

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

RIGORÓZNÍ PRÁCE

SCREENINGOVÁ STUDIE RŮZNÝCH ROSTLINNÝCH TAXONŮ A JEJICH
VLIV NA LIDSKÉ ENZYMATICKÉ SYSTÉMY II.

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

Vedoucí katedry: Prof. Ing. Lucie Cahlíková, Ph.D.

Praha, duben 2022

MUDr. et Mgr. Lucie Richter

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

RIGOROUS THESIS

SCREENING STUDY OF SEVERAL PLANT SPECIES AND THEIR EFFECT
ON HUMAN ENZYMATIC SYSTEMS II.

Supervisor: PharmDr. Marcela Šafratová, Ph.D.

Head of Department: Prof. Ing. Lucie Cahlíková, Ph.D.

Prague, April 2022

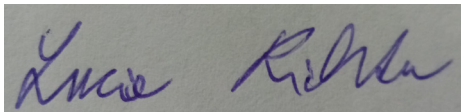
MUDr. et Mgr. Lucie Richter

PODĚKOVÁNÍ

Chtěla bych moc poděkovat vedoucí této práce PharmDr. Marcelu Šafratové, Ph.D. za všestrannou podporu a vstřícnost, cenné rady při práci v laboratoři i při orientaci v literárních databázích a za pomoc s interpretací naměřených výsledků. Velmi děkuji také prof. RNDr. Lubomíru Opletalovi, CSc. za změření biologických aktivit připravených extraktů a laskavé předvedení a vysvětlení tohoto měření. Dále děkuji RNDr. Radimu Havelekovi, Ph.D., z Ústavu lékařské biochemie Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové, za stanovení cytotoxicit proti vybraným buněčným liniím a Mgr. Daniele Hulcové za ochotnou a milou asistenci v laboratoři. Velké poděkování patří i mé rodině, bez jejíž podpory a pomoci s péčí o mé tři děti by napsání této práce nebylo možné.

PROHLÁŠENÍ

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

A rectangular box containing a handwritten signature in blue ink. The signature is written in a cursive style and appears to read 'Lucie Richter'.

MUDr. et Mgr. Lucie Richter

V Praze, 14. dubna 2022

OBSAH

I.	Úvod	8
II.	Cíl práce	10
III.	Teoretická část	11
	III.1 Přírodní látky v léčbě Alzheimerovy choroby	11
	III.2 Přírodní látky v protinádorové terapii	16
	III.3 Popis biologického materiálu a jeho biologická aktivita.....	21
	III.3.1 <i>Geissospermum vellosii</i> (laeve) (kůra).....	21
	III.3.2 <i>Calotropis gigantea</i> (nať).....	28
	III.3.3 <i>Cissampelos pareira</i> (stonek).....	31
	III.3.4 <i>Viola sebifera</i> (kůra)	35
	III.3.5 <i>Viola surinamensis</i> (kůra)	37
IV.	Experimentální část.....	40
	IV.1 Všeobecné postupy	40
	IV.1.1 Úprava rozpouštědel před používáním	40
	IV.1.2 Odpařování roztoků a sušení extraktů	40
	IV.1.3 Obecné podmínky provedení tenkovrstvé chromatografie (TLC).....	40
	IV.2 Potřeby	40
	IV.2.1 Pro přípravu extraktů, TLC A GC/MS analýzu.....	40
	IV.2.2 Pro stanovení anticholinesterasové aktivity	42
	IV.3 Izolace.....	44
	IV.3.1 Biologický materiál	44
	IV.3.2 Příprava sumárního extraktu	44
	IV.3.3 Příprava alkaloidního extraktu pro screening	45
	IV.3.4 Kontrolní tenkovrstvá chromatografie	46
	IV.3.5 GC/MS analýza alkaloidního extraktu	46
	IV.3.6 Stanovení biologické aktivity alkaloidního extraktu na inhibici acetylcholinesterasy a butyrylcholinesterasy	47
	IV.3.7 Stanovení protinádorové aktivity alkaloidního extraktu	48
V.	Výsledky	50
	V.1 Příprava alkaloidních extraktů	50

V.2	Kontrolní tenkovrstvá chromatografie	51
V.3	GC/MS analýza alkaloidních extraktů	52
V.4	Stanovení biologické aktivity alkaloidních extraktů na inhibici acetylcholinesterasy a butyrylcholinesterasy	53
V.5	Stanovení protinádorové aktivity alkaloidních extraktů	54
VI.	Diskuse	55
VII.	Literatura	58
VIII.	Abstrakt	68
IX.	Abstract	69

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ACh	acetylcholin
AChE	acetylcholinesterasa
AChEI	inhibitor acetylcholinesterasy
AD	Alzheimerova choroba
BuChE	butyrylcholinesterasa
CHCl ₃	chloroform
DCM	dichlormetan
DMSO	dimethylsulfoxid
DTNB	5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina
Et ₂ NH	diethylamin
EtOAc	ethylacetát
EtOH	ethanol
GC/MS	plynová chromatografie/hmotnostní spektrometrie
HCl	kyselina chlorovodíková
ChEI	inhibitory cholinesteras
IS	imunitní systém
MeOH	methanol
Na ₂ CO ₃	uhličitan sodný
Na ₂ SO ₄	síran sodný
NGF	nervový růstový faktor
NMDA	N-methyl-D-aspartátový receptor
NÚ	nežádoucí účinky
RA	scavenger receptor
RAGE	receptor pro finální produkty pokročilé glykace
TLC	tenkovrstvá chromatografie
To	toluen

I. ÚVOD

Rostliny produkují velmi rozmanitou škálu sekundárních metabolitů, tedy látek, které se přímo nepodílí na jejich růstu či rozmnožování, ale hrají významnou roli zejména při jejich adaptaci na podmínky vnějšího prostředí. Pro člověka jsou sekundární metabolity rostlin odedávna zdrojem léčiv, aromatických látek, barviv a mnoha dalších produktů. Přestože již bylo izolováno více než 100 000 látek a každý rok přibývá asi 4 000 dalších, dosud byla z tohoto hlediska chemicky prozkoumána jen asi 4 % rostlinných druhů.¹

Alkaloidy jsou terapeuticky nejvýznamnější skupinou sekundárních metabolitů rostlin. Jedná se o rozsáhlou a pestrou skupinu látek, v jejichž struktuře se obvykle vyskytuje heterocyklicky vázaný dusík, který je zdrojem bazicity. Celá řada účinků alkaloidů (často velmi silných a specifických) se již využívá k léčebným účelům – např. jako analgetika, lokální anestetika, narkotika, antiarytmika, chemoterapeutika, antiparazitika a anticholinergika.²

Pátrání po nových účinných látkách začíná etnobotanickým průzkumem - studiem informací o rostlinách používaných k léčbě v různých tradičních systémech. U rostlin podezřelých ze zamýšleného účinku následuje pokus o izolaci a identifikaci aktivních látek a ověření jejich farmakologické aktivity. Pokud látka projde úspěšně celým procesem testování včetně klinických studií, je třeba zajistit její produkci v množství pokrývajícím poptávku, a to při zohlednění ekonomické rentability. Pokud rostlina nevytváří požadovanou látku v dostatečném množství nebo nelze zajistit její obnovitelný zdroj, hledá se alternativní řešení, kterým může být jiný druh produkující stejnou látku, chemická syntéza látky nebo produkce látek *in vitro* pomocí buněčných a orgánových kultur.¹

Nejúspěšnějšími látkami v léčbě Alzheimerovy choroby (AD) jsou zatím centrálně působící inhibitory cholinesteras (ChEI). Využití alkaloidů jako ChEI začalo u alkaloidu fysostigminu a vědci se snažili o syntézu analogů s lepším klinickým profilem. V řadě rostlin byly nalezeny alkaloidy inhibující ChEI, např. *Galanthus nivalis*, *Huperzia serrata* nebo *Evodia rutaecarpa*. Problémem mnoha nadějných kandidátů však zůstávají periferní cholinergní nežádoucí účinky (NÚ), hepatotoxicita nebo špatná biologická dostupnost a tak stále probíhá hledání vhodnějších³, jehož drobnou součástí je i tato práce.

V terapii zhoubných nádorů zaujímají látky objevené v rostlinách také významné místo a podnětem pro jejich zkoumání může být používání v tradičních systémech léčby.

V praxi se již po mnoho let používají alkaloidy *Vinca rosea* nebo komplexní sloučeniny rodu *Taxus* (taxany), obě skupiny působí interakcí s mitotickým vřeténkem. Z noholistů (*Podophyllum peltatum*), mezi laiky známějšího pod názvem mandragora, pocházejí inhibitory topoizomerasy – etoposid a teniposid. Další inhibitory topoizomerasy, topotekan a irinotekan, byly odvozeny od přírodního alkaloidu kamptotecinu.^{4,5} Přírodní cytostatika mohou být velmi užitečná také v kombinaci se standardními chemoterapeutiky, a to na základě aditivního nebo synergického působení, které zajistí lepší léčebný efekt nebo umožní podání nižších a bezpečnějších dávek. Klasickým příkladem může být využití kombinace taxanu a platiny v léčbě karcinomu ovarií, dosahující mnohem lepších výsledků než podání jednotlivých látek, která se již před několika desetiletími stala standardním režimem v této indikaci. Jedním z problémů terapie je i schopnost zhoubných nádorů vyvinout postupně rezistenci k aplikované léčbě a relabovat.⁶ I proto je stále potřeba hledat další rostlinná cytostatika, účinnější a méně toxická, k čemuž se snaží přispět i tato práce.

II. CÍL PRÁCE

Tato práce je součástí výzkumné série katedry farmakognosie a farmaceutické botaniky, usilující o zjištění přítomnosti alkaloidů v předem vytipovaných rostlinných taxonech a o předběžný odhad jejich potenciálu využití jako léčiv s anticholinesterasovou nebo cytotoxickou aktivitou.

