes & Control* **24**:1185-1196.

- Noh HJ, Hwang D, Lee ES, Hyun JW, Yi PH, Kim GS, Lee SE, Pang C, Park YJ, Chung KH. 2015. Anti-inflammatory activity of a new cyclic peptide, citrusin XI, isolated from the fruits of *Citrus unshiu*. *Journal of ethnopharmacology* **163**:106-112.
- Nunes C dos R, Barreto Arantes M, Menezes de Faria Pereira S, Leandro da Cruz L, de Souza Passos M, Pereira de Moraes L, Vieira IJC, Barros de Oliveira D. 2020. Plants as Sources of Anti-Inflammatory Agents. *Molecules* **25**:1-22.
- Olszak T et al. 2012. Microbial Exposure During Early Life Has Persistent Effects on Natural Killer T Cell Function. *Science* **336**:489-493.
- Pádua TA, de Abreu BSSC, Costa TEMM, Nakamura MJ, Valente LMM, das Graças Henriques M, Siani AC, Rosas EC. 2014. Anti-inflammatory effects of methyl ursolate obtained from a chemically derived crude extract of apple peels: potential use in rheumatoid arthritis. *Archives of pharmacal research* **37**:1487-1495.
- Panthong A, Kanjanapothi D, Thitiponpant Y, Taesotikul T, Arbain D. 1998. Anti-inflammatory activity of the alkaloid bukittinggine from *Sapium baccatum*. *Planta medica* **64**:530-535.
- Park JB. 2014. Synthesis and characterization of norbelladine, a precursor of Amaryllidaceae alkaloid, as an anti-inflammatory/anti-COX compound. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **24**:5381-5384.
- Pober JS, Sessa WC. 2007. Evolving functions of endothelial cells in inflammation. *Nature Reviews Immunology* **7**:803-815.
- Presley CC, Krai P, Dalal S, Su Q, Cassera M, Goetz M, Kingston DGI. 2016. New potently bioactive alkaloids from *Crinum erubescens*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **24**:5418-5422.
- Ramawat KG, Mérillon J-M. 2013. Natural products: phytochemistry, botany and metabolism of alkaloids, phenolics and terpenes: phytochemistry, botany and metabolism of alkaloids, phenolics and terpenes. Springer.
- Ratheesh M, Sindhu G, Helen A. 2013. Anti-inflammatory effect of quinoline alkaloid skimmianine isolated from *Ruta graveolens* L. *Inflammation research* **62**:367-376.
- Refaat J, Kamel MS, Ramadan MA, Ali AA. 2012. *Crinum*; an endless source of bioactive principles: a review. Part 1-*Crinum* alkaloids: lycorine-type alkaloids. *International journal of pharmaceutical sciences and research* **3**:1883.
- Ribeiro VP, Arruda C, Abd El-Salam M, Bastos JK. 2018. Brazilian medicinal plants with corroborated anti-inflammatory activities: A review. *Pharmaceutical biology* **56**:253-268.
- Rice JB, White AG, Scarpati LM, Wan G, Nelson WW. 2017. Long-term systemic corticosteroid exposure: a systematic literature review. *Clinical therapeutics* **39**:2216-2229.
- Rice-Evans C, Miller N, Paganga G. 1997. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in plant science* **2**:152-159.