Práce si klade za cíl splnění následujících bodů:

1. Zpracování literární rešerše k vybraným druhům rostlin (zaměřeno na obsahové látky a biologické účinky)
2. Příprava sumárních extraktů a alkaloidních extraktů
3. Analýza alkaloidních extraktů plynovou chromatografií/hmotnostní spektrometrií (GC/MS)
4. Stanovení biologické aktivity alkaloidních extraktů na inhibici acetylcholinesterasy (AChE) a butyrylcholinesterasy (BuChE)
5. Stanovení protinádorové aktivity alkaloidního extraktu
6. Vyhodnocení výsledků a sepsání práce

III. TEORETICKÁ ČÁST

III.1 PŘÍRODNÍ LÁTKY V LÉČBĚ ALZHEIMEROVY CHOROBY

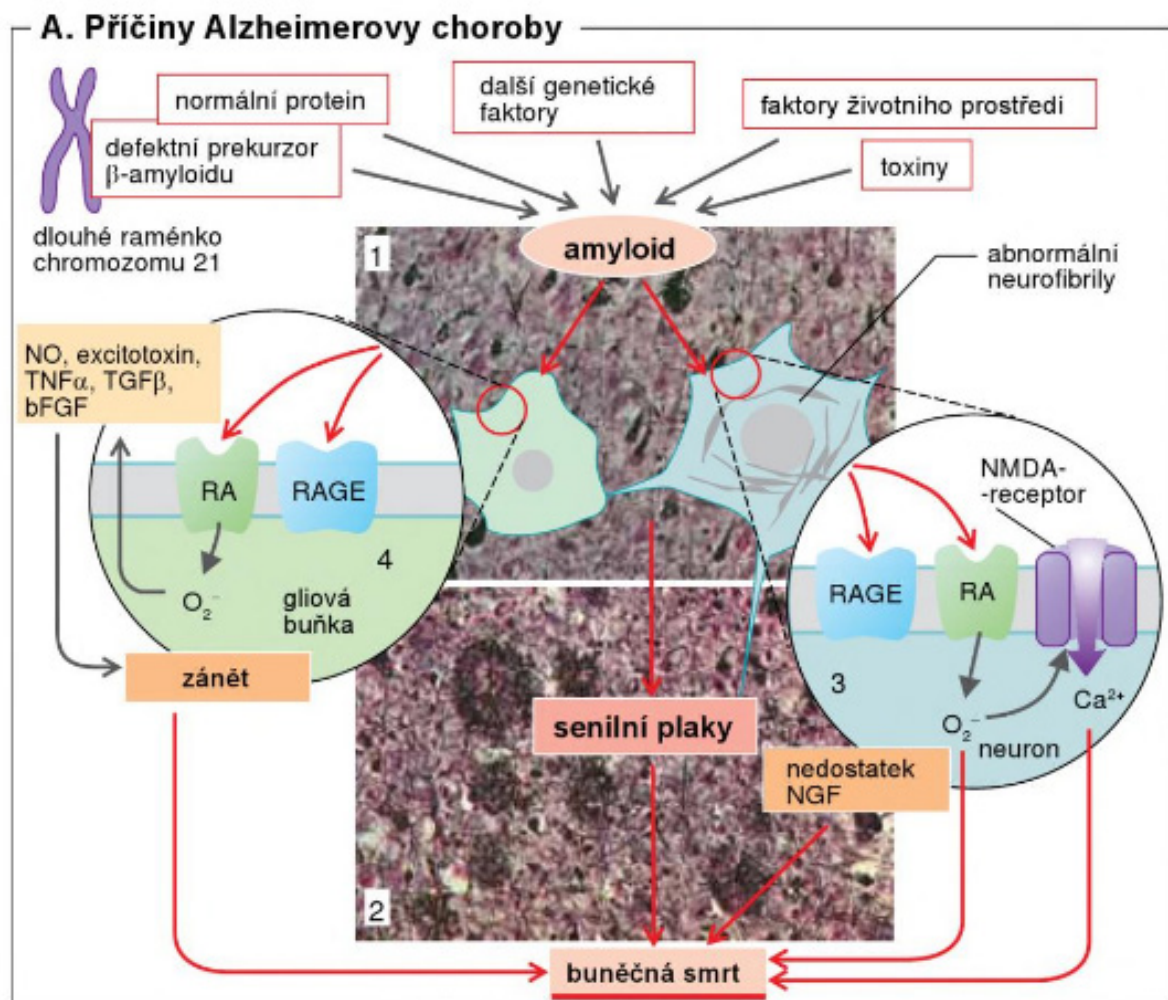
AD je závažné neurodegenerativní onemocnění, klinicky se projevující vývojem demence a vedoucí až ke smrti.⁷ Výskyt AD dramaticky stoupá s rostoucím věkem a odhaduje se, že 30-50 % osob ve věku nad 80 let trpí ve větší či menší míře příznaky AD. V roce 2006 bylo na světě 26,6 milionů diagnostikovaných případů a odhaduje se, že do roku 2050 to bude dokonce čtyřikrát více.⁸

V patofyziologii AD se uplatňují genetické i zevní faktory (např. nejspíše toxiny prostupující do mozku přes čichový nerv). Byly nalezeny různé genetické defekty na různých chromozomech, např. vadný gen na chromozomu 21 pro prekursor β -amyloidu (při trisomii chromozomu 21 – Downově syndromu – je také častý vývoj demence s depozity amyloidu) nebo určitá forma apolipoproteinu E (APOE4). Rozdílné genové mutace a zevní faktory mají obdobný výsledek – vedou k usazování amyloidu v určitých částech mozku a tím k vytváření extracelulárních senilních plaků a také k tvorbě abnormálních intracelulárních neurofibril.

Během těchto patologických procesů dochází k zániku neuronů v postižených oblastech. Peptidy β -amyloidu mohou reagovat s receptory RAGE (receptor pro finální produkty pokročilé glykace), RA (scavenger receptor) a NMDA (N-metyl-D-aspartátový receptor) na neuronech, čímž se spouštějí kaskády podporující smrt neuronů. Aktivace RAGE a RA na mikroglialních buňkách stimuluje uvolněním NO, prostaglandinů, cytokinů, tumor necrosis faktoru (TNF α) - a dalších působků - tvorbu zánětu, který také postihuje neurony. Při nedostatku nervového růstového faktoru (NGF) nebo jeho receptorů může být zánik neuronů ještě více urychlen.

Zánik nervových buněk, zejména cholinergních neuronů, je provázen sníženou tvorbou a koncentrací neurotransmiterů, obzvláště acetylcholinu (ACh). V kůře velkého mozku a v hipokampu bývá až o 90% snížená koncentrace cholin acetyltransferasy, která je nutná k tvorbě ACh. Klesají i koncentrace např. noradrenalinu, serotoninu a dalších neurotransmiterů.⁹ Je snížen také počet nikotinových acetylcholinergních receptorů, narozdíl od muskarinových. Poměr dvou forem AChE je změněn ve prospěch formy G1, která je ve zdravém mozku minoritní oproti majoritní G4. V oblastech senilních plaků se vytvářejí také BuChE odbourávající ACh. Molekuly cholinesteras byly v mozku nalezeny i mimo lokalizaci

acetylcholinergních vláken a odhaduje se, že se podílejí na tvorbě a toxicitě β -amyloidu. Porušení centrálního acetylcholinergního systému má mimo jiné značný dopad na mechanismy paměti. Obrázek 1 ukazuje v přehledu některé příčiny AD.



Obr. 1: Příčiny Alzheimerovy choroby⁹

S postupující progresí AD dochází k postižení glutamatergního systému mozku, který je rovněž velmi důležitý pro mechanismy učení a paměti (zprostředkovává postupné zesilování postsynaptického potenciálu při opakovaném působení stejného podnětu). Při pokročilé AD se nadměrně uvolňují molekuly glutamátu a dalších excitačních kyselin, což způsobuje „šumy“ na receptoru NMDA, znemožňující přenos správných signálů. Navíc mohou spustit apoptózu buňky.⁷ K tomu dochází při aktivaci NMDA receptorů lokalizovaných mimo synapsi.¹⁰

Údajně v době, kdy se u pacienta projeví klinické příznaky, již docházelo k ukládání β -amyloidu 15-20 let.¹¹ Následkem neurodegenerativních změn se u pacienta postupně objevují stále větší výpadky paměti, nedbalost při osobní hygieně, fáze zmatenosti, neklid nebo letargie, v pozdní fázi také motorické výpadky, naprostá nesoběstačnost a smrt.⁹

Na AD zatím neexistuje kauzální léčba. Používanou farmakoterapii můžeme rozdělit na kognitivní (ovlivňující paměť, vnímání a pozornost, které jsou primárně postiženy) a nekognitivní (řešící přidružené poruchy chování, emocí či spánku). Dále je samozřejmě důležitá i léčba případných dalších somatických onemocnění, aktivace nemocného, reedukace základních návyků a dovedností, ošetřovatelská a rehabilitační péče.⁷ Dále uvádím přehled kognitivní léčby.

V kognitivní terapii AD již bylo zkoušeno mnoho různých typů látek. Několik z nich je pro nižší účinnost používáno spíše jako doplňková podpůrná léčba. Jedná se o látky uvolňující prekuzory ACh (např. sojové lecitiny), které pravděpodobně nedostatečně prostupují hematoencefalickou bariérou, látky zlepšující mozkový metabolismus, z nichž nejperspektivnější se zatím zdá být extrakt z *Ginkgo biloba*, látky likvidující volné kyslíkové radikály, kde uspokojujících výsledků v klinické studii dosáhl vitamin E, a prekuzory NGF (Cerebrolysin – hydrolyzát vepřové mozkové tkáně, podávaný v i.v. infuzích v půlročních intervalech).⁷ Nejúčinnějšími a standardně používanými léky první volby jsou v současné době 2 skupiny látek - centrálně působící inhibitory ChEI a parciální inhibitory NMDA.³

Centrálně působící ChEI se používají v terapii lehkých až středně pokročilých stádií AD. Zablokováním zejména AChE prodlužují vazbu ACh na receptory a tak zvyšují cholinergní přenos. Mají efekt zejména na oddálení přechodu AD do těžkých stádií, u některých pacientů přinášejí i dočasné výrazné zlepšení.⁷

Využití alkaloidů jako ChEI začalo u indolového alkaloidu fysostigminu, jako prototypu AChEI a vědci se snažili o syntézu analogů s použitelným klinickým profilem.³ Centrální ChEI musí dobře prostupovat hematoencefalickou bariérou, působit specificky na mozkové formy cholinesteras, být dobře tolerovány (nejčastější NÚ jsou nevolnost, zvracení a bradykardie) a nesmí být příliš rychle deaktivovány.⁷ V řadě rostlin byly nalezeny alkaloidy vykazující inhibiční aktivitu na AChE, BuChE, nebo obojí a jednou z nich je např. i *Geissospermum vellosii*. Problémem mnoha nadějných kandidátů však zůstávají periferní cholinergní NÚ, hepatotoxicita nebo špatná biologická dostupnost a tak stále probíhá hledání vhodnějších.³

V současnosti jsou u nás v klinickém použití 3 látky z této skupiny – donepezil, rivastigmin a galantamin. Jsou srovnatelně účinné. **Donepezil** se vyznačuje delším poločasem odbourávání, který umožňuje podávání p.o. jednou denně. **Rivastigmin** má výhodu dualisty - inhibuje AChE i BuChE.⁷ **Galantamin** byl poprvé izolován ze sněženy *Galanthus woronowi*, ale vyskytuje se ve všech druzích tohoto rodu i dalších rodech čeledi Amaryllidaceae. Pro terapeutické použití se vyrábí synteticky. Kromě účinné AChE inhibice rovněž allostericky moduluje nikotinové receptory, což zvyšuje hladinu ACh. V klinických studiích se používá jako standard AChE účinku.¹²

Parciální inhibitory NMDA cílí na zmírnění poruch v glutamátergním systému. V praxi se používá pouze **memantin**. Je určený především k léčbě středních až těžších stádií AD, velmi dobře tolerovaný a lze jej kombinovat s ChEI.⁷

Velmi perspektivní látkou v léčbě AD může být také huperzin A – alkaloid izolovaný z čínské rostliny *Huperzia serrata*. Jedná se o velmi silný AChEI a je také nekompetitivním antagonistou NMDA. Navíc má i antioxidantní a neuroprotektivní vlastnosti.¹⁰ Intenzita NÚ je slabší než u galantaminu a vyniká také výhodnějším farmakokinetickým profilem.¹² Dostupnost této látky z přírodního zdroje je omezená, vědecké týmy se proto snaží o získání syntetického analogu nebo derivátu, v případě derivátu hledají také modifikacemi huperzinu A nového NMDA antagonistu. V Číně byl huperzin A schválen pro léčbu AD již v roce 1994.¹⁰ V Evropě a USA stále registrovaný není, což naznačuje, jak obtížná je cesta k registraci i v případě takto nadějných látek. Mnoho dalších nadějných ChEI přírodního původu je předmětem výzkumu, nicméně samotná schopnost inhibice AChE samozřejmě nestačí k tomu, aby se látka mohla stát účinným a bezpečným léčivem, a tak mnoho látek během dlouhé cesty od izolace k registraci vypadne ze hry. Proto má smysl hledat stále další kandidáty.