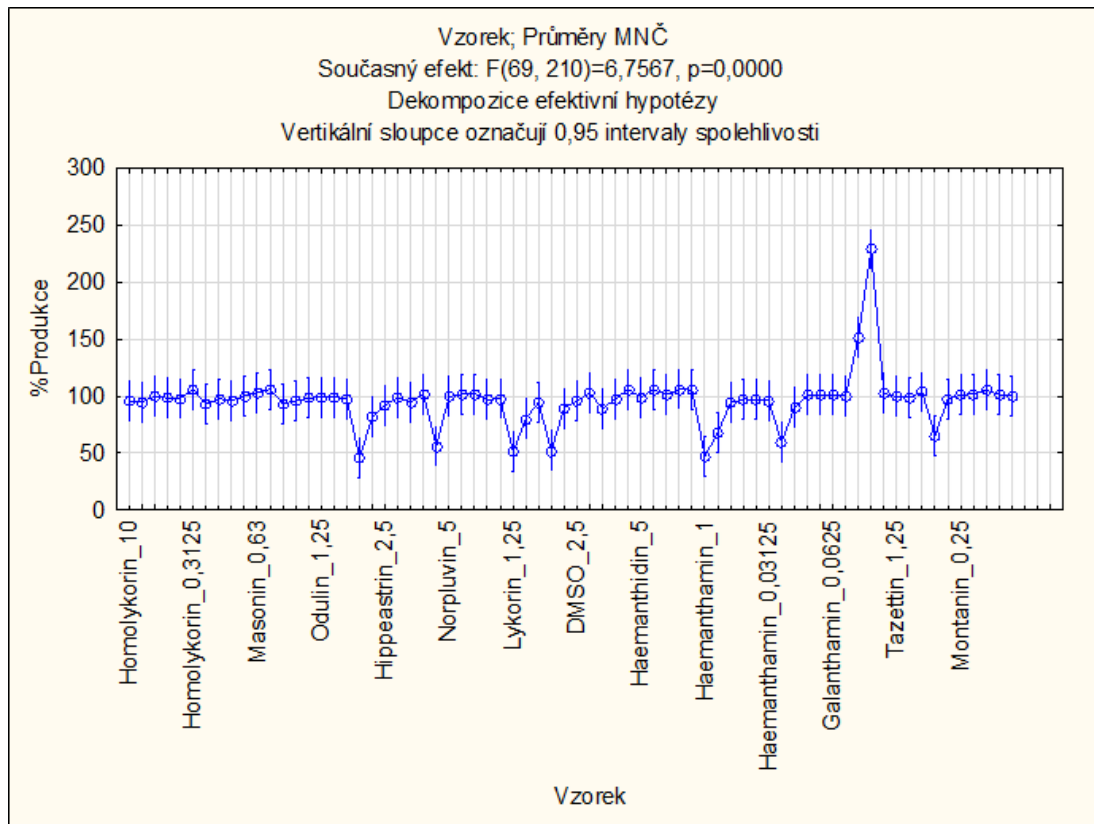
- Ricker MA, Haas WC. 2017. Anti-inflammatory diet in clinical practice: a review. *Nutrition in Clinical Practice* **32**:318-325.
- Rivera DG, Balmaseda IH, León AA, Hernández BC, Montiel LM, Garrido GG, Hernández RD, Cuzzocrea S. 2006. Anti-allergic properties of *Mangifera indica* L. extract (Vimang) and contribution of its glucosylxanthone mangiferin. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **58**:385-392.
- Roy A. 2017. A review on the alkaloids an important therapeutic compound from plants. *IJPB* **3**:1-9.
- Saklani A, Hegde B, Mishra P, Singh R, Mendon M, Chakrabarty D, Kamath DV, Lobo A, Mishra PD, Dagia NM. 2012. NF- $\kappa$ B dependent anti-inflammatory activity of chlorojanerin isolated from *Saussurea heteromalla*. *Phytomedicine* **19**:988-997.
- Sangaleti CT et al. 2021. The Cholinergic Drug Galantamine Alleviates Oxidative Stress Alongside Anti-inflammatory and Cardio-Metabolic Effects in Subjects With the Metabolic Syndrome in a Randomized Trial. *Frontiers in Immunology* **12**:1-12.
- Sears B. 2015. Anti-inflammatory diets. *Journal of the American College of Nutrition* **34**:14-21.
- Simopoulos AP. 2016a. An increase in the omega-6/omega-3 fatty acid ratio increases the risk for obesity. *Nutrients* **8**:128.
- Simopoulos AP. 2016b. Evolutionary aspects of the dietary omega-6/omega-3 fatty acid Ratio: Medical implications. 119-134 in *Evolutionary thinking in medicine*. Springer.
- Steglich W, Fugmann B, Lang-Fugmann S. 2000. *Römpp encyclopedia natural products*. Georg Thieme Verlag.
- Stone KD, Prussin C, Metcalfe DD. 2010. IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **125**:S73-S80.
- Sugimoto MA, Sousa LP, Pinho V, Perretti M, Teixeira MM. 2016. Resolution of inflammation: what controls its onset? *Frontiers in immunology* **7**:160.
- Swindle EJ, Metcalfe DD. 2007. The role of reactive oxygen species and nitric oxide in mast cell-dependent inflammatory processes. *Immunological reviews* **217**:186-205.
- Tomassetti S, Piciocchi S, Tantalocco P, Dubini A, Poletti V. 2015. The multidisciplinary approach in the diagnosis of idiopathic pulmonary fibrosis: a patient case-based review. *European Respiratory Review* **24**:69-77.
- Toriizuka Y, Kinoshita E, Kogure N, Kitajima M, Ishiyama A, Otoguro K, Yamada H, Ōmura S, Takayama H. 2008. New lycorine-type alkaloid from *Lycoris traubii* and evaluation of antitrypanosomal and antimalarial activities of lycorine derivatives. *Bioorganic & medicinal chemistry* **16**:10182-10189.
- Turner MD, Nedjai B, Hurst T, Pennington DJ. 2014. Cytokines and chemokines: at the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research* **1843**:2563-2582.