Zároveň probíhají také výzkumy dalších možných mechanismů léčby AD (např. plasmaferézy, monoklonálních protilátek proti β -amyloidu nebo implantace embryonálních kmenových buněk ke zvýšení hladiny NGF). Z této oblasti bych ráda na závěr zmínila tři současné nadějně projekty. Dva z oblasti monoklonálních protilátek proti β -amyloidu a jeden, který se objevil v posledních několika letech a přináší zajímavou látku přírodního původu s odlišným mechanismem účinku.

MUDr. Martin Tolar, český lékař působící v USA, provedl pečlivou metaanalýzu dat z dlouhodobých klinických studií AD a identifikoval několik nadějných látek cílících na β -

amyloid. Injekčně aplikované protilátky aducanumab a BAN2401 prokázaly účinnost v klinických i laboratorních parametrech. Nejlepších výsledků však dosáhla malá molekula s orálním podáním ALZ-801, která vznikla optimalizací tramiprosatu. Prokázala významnou klinickou účinnost u vysoce rizikové populace homozygotů pro alelu apolipoproteinu E - APOE4. Tato molekula bude podrobena dalšímu zkoumání ve 3. fázi klinického hodnocení zaměřeného na populaci homozygotů APOE4, ale v časném stadiu AD.¹³

Látku aducanumab FDA před několika měsíci schválila v urychleném procesu pod obchodním názvem Aduhelm. Vzbudilo to vlnu kritiky, neboť Aduhelm dostatečně neprokázal zlepšení klinického stavu pacientů. Prokázal však účinnost při odstraňování β -amyloidových plaků, což může mít velký význam v sekundární prevenci – u pacientů, kteří již čelí usazování β -amyloidu, ale dosud u nich nedošlo k rozvoji klinických příznaků.¹⁴

Čínský tým Wang et al. v současnosti testuje látku nazvanou prozatím GV-971 v rozsáhlých kontrolovaných experimentech na myších modelech s akumulací β -amyloidu. GV-971 je oligosacharid mořského původu. Výzkum navazuje na několik nedávných prací poukazujících na souvislost mezi periferním imunitním systémem (IS) a rozvojem AD (je doprovázena průnikem buněk periferního IS do mozku), na souvislost mezi periferním IS a stavem střevního mikrobiomu a následně i na souvislost porušeného střevního mikrobiomu a patogeneze AD. Výzkum týmu Wang et al. popisuje mechanismus, kdy změněný střevní mikrobiom ovlivňuje metabolismus fenylalaninu a isoleucinu, zvyšuje množství Th1 (pomocných T-lymfocytů skupiny 1) v plasmě a jejich průnik do mozkového parenchymu, kde se podílejí na zánětlivých mechanismech patogeneze AD popsaných výše. GV-971 tento mechanismus údajně potlačuje úpravou střevního mikrobiomu. Je možné, že GV-971 působí ještě dalším, dosud neodhaleným mechanismem. Výsledky v úbytku plaků β -amyloidu a zlepšení kognitivních funkcí u myších modelů se jeví jako slibné.¹¹

Nejúčinnějšími a standardně používanými léky první volby však nadále zůstávají centrálně působící inhibitory ChEI a je třeba hledat jejich další zástupce s ještě lepšími vlastnostmi. Dle vstupní literární rešerše by se takové látky mohly vyskytovat v tropických rostlinách vybraných pro tuto práci, velké naděje vkládáme zejména do *Geissospermum vellosii*.

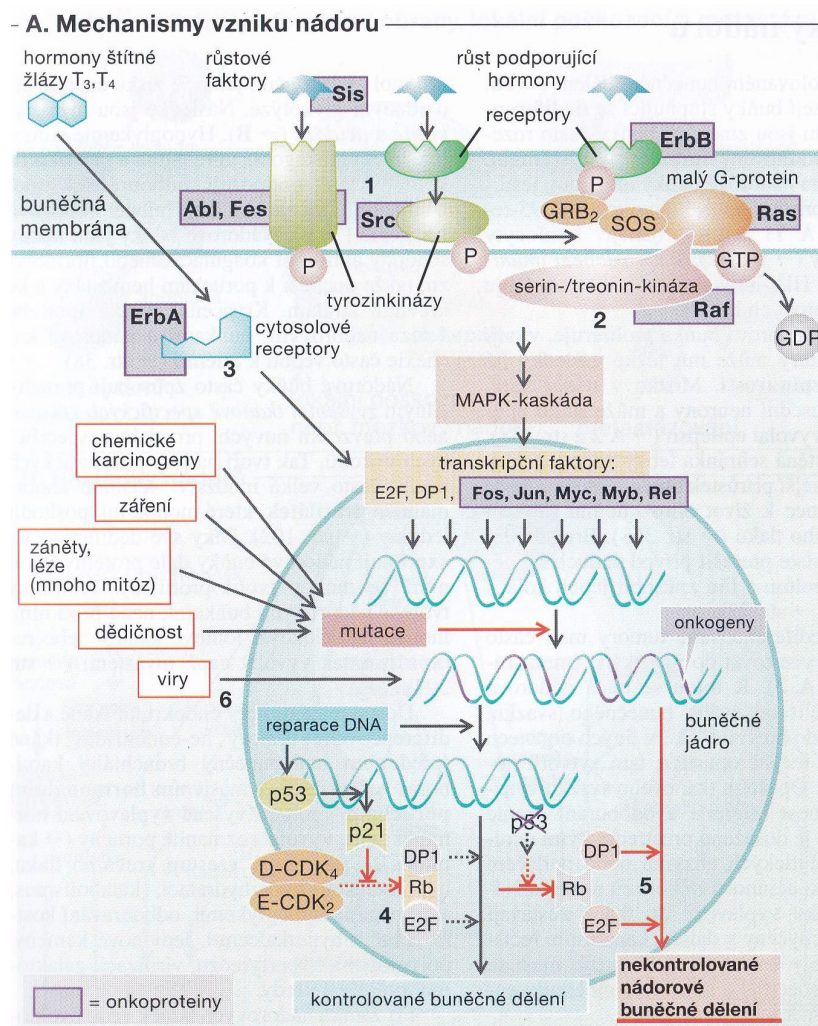
III.2 PŘÍRODNÍ LÁTKY V PROTINÁDOROVÉ TERAPII

Zhoubné nádory se objevují na předních místech statistik příčin úmrtí napříč všemi věkovými skupinami, jejich výskyt v České republice dlouhodobě stoupá a postihují osoby stále mladšího věku. Příčin nárůstu je mnoho - od civilizačních faktorů jako expozice chemickému znečištění (včetně kouření a konzumace alkoholu) a záření, nadváha a stres přes vliv některých virů a poruchy IS až po zvyšující se průměrný věk obyvatelstva a úroveň diagnostiky. Incidence nádorových onemocnění stoupá celosvětově. Některé typy nádorů jsou častější ve vyspělých zemích (např. kolorektální karcinom nebo karcinom prostaty), jiné v zemích rozvojových (např. nádory jater), dle přítomných faktorů. Díky pokrokům v medicíně alespoň klesá úmrtnost na zhoubné nádory.^{9,15,16}

Podstatou nádorového bujení je nekontrolované množení buněk. Za normálních podmínek je proces dělení buňky (mitózy) pečlivě řízen prostřednictvím lokálního vyplavení růstových faktorů a navazujících kaskád receptorů a dalších faktorů, vedoucích nakonec díky aktivaci transkripčních faktorů k expresi genů potřebných k buněčnému dělení. Mitóza je umožněna pouze tam, kde je to v danou chvíli zapotřebí. Na všech místech těchto kaskád však mohou vznikat poruchy, zapříčiněné mutacemi, které vyvolávají např. některé chemické látky nebo záření.

Mutací genů, které kódují proteiny zapojené do kaskád řízení proliferace, vznikají onkogeny a mohou produkovat onkoproteiny, které pak spouštějí dělení buňky i bez fyziologických stimulátorů. Mezi onkoproteiny patří tedy např. růstové faktory, receptory pro růstové faktory, transkripční faktory, tyrozinkinasy, serin/treonin kinasy, G-proteiny nebo receptory pro hormony štítné žlázy, které jsou vyprodukovány mutovanými buňkami, bez regulace systému. Díky komplexnosti těchto kaskád a balancování faktorů podporujících a tlumících buněčné dělení musí dojít mnohonásobně k četným mutacím, aby se buňka zvrhla v nádorovou.

Poruchy reparace DNA podporují přetrvávání mutací. Buňky, které procházejí mitózou jsou náchylnější k mutacím. Buněčné dělení je stimulováno u zánětů a lézí tkání, kde je tedy větší riziko vzniku nádorové buňky. Mutace také mohou být v buňkách již zděděné, nebo je tam může zanést virus.⁹ Podrobnější představu o kaskádách kontrolujících buněčné dělení nabízí obrázek 2.



Obr. 2: Mechanismy vzniku nádoru⁹

Při léčbě zhoubných nádorů se využívá chirurgická a radioterapeutická lokální léčba, celková chemoterapie a ovlivnění regulačních mechanismů organismu (imunoterapie, hormonální a biologická terapie). Tyto postupy se velmi často kombinují. Hormonální a zejména biologická léčba prošla v posledních dekádách dynamickým vývojem a k dispozici je již velké množství nových látek, např. monoklonálních protilátek. Obrovskou výhodou takové léčby je možnost přesně zacílit účinek – např. na určitou strukturu vyskytující se pouze na povrchu nádorové buňky apod., a tedy léčit efektivněji při menším množství NÚ. Naopak klasická chemoterapie neboli cytostatika bohužel účinkují nejen na buňky nádoru, ale i na tělesné tkáně s rychlejším buněčným dělením, např. kostní dřeň, střevní sliznice a vlasové kořínky, a tak dochází ke klasickým NÚ – dočasný útlum krvetvorby, gastrointestinální potíže a vypadávání vlasů. Podrobnější přehled imunoterapie, hormonální a biologické léčby je nad rámec této práce, v následujících odstavcích se zaměřím na cytostatika z přírodních zdrojů.

V chemoterapii zhoubných nádorů zaujímají látky objevené v rostlinách zásadní místo. Přes jejich silné NÚ se bez nich stále neobejdeme. Podnětem pro jejich zkoumání může být používání v tradičních systémech léčby. V současné lékařské praxi se již po mnoho let používají alkaloidy *Vinca rosea* nebo komplexní sloučeniny rodu *Taxus* (taxany), obě skupiny působí interferencí s mikrotubuly mitotického vřeténka, stejně jako kolchicin, alkaloid z ocúnu (*Colchicum autumnale*). Mezi vinkaalkaloidy patří vinblastin a vinkristin a semisyntetické deriváty vindezin a vinorelbin. Využívají se zejména při léčbě leukémií nebo bronchiálního karcinomu. Taxany reprezentují paklitaxel a docetaxel, které se používají k léčení metastazujícího karcinomu ovaria a prsu. Kromě obvyklých nežádoucích účinků působí vinkaalkaloidy i taxany také periferní neuropatii - na základě poškození mikrotubulů axonů.

Inhibitory topoizomerasy způsobují zlomy v DNA proliferujících buněk (jednoho nebo obou vláken). Z noholistu (*Podophyllum peltatum*), mezi laiky známějšího pod názvem mandragora, pocházejí inhibitory topoizomerasy II – etoposid a teniposid, deriváty podofylotoxinu. Samotný podofylotoxin je při lokální aplikaci účinný proti *condylomata acuminata*. Inhibitory topoizomerasy I, topotekan a irinotekan, byly odvozeny od přírodního alkaloidu kamptotecinu z plodů čínského stromu *Camptotheca acuminata*. Používají se u pokročilých karcinomů, kdy jiné terapeutické postupy selhaly (topotekan u karcinomu ovárií, irinotekan u kolorektálního karcinomu).

Látky vyvolávající interkalaci a tím zlomy DNA jsou často produkty streptomycet nebo aktinomycet. Patří mezi ně aktinomycin D a bleomycin, který je směsí glykopeptidů ze streptomycet a u asi 10% léčených vyvolává plicní fibrózy. K antibiotikům se základní strukturou antracyklinu patří daunorubicin a doxorubicin, které jsou však silně kardiotoxické. Proto byly vyvinuty méně kardiotoxické sloučeniny epirubicin, idarubicin a mitoxantron. Další cytotoxickou látkou izolovanou ze streptomycet je mitomycin, který je po intracelulární přeměně schopný alkylovat DNA. Může způsobit poškození ledvin a intersticiální pneumonie. Ze streptomycet se získává také pentostatin – antimetabolit s „falešnou purinovou bází“, který se používá k léčbě trichocelulární leukemie.

Z bakterií *E. coli* případně *Erwinia chrysanthemi* se získává enzym asparaginasa, štěpící asparagin na aspartát a čpavek. U těch nádorových buněk, které jsou závislé na získávání asparaginu z intersticiální tekutiny, způsobí přívod enzymu vyčerpání tohoto zdroje. Asparaginasa se používá v kombinované terapii akutní lymfatické leukémie. Nežádoucí

účinky jsou způsobené poruchou syntézy některých proteinů – nedostatek inzulínu vede k hyperglykémii a výpadky faktorů regulace krevní srážlivosti k trombózám nebo vzácněji ke krvácení. Uvolnění čpavku může vyvolat komatózní stavy.^{4,5}

Přírodní cytostatika mohou být velmi užitečná také v kombinaci se standardními chemoterapeutiky, a to na základě aditivního nebo synergického působení, které zajistí lepší léčebný efekt nebo umožní podání nižších a bezpečnějších dávek. Klasickým příkladem může být využití kombinace taxanu a platiny v léčbě karcinomu ovarií, dosahující mnohem lepších výsledků než podání jednotlivých látek, která se již před několika desetiletími stala standardním režimem v této indikaci. Jedním z problémů terapie je i schopnost zhoubných nádorů vyvinout postupně rezistenci k aplikované léčbě a relabovat.⁶ I proto je stále potřeba hledat další rostlinná cytostatika, účinnější a méně toxická. V následujících odstavcích se zaměřím na několik nových nadějných objevů v této oblasti.

Mnohé nádory produkují enzymy (indolamin 2,3-dioxygenasu 1 a tryptofan 2,3-dioxygenasu), které metabolizují tryptofan na látky potlačující IS pacienta a způsobují tím nepříznivý průběh onemocnění. Vědci provedli virtuální screening přibližně $6,7 \times 10^4$ přírodních látek, vhodné kandidáty otestovali na 3 liniích nebezpečných nádorových buněk a identifikovali 3 látky se schopností inhibice obou těchto enzymů - dostaly pracovní název TD12, TD18 a TD34. TD34 dosáhl nejlepších výsledků s IC_{50} 3,42 μ m pro linii prsního nádoru BT549.¹⁷

V sušeném kořenu rostliny *Sophora flavescens*, používaném v tradiční čínské medicíně pod názvem kushen, byl objeven nový flavonoid pojmenovaný kushenol Z. Brání proliferaci a způsobuje apoptózu u linií nemalobuněčného plicního karcinomu (A549 a NCI-H226), přičemž nabízí široké terapeutické okno.¹⁸

Další flavonoid, kvercetin, obnovuje citlivost buněk karcinomu prsu, které vyvinuly rezistenci, k docetaxelu. Mechanismem tohoto účinku je inhibice Lef1 „regulátoru genů rezistence“. V klinické studii I. fáze bylo již ověřené bezpečné podání kvercetinu lidem. V budoucnu by tedy mohl být využitý jako významná adjuvantní terapie při léčbě docetaxelem.¹⁹

S buňkami karcinomu prsu rezistentních k radioterapii by mohl pomoci 10-gingerol – hlavní fenolický lipid oddenků zázvoru (*Zingiber officinale*). Díky své amfifilní povaze má schopnost zabudovat se do buněčných membrán a upravovat jejich vlastnosti. 10-gingerol

potlačoval proliferaci, migraci, invazivitu a vyvolával apoptózu trojitě negativních, k radioterapii rezistentních buněk karcinomu prsu.²⁰

Kyselina taninová (gallotannová), která se nachází např. v duběnkách a má již další léčebné indikace, je také nadějnou látkou v protinádorové léčbě. Byla zaznamenána účinnost proti několika solidním nádorům, synergie s konvenčními chemoterapeutiky a snížení rezistence. Ovlivňuje několik kaskád onkologického procesu. Limitem jejího využití byl špatný farmakokinetický profil. Tento problém by mohly odstranit nové organické a kovové nanonosiče, které jsou v současnosti zkoumány.²¹

Bylo zjištěno, že bioaktivní C₁₇ a C₁₈ acetylenové oxylipiny se významně podílejí na cytotoxických a protizánětlivých účincích mnoha suchozemských rostlin (např. čeledi miříkovité - Apiaceae, aralkovité - Araliaceae a hvězdicovité - Asteraceae). Dokáží u nádorových buněk vyvolat zástavu buněčného cyklu a/nebo apoptózu, čímž se stávají další slibnou skupinou látek ve výzkumu protinádorové léčby.²²

Takalonolidy jsou novou skupinou látek interagujících s mitotickým vřetenkem. Narozdíl od široce používaných taxanů, které se potýkají s problémem častého vzniku rezistence, fungují mechanismem, který vznik všech 3 typů rezistence k taxanům obchází. Takalonolidy byly izolovány z kořenů některých druhů rostlin rodu *Tacca* a pro ještě lepší účinnost jsou vyvíjeny jejich semisyntetické deriváty.²³

Dle vstupní literární rešerše by se podobně zajímavé látky mohly vyskytovat v tropických rostlinách vybraných pro tuto práci, velké naděje vkládáme zejména do *Geissospermum vellosii*.

III.3 POPIS BIOLOGICKÉHO MATERIÁLU A JEHO BIOLOGICKÁ AKTIVITA

III.3.1 GEISSOSPERMUM VELLOSI (LAEVE) (KŮRA)

Geissospermum vellosii Allem je 1 z 6 druhů rodu *Geissospermum* z čeledi Apocynaceae (toješťovitě).²⁴ Jedná se o amazonský strom rozšířený od Guajany po Brazílii včetně.²⁵ V literatuře jej často nalezneme pod synonymem *Geissospermum laeve* (Vell) Miers nebo místním pojmenováním Pao Pereira. Méně často se setkáme i s označením *Geissospermum laeve* (Vell.) Baillon, *Tabernaemontana laevis* (Vell), Pao-de-pente, Pereiroá, Triguabá, Camará-de-bilro, Canudo amargoso a dalšími místními názvy³. Často používané pojmenování Pau-pereira může být zavádějící, protože pod tímto názvem můžeme na internetu najít i druhy z jiných čeledí. Domnívám se, že totéž může platit i o jiných místních názvech. V dalších literárních zdrojích můžeme nalézt některé botanické odlišnosti mezi *Geissospermum vellosii* Allem a *Geissospermum laeve* (Vell.) Miers, zejména výrazně menší vzrůst a mnohem užší a kopinaté listy *G. laeve* (Vell.) Miers, nicméně oba jsou považovány za 1 druh.

Geissospermum vellosii je mohutný stálezelený tropický strom s hluboce žlábkovaným kmenem a hustou korunou, dorůstající výšky až 30 m. Narozdíl od většiny toješťovitých neobsahuje téměř žádný latex. Má malé, rovné, šedohnědé větve, které, čím jsou vzdálenější od kmene, jsou stále více hladké. Listy jsou střídavé, zpeřené, s vroubkovanými okraji, textura připomíná papír, mladé lístky mají jemné chloupky a výraznou žilnatinu, listová čepel je eliptická, 5 až 7,5 cm dlouhá a 2,5 až 3,8 cm široká, s úzkou bazí, dlouze řapíkatá. Vytváří hroznovitá květenství typu lata s vrcholovými troj-čtyřčetnými svazky květů nad listencem, na stopkách 0,7 cm dlouhých. Kališní lístky jsou kopinaté, 1,2 cm dlouhé. Korunní trubka 3 cm dlouhá, chlupatá zvenku, lysá na vnitřní straně, s výjimkou úzkého vlasového prstence v ústí. Podlouhlé, tupé cípy korunního lemu jsou 2,3 cm dlouhé, nevýrazné světle žluté až světle fialové barvy. Květy jsou oboupohlavné. 5 tyčinek se skládá z volných vejčitých prašníků a z krátkých chlupatých vláken a jsou těsně přidružené k svrchnímu semeníku tvořeným 2 plodolisty. Každý plodolist vytváří 1 žlutý lusk o délce 5,3 cm a šířce 3 cm se 4-5 semeny.^{26,27} Kresba a fotografie *Geissospermum vellosii* jsou zobrazeny na obrázcích 3 a 4.

V tradičním léčitelství používanou částí této rostliny je kůra (jako vodný nebo alkoholový extrakt, dle místního zvyku), ve které byla v posledních 6 desetiletích také vědecky potvrzena přítomnost mnohých terapeuticky účinných látek, zejména monoterpenových indolových alkaloidů²⁵ – viz tabulka 1. Hlavními alkaloidy kůry by měly být geissospermin, geissoschizin a geissoschizolin²⁴.



Obr. 3 a 4: *Geissospermum vellosii* – detailní kresba²⁸ a fotografie rostliny²⁹

V *Geissospermum vellosii* byly identifikovány i další indolové alkaloidy - s dosud neprokázanou biologickou aktivitou. Apogeissoschizin, geissovellin, vellosimin^{30,31,32} a pereirin³³ byly objeveny převážně v šedesátých letech minulého století, objev pausperadinu A se datuje do roku 2005³⁴. Pereirin je v brazilské literatuře uváděn jako vůbec první alkaloid izolovaný v Brazílii, používaný lékaři k léčbě zejména různých horečnatých stavů již od roku 1838. Pozdější chemické analýzy však naznačují, že se mohlo jednat spíše o směs alkaloidů s převládajícím geissosperminem nebo geissoschizolinem, názory autorů se liší.³⁵ Bertho a Koll určili název pereirin struktuře velmi podobné geissoschizolinu³³, není však jasné, zda se jedná o původně používaný pereirin.