- Turvey SE, Broide DH. 2010. Innate immunity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **125**:S24-S32.
- Van Goietsenoven G, Andolfi A, Lallemand B, Cimmino A, Lamoral-Theys D, Gras T, Abou-Donia A, Dubois J, Lefranc F, Mathieu V. 2010. Amaryllidaceae alkaloids belonging to different structural subgroups display activity against apoptosis-resistant cancer cells. *Journal of natural products* **73**:1223-1227.
- Van Vliet T, Katan MB. 1990. Lower ratio of n-3 to n-6 fatty acids in cultured than in wild fish. *The American journal of clinical nutrition* **51**:1-2.
- Virshette SJ, Patil MK, Somkuwar AP. 2019. A review on medicinal plants used as anti-inflammatory agents. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* **8**:1641-1646.
- Waller GR, Nowacki EK. 1978. The role of alkaloids in plants. 143-181 in *Alkaloid Biology and Metabolism in Plants*. Springer.
- Wang J-H, Yang X-Y, Du G-H. 2018a. Ephedrine. 231-235 in *Natural Small Molecule Drugs from Plants*. Springer.
- Wang L, Du L-D, Du G-H. 2018b. Caffeine. 199-204 in *Natural Small Molecule Drugs from Plants*. Springer.
- Wen L, Yuan Y-H, Kong L-L, Chen N-H. 2018. Quinine. *Natural Small Molecule Drugs from Plants*:613-618. Springer.
- Willcox DC, Willcox BJ, Todoriki H, Suzuki M. 2009. The Okinawan diet: health implications of a low-calorie, nutrient-dense, antioxidant-rich dietary pattern low in glycemic load. *Journal of the American College of Nutrition* **28**:500S-516S.
- Wink M, Roberts MF. 1998. *Alkaloids: biochemistry, ecology, and medicinal applications: biochemistry, ecology, and medicinal applications*. Plenum Press.
- Wu G-J, Shiu S-M, Hsieh M-C, Tsai G-J. 2016. Anti-inflammatory activity of a sulfated polysaccharide from the brown alga *Sargassum cristaefolium*. *Food Hydrocolloids* **53**:16-23.
- Wu SH, Shu XO, Chow W-H, Xiang Y-B, Zhang X, Li H-L, Cai Q, Ji B-T, Cai H, Rothman N. 2012. Soy food intake and circulating levels of inflammatory markers in Chinese women. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics* **112**:996-1004.
- Xiong J, Liu X-H, Bui V-B, Hong Z-L, Wang L-J, Zhao Y, Fan H, Yang G-X, Hu J-F. 2014. Phenolic constituents from the leaves of *Cratoxylum formosum* ssp. *pruniflorum*. *Fitoterapia* **94**:114-119.
- Yang HJ, Youn HS, Seong KM, Yun YJ, Kim W, Kim YH, Lee JY, Kim CS, Jin Y-W, Youn BH. 2011. Psoralidin, a dual inhibitor of COX-2 and 5-LOX, regulates ionizing radiation (IR)-induced pulmonary inflammation. *Biochemical pharmacology* **82**:524-534.
- Yang Z-H, Wang S-B, Du G-H. 2018. Ajmaline. 5-11 in *Natural Small Molecule Drugs from Plants*. Springer.

Zhang H-F, Fang L-H, Du G-H. 2018. Anisodamine. 13-18 in Natural Small Molecule Drugs from Plants. Springer.

## 9 Samostatné přílohy

**Příloha 1:** Grafické znázornění produkce NO.



**Příloha 2:** Statistické hodnocení vlivu alkaloidů při určité koncentraci na produkci NO.

Jednorozměrné testy významnosti pro %Produkce (Tabulka12)					
Sigma-omezená parametrizace					
Dekompozice efektivní hypotézy					
Efekt	SČ	Stupně volnosti	PČ	F	p
Abs. člen	2585217	1	2585217	8342,462	0,00
Vzorek	144473	69	2094	6,757	0,00
Chyba	65076	210	310		