Tab. 1: Alkaloidy kůry *Geissospermum vellosii* a jejich biologická aktivita

Typ sloučeniny	Název	Biologická aktivita	Literatura
β-karbolinové alkaloidy	Flavopereirin	Snížení vychytávání serotoninu synaptosomy z hippocampu myši - <i>in vitro</i>	36
		Středně silný myorelaxační účinek na kosterní svaly zprostředkovaný nikotinovými receptory a inhibice AChE srovnatelná s galantaminem – <i>in vitro</i>	37
		Selektivní inhibice syntézy DNA v rakovinotvorné buňce – <i>in vitro</i>	38
		Selektivní inhibice množení BCNU- rezistentních buněk glioblastomu (U251) závislá na dávce – <i>in vitro</i>	39
		Selektivní inhibice růstu buněk karcinomu prostaty (LNCaP – androgen senzitivní), indukce apoptózy závislá na dávce - <i>in vitro</i> , potlačení růstu xenograftovaného nádoru u myši až o 80 % při nejefektivnějším dávkování (10-20 mg/kg/den; U-křivka) oproti kontrolní skupině	5 *
		Selektivní inhibice růstu buněk karcinomu prostaty (CRPC – androgen nesenzitivní), indukce apoptózy a zástava buněčného cyklu závislá na dávce a čase - <i>in vitro</i>	40 *
		Selektivní inhibice růstu všech 5 testovaných linií buněk karcinomu pankreatu (PANC-1, AsPC-1, HPAF-II, BxPC-3 a MiaPaCa-2) a kompletní inhibice tvorby kolonií PANC-1 na agaru, indukce apoptózy závislá na dávce a čase, výrazné zvýšení cytotoxicity gemcitabinu (umožňující snížení jeho dávky, zejména u rezistentní linie AsPC-1) - <i>in vitro</i> Potlačení růstu xenograftovaného PANC-1 karcinomu u myši o 70-72 % při monoterapii a	41 *

		v kombinaci s gemcitabinem zřetelně omezil metastázy na peritoneu	
		Selektivní inhibice růstu buněk ovariálního karcinomu a kompletní inhibice tvorby jejich kolonií na agaru, indukce apoptózy závislá na dávce a čase – <i>in vitro</i> Potlačení růstu ovariálního karcinomu na peritoneu myši o 79 % při monoterapii a o 97 % v kombinaci s karboplatinou a snížení objemu ascitu o 55 % při monoterapii a jeho kompletní vymizení v kombinaci s karboplatinou, to vše při nízké toxicitě	6 *
		Vysoká aktivita <i>in vitro</i> proti <i>Plasmodium falciparum</i> (chlorochin senzitivní kmen T9-96), střední proti <i>Plasmodium falciparum</i> (chlorochin rezistentní kmen K1), ale spojena se střední toxicitou	42 **
	Geissolaevin O-methyl Geissolaevin	Nízká nebo žádná antimalarická (chlorochin-rezistentní kmen FcB1) aktivita <i>in vitro</i> , nízká nebo žádná aktivita proti <i>Leishmania donovani</i> (LV9) při 50 µM <i>in vitro</i> , žádná cytotoxicita	25
Indolové alkaloidy	Geissolosimin	Aktivita proti <i>Leishmania donovani</i> (LV9) při 6,25 µM <i>in vitro</i> , submikromolární antimalarická aktivita (chlorochin-rezistentní kmen FcB1), avšak současná submikromolární cytotoxicita naznačuje nízkou selektivitu	25
		Vysoká aktivita <i>in vitro</i> proti <i>Plasmodium falciparum</i> (chlorochin senzitivní kmen D10), ale spojena s vysokou toxicitou	43
	Geissoschizolin	Snížení vychytávání serotoninu synaptosomy z hippocampu myši - <i>in vitro</i>	36
		Dobrá aktivita <i>in vitro</i> proti <i>Plasmodium falciparum</i> (chlorochin senzitivní kmen D10) bez toxicity ***	43
	Geissoschizon	Střední aktivita <i>in vitro</i> proti <i>Plasmodium falciparum</i> (chlorochin senzitivní kmen D10) bez toxicity	43

Geissospermin	Inhibice AChE z mozku krysy (IC ₅₀ – 39,3 µg/ml) a elektrického úhoře (IC ₅₀ – 2,9 µg/ml) a ještě výraznější inhibice BuChE ze séra koně (IC ₅₀ – 1,6 µg/ml) – <i>in vitro</i> Významné snížení amnézie vyvolané skopolaminem (u myši při 30 mg/kg i.p.), bez cholinergních nežádoucích účinků při efektivní dávce	3 ****
	Snížení amnézie vyvolané skopolaminem (zvířecí modely)	36 ****
	Snížení vychytávání serotoninu synaptosomy z hippocampu myši - <i>in vitro</i>	36
	Mírný myorelaxační účinek na kosterní svaly zprostředkovaný nikotinovými receptory a slabá inhibice AChE – <i>in vitro</i>	36
	Výrazné snížení nocicepce (2x účinnější než indometacin ve stejné dávce) a protizánětlivý účinek zprostředkovaný zejména přes ACh, bez účasti opioidního systému (v dávce 30 mg/kg a 60 mg/kg u myši)	44 ****
	Dobrá aktivita <i>in vitro</i> proti <i>Plasmodium falciparum</i> (chlorochin senzitivní kmen D10), ale spojena se střední toxicitou	43
	Ibogamin *****	Dlouhodobé (zejména R-enantiomer) snížení samostatného užívání kokainu a morfinu u krysy, bez vyvolání třesu, snížení uvolňování dopaminu v nucleus accumbens a ve striatu (R- enantiomer)
(-)-leukonolam	Střední aktivita proti <i>Leishmania donovani</i> (LV9) - <i>in vitro</i>	25
Vellosiminol	Nízká aktivita <i>in vitro</i> proti <i>Plasmodium falciparum</i> (chlorochin senzitivní kmen D10)	43
12-methoxy-1-methyl-aspidospermidin	Výrazné snížení nocicepce zprostředkované 5-HT _{1A} receptory bez ovlivnění motorických funkcí (v dávce 0,001-1mg/kg u myši), údajně mnohem účinnější než kyselina acetylsalicylová	36

Quebrachamin *****	Blok adrenergních receptorů v řadě urogenitálních tkání (obdoba yohimbinu)	46
Raubasin *****	Snížení krevního tlaku (antagonista α_1 -adrenergních receptorů spíše než α_2)	47
Serpentin *****	Výrazná inhibice AChE <i>in vitro</i> (IC ₅₀ - 0,78 μ M), nedostatečný účinek na <i>ex-vivo</i> nerv diafragmy krysy (malá modifikace by mohla poskytnout účinný selektivní AChE inhibitor)	48
	Selektivní inhibice syntézy DNA v rakovinotvorné buňce – <i>in vitro</i>	38
	Selektivní inhibice buněk lymfomu (YC8) a karcinomu (Ehrlich) v ascitu u myši	49
	Interkalační vazba na DNA, stabilizace kovalentního komplexu topoizomerasa II–DNA a stimulace štěpení DNA topoizomerasou II.	50
3',4',5',6'- tetrahydrogei ssospermin	Středně silná antimalarická (chlorochin-rezistentní kmen FcB1) aktivita <i>in vitro</i> , aktivita proti <i>Leishmania donovani</i> (LV9) při 50 μ M <i>in vitro</i> , střední cytotoxicita	25

* Testováno s frakcí extraktu obsahující 54 % β -karbolinových alkaloidů, účinek je přisuzovaný flavopereirinu

** Izolován z *Geissospermum sericeum*

*** V jiné studii⁴² nebyla antimalarická aktivita geissoschizolinu prokázána, možná z důvodu použití jiných kmenů *Plasmodium falciparum* - chlorochin senzitivní kmen T9-96 a chlorochin rezistentní kmen K1

**** Testováno s frakcí extraktu bohatou na geissospermin

***** Ramos poprvé prokázal obsah těchto již dříve známých alkaloidů u *Geissospermum vellosii*²⁵, u ostatních studií uvedených u těchto alkaloidů byla látka získána z jiné rostliny

Několik zajímavých studií se zabývalo účinky geissoschizin methyl etheru izolovaného z rostlin rodu *Uncaria* (výrazná inhibice AChE⁵¹, neuroprotektivní a antipsychotické účinky^{52,53}, snížení lokomotorické aktivity přes centrální dopaminergní systém⁵⁴ a vasorelaxační účinky⁵⁵). V *Geissospermum vellosii* tento zajímavý alkaloid nebyl zatím nalezený, narozdíl od geissoschizinu, u kterého naopak nebyly zatím prokázány biologické účinky. Geissoschizin má nicméně mezi monoterpenovými indolovými alkaloidy unikátní postavení biogenetického progenitoru, proto byla popsána jeho efektivní syntéza⁵⁶, která je dále využívána.

Geissospermum vellosii má bohatou historii používání v tradičním léčitelství i lékařství. Domorodci využívali tradiční extrakty z kůry *Geissospermum vellosii* na malárii, horečku, bolest, žaludeční potíže a nechutenství, zácpu, bolest a onemocnění jater, závrať a jako sexuální stimulant.^{3,24,36,57} *Geissospermum vellosii* bylo uvedeno v prvním vydání brazilského lékopisu.²⁴ Brazilští lékaři pak po dvě století (19. a 20.) léčebně využívali různé přípravky z kůry *Geissospermum vellosii*, a to hlavně na horečku.³⁵

III.3.2 CALOTROPIS GIGANTEA (NAŤ)

Calotropis gigantea (Linn) je 1 z 6 druhů rodu *Calotropis* z čeledi Apocynaceae (toješťovité), podčeledi Asclepiadoideae. Jedná se o velký keř hojně rozšířený v Africe a Asii. V anglicky psané literatuře jej také nalezneme pod označením giant milkwood, crown flower a shallow wort, v hindi dialektu Madar⁵⁸ v sanskrtu Arka⁵⁹.

Calotropis gigantea je velký tropický keř nebo malý strom se silnými vztyčenými větvemi (až 20 cm v průměru), dorůstající výšky 3 až 4 m (v širším rozmezí 1-5 m). Jako většina toješťovitých obsahuje v listech a stoncích mléčně bílou jedovatou šťávu. Listy jsou vstřícné, světle zelené, tuhé, kožovité, zejména mladé lístky mají jemné chloupky a slabě zbarvenou žilnatinu, listová čepel je široce eliptická až obvejčitá, 8 až 20 cm dlouhá a 4 až 12 cm široká, obvykle se srdčitou bází, krátce řapíkatá. Vytváří terminální, chocholičnatá květenství, o průměru 5 až 12 cm, na stopkách 5 až 12 cm dlouhých. Květy jsou voskovité a mají průměr 2,5 až 4,5 cm. Kališní lístky jsou vejčité kopinaté až vejčité, 0,5 až 0,7 cm dlouhé. 5 masitých korunních plátků, přibližně 1,5 cm dlouhých, krémově bílé až světle fialové barvy, má okraje stažené směrem dolů. Květy jsou oboupohlavné. Uprostřed květu je pětihránná pyramida připomínající korunu, asi 1,5 cm vysoká, s bází protaženou do nazpět obrácených, asi 0,5 cm dlouhých útvarů. Je obvykle trochu tmavší než korunní plátky a obsahuje vysoce modifikované tyčinky a zelenavě žlutou bliznu. Vytváří modravě zelené plody o délce 7 až 10 cm a šířce 2,5 až 4 cm, na bázi ohnuté, s mnoha semeny, na vrcholu s chocholkou chlupů.^{60,61} Fotografie květenství, keře a plodu *Calotropis gigantea* jsou zobrazeny na obrázcích 5, 6 a 7.



Obr. 5, 6 a 7: *Calotropis gigantea* – fotografie květenství⁶², fotografie keře⁶³ a fotografie plodu⁶³

V tradičním léčení se po staletí využívají různé části této rostliny (nať, listy, květy, kůra, kořeny a zejména latex - dle místního zvyku a indikace)^{58,59}. V posledních desetiletích probíhá také rozsáhlý vědecký výzkum obsahových látek *Calotropis gigantea* a jejich farmakologických účinků ve snaze získat nové účinné látky. Již byla vědecky potvrzena přítomnost několika terapeuticky aktivních skupin obsahových látek a mnohé látky byly také izolovány a identifikovány. V případě *Calotropis gigantea* však v popředí zájmu nestojí alkaloidy, ale glykosidy - zejména kardenolidy a flavonoidy. Několik experimentálních vědeckých prací nicméně přítomnost alkaloidů v listech, stoncích a květech *Calotropis gigantea* prokázalo – proto byla jako droga pro účely screeningu v této práci vybrána nať *Calotropis gigantea*. Naopak např. podrobné review z roku 2016 přítomnost alkaloidů v *Calotropis gigantea* neuvádí⁶⁴. Důvodem může být, že alkaloidy nepatří mezi hlavní skupiny jejích látek - výzkumníci většinou upozorňují, že jejich kvantitativní zastoupení je v *Calotropis gigantea* menší oproti dominantním skupinám látek. V tabulce 2 jsem se pokusila shrnout mně dostupné informace o přítomnosti alkaloidů v nadzemní části *Calotropis gigantea* a biologické aktivitě této drogy. Různí autoři zkoumají různé části rostliny a různé typy extraktů z příslušných částí, někteří se zaměřují na identifikaci obsahových látek, jiní na farmakologické účinky extraktů bez vztahu ke konkrétní obsahové látce. To vše tento souhrn komplikuje, a tak tabulka zároveň ukazuje, jak nekompletní jsou dosud shromážděné vědecké poznatky o *Calotropis gigantea*. V tabulce uvádím i další skupiny látek nalezené spolu s alkaloidy.

Mnohé vědecké práce se také věnují fytochemické a farmakologické analýze kořene případně kůry kořene *Calotropis gigantea*, kde byly identifikovány kardenolidy, kalotroposidy A-G a několik dalších látek^{59,64}. Mezi prokázané farmakologické účinky extraktů kořene patří účinky cytotoxické (připisovány kalotropinu, frugosidu, jeho derivátu a koroglaucigeninu), antipyretické, analgetické, hepatoprotektivní a abortivní.^{59,64,65,66,67}

Calotropis gigantea byla po tisíciletí používána v tradiční čínské medicíně, ajurvédě a dalších tradičních systémech léčby např. ke snížení horečky, proti průjmům, kašli nebo při revmatických potížích. Před objevem penicilinu byla mléčná šťáva *Calotropis gigantea* užívána také k léčbě syfilis.⁵⁸

Tab. 2: Biologická aktivita a obsahové látky nadzemních částí *Calotropis gigantea*

Část rostliny	Typ extraktu	Skupina látek	Název alkaloidu	Biologická aktivita *	Literatura
List	EtOH	Alkaloidy, Saponiny, Taniny	██████████	Antimikrobiální , Cytotoxická Mírně trombolytická	68
	MeOH	Alkaloidy, Kumariny, Fenoly, Flavonoidy	██████████	Antimalarický	69 **
	EtAc	Srdeční glykosidy, Flavonoidy, Saponiny, Steroidy, Terpenoidy, Alkaloidy, Taniny	██████████	Antibakteriální	70
	██████████	Alkaloidy, Glykosidy	Mударin	██████████	59
Latex	██████████	Kardenolidy, terpeny	██████████	██████████	59
Květ	EtOH	Alkaloidy, Taniny, Fenoly, Flavonoidy, Steroly, Antrachinony, Proteiny, Chinony	4'-metyl-2-fenylindol	██████████	60
	EtAc	██████████	██████████	Antimikrobiální, Cytotoxická	71, 72
	██████████	Srdeční glykosidy, Alkaloidy	Mударin	██████████	59
Nať	DCM:MeOH	Terpenoidy	██████████	Cytotoxická	64
	DCM	Kardenolidy, Flavonoidy	██████████	Antimalarická	
	Alkaloidní	██████████	██████████	Protizánětlivá	73

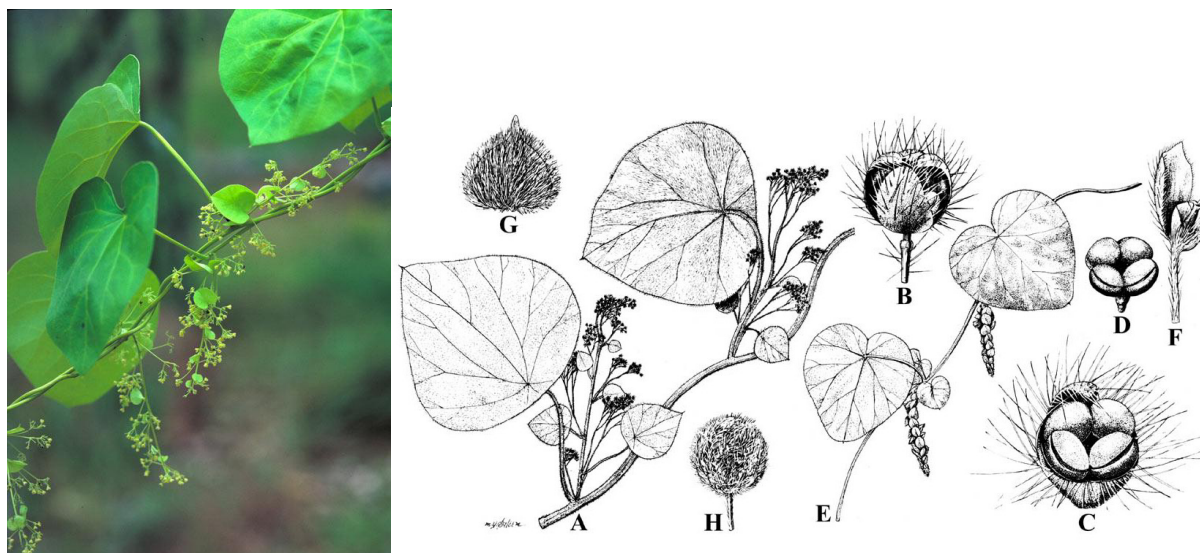
* Biologické aktivity, které autoři práce přisuzují přítomností alkaloidů, jsou vyznačeny silně.

** Alkaloidy nalezeny také v CHCl₃ extraktu z listů a z květů, MeOH extraktu ze stonků a EtAc extraktu ze stonků a květů.

III.3.3 CISSAMPELOS PAREIRA (STONEK)

Cissampelos pareira (Linn.) je jedním z 37 druhů rodu *Cissampelos* z čeledi Menispermaceae (lunoplodovité). Jedná se o popínavý keř tropických a subtropických oblastí Asie (Indie, Čína a další), východní Afriky a Ameriky. Z řady různých místních názvů se asi nejčastěji setkáme s pojmenováním patha nebo akanadi, používaným v Indii, pareira nebo abuta v Brazílii, v angličtině se používá výraz velvet leaf.

Cissampelos pareira je tropický vytrvalý popínavý keř dorůstající 2 až 5 m, štíhlý s dřevnatou podnoží a ztlustlým kořenem, dvoudomý, variabilního vzhledu. Listy jsou štítovité nebo kulatě ledvinovité se srdčitou bází, o průměru 3 až 12 cm, blanité nebo kožovité, s výraznou žilnatinou, řapíkaté, lysé nebo chlupaté. Květy jsou žlutozelené, drobné, samčí vyrůstají v hroznovitých shlucích, 10 až 12 cm dlouhých, z axil malých lístků a jsou čtyřčetné, samičí jsou zavěšeny v 6 až 10 cm dlouhých úzkých hroznech až klasech, s malým kulatým lístkem na bázi každého květu, a mají pouze 1 okvětní plátek. Vytváří červené peckovice tvaru obráceného vejce, asi 0,5 cm dlouhé. Semena mají tvar podkovy.^{74,75,76} Fotografie samčí rostliny a kresbu *Cissampelos pareira* ukazují obrázky 8 a 9.



Obr. 8 a 9: Fotografie samčí rostliny *Cissampelos pareira*⁷⁷ a kresba *Cissampelos pareira* A habitus samčí rostliny B samčí květ C samčí květ s kališním lístkem, korunou a tyčinkami D tyčinky E habitus samičí rostliny F samičí květ G listen H plod⁷⁸

V tradičním léčitelství se využívají listy a kořeny *Cissampelos pareira*, ve kterých jsou alkaloidy uváděny jako hlavní sekundární metabolity.^{74,79} Tato příjemně aromatická rostlina je velmi populární v indické Ayurvédě, v tradiční čínské i africké medicíně, ale i v bylinkářství moderního světa.^{76,80} Od 19. století byla také vědecky zkoumána – již v roce 1840 byl z *Cissampelos pareira* izolován první alkaloid pelosin a další brzy následovaly.⁸¹

Na základě předběžného průzkumu literatury jsme pro zpracování v této práci vybrali nať *Cissampelos pareira*. Během podrobné rešerše se však ukázalo, že velmi zajímavý v oblasti anticholinesterasové aktivity a cytotoxicity by mohl být i kořen této rostliny, zatímco stonky a listy mohou mít největší potenciál v antimikrobiálním a antioxidačním účinku. Proto v tabulce 3 a 4 uvádím přehled identifikovaných alkaloidů a biologických aktivit v celé rostlině.

Tab. 3: Alkaloidy *Cissampelos pareira* a jejich biologická aktivita

Typ sloučeniny	Název	Biologická aktivita	Literatura
Isochinolin	Berberin	Snížení krevního tlaku Antifungální, antimikrobiální	80
	Cissamparein	Cytotoxický k linii KB (karcinom nosohltanu)	81
		Myorelaxační	80
	Cycleanin*	Cytotoxický k linii KB (karcinom nosohltanu)	82
	Hayatin*	Myorelaxační (klinická studie) **	83
	Hayatinin*	Cytotoxický k linii KB (karcinom nosohltanu) a A549	82
	Homoaromolin	Cytotoxický k linii HT29 (IC ₅₀ 7.89 μM)	84
	Obamegin	AChE inhibitor (IC ₅₀ 3.26 μM)	84
	Pareirubrin A	Antileukemický	85
	Pareirubrin B	Antileukemický	85
	Pelosin	Cytotoxický k linii KB (karcinom nosohltanu)	81
Tetrandrin	Snížení krevního tlaku	80	
Azafluoranthén	Norimelutein	Cytotoxický	76

* Tyto alkaloidy byly izolovány z listů *Cissampelos pareira*.⁷⁵

** Ve studii byl použit hayatin methiodid.

V *Cissampelos pareira* byly nalezeno množství dalších alkaloidů s dosud neprokázanou biologickou aktivitou. Jedná se o pyrrolový alkaloid cissampelin, azafluoranthénový alkaloid norruffscin a o mnoho dalších převážně isochinolinových alkaloidů – bebekrin, bebeerin, bulbokapnin, buxin, cissamin, cyclanolin, dehydrodicentrin, dicentrin, d-4''-O-methylbebeerin, grandirubin, hayatidin*, chondrokurin, insularin, isochondrodendrin, isoimerubrin, koklaurin, korytuberin, kurin, laudanosin, L-berberin*, magnocurarin, magnoflorin, menismin, nor-N'-chondrokurin, nuciferin, obaberin, oblongin, pareirin, pareitropon, seepeerin a trans-N-feruloyltyramine.^{75,76,80,82,84}