**Příloha 3: Statistické hodnocení vlivu alkaloidů na produkci NO.**

		Tukeyův HSD test; proměnná %Produkce (Tabulka 12) Homogenní skupiny, alfa = ,05000 (Neúplné vyhledávání) Chyba: meziskup. PČ = 309,89, sv = 210,00							
Č. buňky	Vzorek	%Produkce Průměr	1	2	3	4	5	6	7
19	Hippeastrin_10	45,7182	****						
46	Haemanthamin_1	47,3397	****	****					
31	Lykorin_1,25	50,9737	****	****	****				
34	DMSO_10	52,0572	****	****	****	****			
25	Norpluvin_10	56,1885	****	****	****	****	****		
52	Galanthamin_1	59,3970	****	****	****	****	****		
64	Montanin_1	65,3258	****	****	****	****	****	****	
47	Haemanthamin_0,5	67,9413	****	****	****	****	****		
32	Lykorin_0,63	79,9172	****	****	****	****	****		
20	Hippeastrin_5	81,8705	****	****	****	****	****		
38	DMSO_0,63	88,8862	****	****	****	****	****		
35	DMSO_5	89,4906	****	****	****	****	****		
53	Galanthamin_0,5	89,6770	****	****	****	****	****		
21	Hippeastrin_2,5	92,3303	****	****	****	****	****		
7	Masonin_10	93,1735	****	****	****	****	****		
13	Odulin_10	93,5298	****	****	****	****	****		
48	Haemanthamin_0,25	93,9551	****	****	****	****	****		
23	Hippeastrin_0,63	94,2295	****	****	****	****	****		
33	Lykorin_0,3125	94,5121	****	****	****	****	****		
2	Homolykorin_5	95,0466	****	****	****	****	****		
1	Homolykorin_10	95,2930	****	****	****	****	****		
36	DMSO_2,5	95,8501	****	****	****	****	****		
14	Odulin_5	95,8775	****	****	****	****	****		
51	Haemanthamin_0,03125	96,1768	****	****	****	****	****		
9	Masonin_2,5	96,4394	****	****	****	****	****		
29	Norpluvin_0,63	96,6916	****	****	****	****	****		
50	Haemanthamin_0,0625	97,0814	****	****	****	****	****		
49	Haemanthamin_0,125	97,3888	****	****	****	****	****		
8	Masonin_5	97,5494	****	****	****	****	****		
18	Odulin_0,3125	97,5821	****	****	****	****	****		
65	Montanin_0,5	97,5935	****	****	****	****	****		
39	DMSO_0,3125	97,7075	****	****	****	****	****		
30	Norpluvin_0,3125	97,8986	****	****	****	****	****		
5	Homolykorin_0,63	97,9481	****	****	****	****	****		
4	Homolykorin_1,25	98,4322	****	****	****	****	****		
15	Odulin_2,5	98,5168	****	****	****	****	****		
62	Tazettin_0,63	98,6876	****	****	****	****	****		
22	Hippeastrin_1,25	98,9366	****	****	****	****	****		
16	Odulin_1,25	99,0964	****	****	****	****	****		
41	Haemanthidin_5	99,1484	****	****	****	****	****		
17	Odulin_0,63	99,2076	****	****	****	****	****		
61	Tazettin_1,25	99,5335	****	****	****	****	****	****	
26	Norpluvin_5	99,6118	****	****	****	****	****	****	
3	Homolykorin_2,5	99,7021	****	****	****	****	****	****	
70	Kontrola	100,0000	****	****	****	****	****	****	
57	Galanthamin_0,03125	100,0072	****	****	****	****	****	****	
10	Masonin_1,25	100,1027	****	****	****	****	****	****	
54	Galanthamin_0,25	101,0298	****	****	****	****	****	****	
43	Haemanthidin_1,25	101,0373	****	****	****	****	****	****	
66	Montanin_0,25	101,0494	****	****	****	****	****	****	
55	Galanthamin_0,125	101,0611	****	****	****	****	****	****	
56	Galanthamin_0,0625	101,1924	****	****	****	****	****	****	
69	Montanin_0,03125	101,5793	****	****	****	****	****	****	
27	Norpluvin_2,5	101,7452	****	****	****	****	****	****	
24	Hippeastrin_0,3125	101,7712	****	****	****	****	****	****	
67	Montanin_0,125	101,8677	****	****	****	****	****	****	
28	Norpluvin_1,25	101,9554	****	****	****	****	****	****	
60	Tazettin_2,5	102,4954	****	****	****	****	****	****	
37	DMSO_1,25	102,9163	****	****	****	****	****	****	
11	Masonin_0,63	103,3483	****	****	****	****	****	****	
63	Tazettin_0,3125	103,5933	****	****	****	****	****	****	
68	Montanin_0,0625	105,0534	****	****	****	****	****	****	
45	Haemanthidin_0,3125	105,3406	****	****	****	****	****	****	
42	Haemanthidin_2,5	105,6791	****	****	****	****	****	****	
6	Homolykorin_0,3125	105,7870	****	****	****	****	****	****	
40	Haemanthidin_10	105,9735	****	****	****	****	****	****	
12	Masonin_0,3125	106,0112	****	****	****	****	****	****	
44	Haemanthidin_0,63	106,2955	****	****	****	****	****	****	
58	Tazettin_10	150,9913	****	****	****	****	****	****	
59	Tazettin_5	228,7695	****	****	****	****	****	****	****