Tab. 4: Extrakty *Cissampelos pareira* a jejich biologická aktivita

Část rostliny	Typ extraktu	Biologická aktivita	Literatura
List	MeOH	Antioxidační	86
	Vodno-alkoholový	Antidiabetická	87
	Vodný	Antidiabetická	80
	Vodno-alkoholový	Antikoncepční	76
	Vodný	Protikrvácivá	76
	EtOH	Anxiolytická	88
Stonek	EtOH	Antibakteriální (G-), antifungální, antioxidační	89
	MeOH	Antibakteriální (G-), antioxidační	86
Nadzemní část	EtOH	Protizánětlivá	75
	EtOH	Antivirová (4 typy dengue)	90
Oddenek	MeOH, EtOAc	Antibakteriální (G+,G-)	91
Kořen	EtOH	Antioxidační	75
	EtOH	Snižující bolest a protiartritická	76
	MeOH	Antibakteriální (širokospektrá včetně <i>Mycobacterium tuberculosis</i>)	92
		Antibakteriální (G-)	86
	MeOH	Antidiabetická	75
	EtOH	Gastroprotektivní	75
	EtOH	Kardioprotektivní	75

	EtOH	Protiprůjmová	75
	Vodno-alkoholový	Hepatoprotektivní	75
	Vodno-alkoholový	Zlepšující paměť	75
	Vodno-alkoholový	Chemopreventivní	76

Listy a kořeny *Cissampelos pareira* jsou v rozmanitých podobách používány v mnoha tropických a subtropických oblastech světa – ve střední a jižní Americe, v Indii, Thajsku, Číně i Africe. Aplikují se buď lokálně na kůži např. k ošetření poranění, popálenin, abscesů nebo hadího uštknutí. V těchto indikacích se uplatňuje účinek antiseptický, protizánětlivý a protikrvácivý. V mnoha dalších indikacích se užívá vnitřně. Je velmi populární v tradiční ženské medicíně – k úlevě od menstruačních bolestí, zmírnění krvácení po porodu nebo při hrozícím potratu, proto se jí přezdívá “bylina porodních bab”. Dále pomáhá ke snížení horečky a bolesti, při léčbě infekcí močových cest, při zažívacích potížích a průjmech a také při kašli. V neposlední řadě, jako jiné mocné rostliny s širokým spektrem účinku působí jako tonikum, k regeneraci a posílení celého organismu.^{76,91,92,93}

III.3.4 VIROLA SEBIFERA (KŮRA)

Virola sebifera (Aubl.) je jedním z druhů početného rodu *Virola* z čeledi Myristicaceae (muškátovníkovité). Jedná se o štíhlý strom tropických pralesů Střední a Jižní Ameriky, hojně rozšířený.⁹⁴ Z řady různých místních názvů se asi nejčastěji setkáme s pojmenováním ucuuba, používaným v Brazílii.⁹⁵

Virola sebifera dorůstá do výšky až 40 m, má rovný kmen, někdy s pilíři kořenů na bázi, a dlouhé větve, v mládí ochlupené. Kůra je tmavá, drobně rozpraskaná, vločkovitě se odlupující a aromatická. Při naříznutí vytéká průhledný exudát, záhy červenající. Listy jsou kožovité, podlouhlé se srdčitou bází a špičatým vrcholkem, 6 až 15 cm dlouhé a 1,5 až 4,7 cm široké, s výraznými příčnými žilkami s většími odstupy, řapíkaté, naspodu bělavé a plstnaté. Květy jsou jednopohlavné, umístěné v květenstvích typu lata. Samčí je dlouhé i široké 8 až 23 cm, vně ochlupené. Vlastní květy mají nálevkovité kalichy délky 1,8 až 3 mm, krémové, žlutohnědé nebo oranžové barvy, s 3 až 5 laloky a obvykle 3 prašníky. Samičí květenství je dlouhé 3 až 7 cm, s hustě plstnatými semeníky. Plody jsou zelené, postupně červenající, eliptické až kulaté, dužnaté, zpočátku ochlupené, dlouhé 1 až 1,5 cm, pukavé, jednosemenné, nejednoznačného charakteru. Uvnitř je semeno vzhledu muškátového oříšku.^{96,97} Detailní kresbu a fotografie kmenu a plodů *Virola sebifera* ukazují obrázky 10, 11 a 12.

Odlišení jednotlivých druhů rodu *Virola* je velmi komplikované, obecně lze říci, že identifikačními znaky druhu *Virola sebifera* jsou určité charakteristiky ochlupení všech částí rostliny, morfologie žilnatiny listů a detaily ve vzhledu květů a plodu. Podrobné informace uvádí rozsáhlý článek z roku 2019.⁹⁶

V tradičním léčitelství se využíval olej ze semen, listy a kůra *Virola sebifera*. Stejně jako některé další druhy rodu *Virola* proslul tento druh hlavně použitím v náboženských rituálech původních amazonských kmenů.⁹⁴ Tento fenomén zkoumalo mnoho vědeckých prací, přičemž bylo zjištěno, že za navození halucinogenních účinků jsou zodpovědné indolové alkaloidy obsažené v kůře *Virola sebifera* – deriváty tryptaminu.⁹⁸ Díky specifické úpravě kambia *Virola* při získávání halucinogenního přípravku dochází pravděpodobně k zakoncentrování účinných látek až 100x oproti obsahu v samotné kůře.^{98,99} Z důvodu prokázané přítomnosti alkaloidů byla pro účely této práce vybrána právě kůra a obsažené alkaloidy jsou shrnuty v tabulce 5.

Je nicméně potřeba upozornit, že pokusy o průkaz a identifikaci alkaloidů ve vzorcích kůry a listů různých druhů rodu *Virola* mají značně variabilní výsledky a to i v rámci stejného druhu.^{98,99}



Obr.10, 11 a 12: *Virola sebifera* – detailní kresba¹⁰⁰, fotografie kmenu¹⁰¹ a fotografie plodů¹⁰²

Tab. 5: Alkaloidy kůry *Virola sebifera*

Typ sloučeniny	Název	Literatura
Indolové alkaloidy	<i>N</i> -metyl- <i>N</i> -acetyltryptamin	103
	<i>N</i> -metyl- <i>N</i> -formyltryptamin	103
	<i>N,N</i> -dimetyltryptamin	103, 104
	<i>N,N</i> -dimetyltryptamin- <i>N</i> -oxid	103
	<i>N</i> -monometyltryptamin	103
β -karbolinové alkaloidy	2-methyl-1,2,3,4-tetrahydro- β -karbolin	103

V oblasti testování cytotoxicity jsem narazila na jednu studii se zajímavými výsledky, bohužel byly testovány pouze různé extrakty listů *Virola sebifera*, nikoli extrakty kůry, nebo její obsahové látky, zajímavý by mohl být např. 2-methyl-1,2,3,4-tetrahydro- β -karbolin. DCM extrakt z listů dosáhl nejlepších výsledků a selektivity vůči linii plicních buněk (NCI-460) - IC₅₀: 4,46 μ g/mL.⁹⁴

Kromě alkaloidů byly v kůře, semenech a listech *Virola* identifikovány také mastné kyseliny, flavonoidy, lignany, polyketidy, taniny a terpeny. V tradiční medicíně se kůra využívala jako antiulcerogenikum a antirevmatikum.⁹⁴ Žlutý olej ze semen se používal

k ošetření kůže a vlasů pro své hydratační, změkčující a antiseptické vlastnosti a stále se používá v současné kosmetice.⁹⁵ V lidové medicíně se však uplatňoval i v léčbě astmatu, revmatu nebo střevních parazitů.⁹⁶

III.3.5 VIOLA SURINAMENSIS (KŮRA)

Viola surinamensis (Warb.) je dalším z mnoha druhů rodu *Viola* z čeledi Myristicaceae (muškátovníkovité). Jedná se rovněž o štíhlý strom tropických pralesů Střední a Jižní Ameriky, rostoucí zejména podél řek, hojně rozšířený¹⁰⁵ a přesto ohrožený¹⁰⁶. Z mnoha různých místních názvů se asi nejčastěji setkáme s pojmenováním ucuuba branca, používaným v Brazílii, tedy „ucuuba bílá”.¹⁰⁵ Zdá se, že označení se vztahuje spíše k bělavému zbarvení listů, než k barvě květů, které jsou žluté. Můžeme se setkat také s dalším latinským názvem *Viola nobilis* A. C. Sm., pod kterým je tento druh popsán v článku z roku 2019.⁹⁶

Viola surinamensis dorůstá do výšky až 40 m, má rovný kmen, někdy s pilíři kořenů na bázi, a začíná se větvit až ve značné výšce nad zemí. Kůra má načervenalou barvu a při naříznutí vytéká červený exudát. Listy jsou kožovité, podlouhle eliptické se špičatým vrcholkem, 9 až 17 cm dlouhé a 2,5 až 5 cm široké, s výraznými příčnými žilkami, četnějšími než u *Viola sebifera*, řapíkaté, světlé až bělavé a na spodní straně s nenápadnými chloupky. Květy jsou jednopohlavné, umístěné v květenstvích typu lata. Vlastní květy mají nálevkovité kalichy žluté barvy. Plody jsou žluté až oranžové, eliptické až kulaté, dužnaté, o velikosti 2,5 x 2,3 cm, s tlustším oplodím než u *Viola sebifera*, pukavé, jednosemenné, nejednoznačného charakteru. Uvnitř je útvar vzhledu muškátového oříšku. Fotografie kmenu a květů *Viola surinamensis* ukazují obrázky 13 a 14.

Identifikačními znaky druhu *Viola surinamensis* jsou určité charakteristiky tvaru, žilnatiny a ochlupení listů a detaily ve vzhledu květů a plodu. Podrobné informace uvádí opět rozsáhlý článek z roku 2019.⁹⁶

V tradičním léčení se využívaly listy, semena a kůra *Viola surinamensis*. Stejně jako *Viola sebifera* proslul tento druh hlavně domnívaným použitím v náboženských rituálech původních amazonských kmenů. Ve *Viola surinamensis* však přítomnost indolových alkaloidů, které mají být dle vědeckých prací zodpovědné za navození halucinogenních účinků, zatím nebyla prokázána.⁹⁸



Obr. 13 a 14: *Virola surinamensis* – fotografie kmenu¹⁰⁷ a fotografie květů¹⁰⁷

Pro účely této práce byla vybrána kůra *Virola surinamensis* na základě průkazu přítomnosti alkaloidů v kůře příbuzného druhu - *Virola sebifera*. Pokusy o průkaz a identifikaci alkaloidů i dalších obsahových látek ve vzorcích kůry, listů i semen různých druhů rodu *Virola* mají bohužel značně variabilní výsledky a to i v rámci stejného druhu z různých lokalit.^{98,99,108}

Virola surinamensis přes možnou nepřítomnost alkaloidů nicméně disponuje řadou biologických účinků, jejichž nositeli se zdají být zejména neolignany a flavonoidy. Přehled obsahových látek s biologickým účinkem a zároveň přehled tradiční léčby *Virola surinamensis* uvádí tabulka 6, kterou jsem převzala z práce¹⁰⁹, upravila a doplnila.

Tab. 6: Obsahové látky s biologickým účinkem a tradiční léčba *Virola surinamensis*¹⁰⁹

Část rostliny	Typ extraktu	Tradiční léčba	Biologický účinek	Typ sloučeniny	Název látky	Literatura
Pryskyřice	EtOH	Vřed, zánět, nádor	Inhibice žaludečních lézí	Flavonoidy	Epikatechin	110
Míza	-----	-----	Cytotoxický	-----	-----	111
Kůra kmene	EtOH	Zánět, nádor	Antibakteriální, antifungální	Flavonoidy Fenoly, Taniny	Katechin	112
Listy	Odvar	Kolika, dyspepsia	Snížení nocicepce, protizánětlivý	Neolignany	Grandisin	113
	Hexan	-----	Aktivita proti <i>Schistosoma</i> a <i>Leishmania</i>	Neolignany	Surinamensin*	114,115, 116
	Esenc. olej	Malárie	Antimalarický	Seskviterpeny	Nerolidol	117
Větvičky	DCM	-----	Aktivita proti <i>T.cruzi</i>	Lignany Neolignany	Veraguensin Grandisin	118
			Inhibice CYP2C9 a CYP3A4/5	Neolignany	Grandisin	119
Kořeny	DCM	-----	Antifungální	Flavonoidy	7-hydroxyflavanone 7-hydroxy-4'- methoxyisoflavone	120
Semena	Olej	Kožní záněty, hojení	-----	-----	-----	109

* Dle výsledků¹¹⁶ za tento účinek pravděpodobně nezodpovídá surinamensin

IV. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

IV.1 VŠEOBECNÉ POSTUPY

IV.1.1 ÚPRAVA ROZPOUŠTĚDEL PŘED POUŽÍVÁNÍM

Všechna rozpouštědla, která byla při práci použita, byla předem přečištěna destilací. Po zachycení destilačního předku byla dle tabelární hodnoty teploty varu daného rozpouštědla jímána hlavní frakce (bylo předestilováno maximálně 95 % objemu rozpouštědla). Všechna rozpouštědla byla uchovávána ve skleněných tmavých lahvích.

IV.1.2 ODPAŘOVÁNÍ ROZTOKŮ A SUŠENÍ EXTRAKTŮ

Rozpouštědla byla z extraktů v baňkách odstraňována pomocí vakuové rotační odparky Laborota 4000 (Heidolph) při teplotě 40 až 50 °C na vodní lázni za sníženého tlaku. Velmi malá množství extraktů v 5 ml injekčních ampulkách byla odpařena na jehle v proudu filtrovaného vzduchu při teplotě maximálně 50 °C na vodní lázni. Ampulky se sušily ve vakuovém exsikátoru nad perlami silikagelu.

IV.1.3 OBECNÉ PODMÍNKY PROVEDENÍ TENKOVRSŤVÉ CHROMATOGRAFIE (TLC)

TLC byla prováděna v systému normálních komor (N), vzestupně. Použité komory byly nasyceny mobilní fází, přičemž sycení komory trvalo přibližně 1 hodinu.

IV.2 POTŘEBY

IV.2.1 PRO PŘÍPRAVU EXTRAKTŮ, TLC A GC/MS ANALÝZU

IV.2.1.1 ROZPOUŠTĚDLA

Diethylamin p. a. (Ing. Švec – Penta, Praha) (Et_2NH)

Diethylether p. a. (Lach-Ner, Neratovice) (Et_2O)

Ethanol č. 95%, denaturovaný methanolem (EtOH)

Ethylacetát p. a. (Ing. Švec – Penta, Praha) (EtOAc)

n-Hexan p. a. (Ing. Švec – Penta, Praha) (C_6H_{14})

Chloroform č. ($CHCl_3$)

Methanol p. a. (Ing. Švec – Penta, Praha) (MeOH)

Toluen p. a. (Ing. Švec – Penta, Praha) (To)

IV.2.1.2 CHEMIKÁLIE

Dusičnan bismutitý (Lach-Ner, Neratovice) ($Bi(NO_3)_3$)

Chlorid rtuťnatý (Lach-Ner, Neratovice) ($HgCl_2$)

Jodid draselný (Lach-Ner, Neratovice) (KI)

Kyselina chlorovodíková 36% p. a. (Ing. Švec – Penta, Praha) (HCl)

Kyselina vinná (Lach-Ner, Neratovice) ($C_4H_6O_6$)

Síran sodný (Lach-Ner, Neratovice) (Na_2SO_4)

Uhličitan sodný (Ing. Švec – Penta, Praha) (Na_2CO_3)

IV.2.1.3 DETEKČNÍ ČINIDLA

D 1: Dragendorffovo činidlo [Munier R.: Bull. Soc. Chim. Biol. 35, 1225 (1953)]

Roztok A byl připraven rozpuštěním 1,7 g zásaditého dusičnanu bismutitého a 20 g kyseliny vinné v 80 ml vody.

Roztok B byl připraven rozpuštěním 16 g jodidu draselného ve 40 ml vody.

Zásobní roztok byl připraven smísením roztoků A a B v objemovém poměru 1:1.

Detekční roztok byl připraven přidáním 5 ml zásobního roztoku k roztoku 10 g kyseliny vinné v 50 ml vody.

Detekčním roztokem se postříká chromatografická deska po skončení UV detekce.

Pokud jsou ve vzorku obsaženy alkaloidy, reagují s činidlem za vzniku oranžové až oranžovočervené sraženiny.

Zásobní i detekční roztok může být uchováván v chladničce při teplotě 4 °C po dobu několika měsíců.

D 2: Mayerovo činidlo [Československý lékopis, vyd. 3. díl I., Avicenum, Praha 1971]

5 g jodidu draselného bylo rozpuštěno v 30 ml vody a do vzniklého roztoku bylo přidáno 1,35 g chloridu rtuťnatého. Objem činidla byl doplněn do 100 ml. Vzniklý roztok byl čirý, nažloutlé barvy.

Činidlo se používá k detekci alkaloidů v organickém rozpouštědle po okyselení - tetrajodortuňtan draselný reaguje s alkaloidy za vzniku mléčného zákalu.

Činidlo může být uchováváno v chladničce při teplotě 4 °C po dobu několika měsíců.

IV.2.1.4 VYVÍJECÍ SOUSTAVY PRO TENKOVrstvou CHROMATOGRÁFII

S 1: To-Et₂NH 95:5

S 2: To-CHCl₃- Et₂NH 70:25:5

IV.2.1.5 CHROMATOGRAFICKÉ ADSORBENTY

Komerční analytické TLC desky Silica gel 60 GF254 (Merck Millipore, Praha) o rozměrech 20 × 20 cm. Pro analytické účely byly použity desky o výšce 10 cm a variabilní šířce podle počtu analyzovaných vzorků.

IV.2.1.6 POMOČNÝ MATERIÁL

Křemelina (Sigma Aldrich, Praha)

Silikagel sušící perly (Ing. Švec – Penta, Praha)

Vata

Vlíselin

IV.2.1.7 PŘÍSTROJE

Ultrazvuková lázeň Sonorex Super 10P (Bandelin, Berlin, Německo)

Vakuová odparka Laborota 4000 (Heidolph, Schwabach, Německo)

Spektrometr EI-MS na GC-MS system using an Agilent 7890A GC 5975 inertní MSD; EI mód 70 eV; kolona DP-5 MS (30m x 0,25 mm x 0,25 μm) (Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA)

Laboratorní mlýnek IKA A11 basic (IKA - WERKE GMBH & CO. KG, Staufen, Německo)

IV.2.2 PRO STANOVENÍ ANTICHOLINESTERASOVÉ AKTIVITY

IV.2.2.1 CHEMIKÁLIE

Acetylthiocholin jodid (Sigma Aldrich, Praha) (použit 10 mM roztok)

Butyrylthiocholin jodid (Sigma Aldrich, Praha) (použit 10 mM roztok)

Citrát sodný (Sigma Aldrich, Praha) 3,4%

Dimethylsulfoxid p. a. (Sigma Aldrich, Praha) (DMSO)

5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina $\geq 98\%$ (DTNB) (použit 5 mM roztok)

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

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

Pufry:

5mM fosfátový pufr o pH 7,4 byl připraven smísením 57 ml roztoku A, 283 ml roztoku B a 300 ml vody. Zásobní roztok A je 10 mM roztokem NaH_2PO_4 (1 litr roztoku obsahuje 1,20 g NaH_2PO_4) a zásobní roztok B je 10 mM roztokem Na_2HPO_4 (1 litr roztoku je obsahuje 1,42 g Na_2HPO_4).

5mM fosfátový pufr o pH 7,4 s obsahem 150 mM chloridu sodného byl připraven z 8,766 g chloridu sodného p. a., jež byl rozpuštěn v 5mM fosfátovém pufru pH 7,4 a poté jím doplněn do 1000 ml.

100mM fosfátový pufr o pH 7,4 byl připraven smísením 57 ml roztoku A, 243 ml roztoku B a 300 ml vody. Zásobní roztok A je 200 mM roztokem NaH_2PO_4 (1 litr roztoku obsahuje 24,0 g NaH_2PO_4). Zásobní roztok B je 200 mM roztokem Na_2HPO_4 (1 litr roztoku obsahuje 28,4 g Na_2HPO_4).

IV.2.2.2 PŘÍSTROJE

Centrifuga

Mikrotřepačka

Počítač s programem GraphPad Prism

Polarimetr P3000 (A. Krüss Optronic, Hamburg, Německo)

Reader SynergyTM HT Multi-Detection Microplate Reader (BioTek Instruments, Inc., Winooski, Vermont, USA)

Microplate ELISA reader AL800 (Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, Vermont, USA)

Kultivační mikrotitrační destičky (TPP, Švýcarsko) – plastové, sterilní, 96-jamkové

IV.3 IZOLACE

IV.3.1 BIOLOGICKÝ MATERIÁL

Pro přípravu extraktů byly použity komerčně dostupné drogy dodané firmou Amazon herbs (Surinam), jejichž přehled je uveden v tabulce 7.

Tab. 7: Přehled použitého biologického materiálu

Číslo vzorku	Taxon	Část	Země původu	Výrobce	Způsob úpravy
AL-674	<i>Geissospermum vellosii</i>	Kůra	Surinam	Amazon herbs	Řezaná
AL-675	<i>Calotropis gigantea</i>	Nať	Surinam	Amazon herbs	Řezaná
AL-677	<i>Cissampelos pareira</i>	Stonky	Surinam	Amazon herbs	Řezaná
AL-678	<i>Virola sebifera</i>	Kůra	Surinam	Amazon herbs	Řezaná
AL-679	<i>Virola surinamensis</i>	Kůra	Surinam	Amazon herbs	Řezaná

IV.3.2 PŘÍPRAVA SUMÁRNÍHO EXTRAKTU

Jednotlivé drogy byly v laboratorním mlýnku rozemlety na velikost částic ca 1 až 2 mm. Do Erlenmayerovy baňky bylo vsypáno celé množství odvážené drogy (cca 30 g), které bylo následně přelito 250 ml EtOH 95% - droga byla ponořená a nad ní cca 3 cm kapaliny. Byly vloženy varné kamínky a obsah baňky se vařil pod zpětným chladičem na vodní lázni 20 minut. Poté se baňka s obsahem ponechala asi 15 minut zchladnout mimo vodní lázeň a tekutina byla zfiltrována přes filtr ze silnějšího vliselinu. Toto vyvaření bylo provedeno celkem 3x. Spojené filtráty byly nakonec přečištěny přes vrstvičku neutrální křemelinu vakuovou filtrací v tubusu (fotografie - obrázek 15). Z výsledného filtrátu se na rotační odparce zcela odstranilo rozpouštědlo (fotografie - obrázek 16). Snesením nezbytně nutného množství vysušeného extraktu ze stěn destilační baňky byl získán materiál pro navážení cca 50 mg vzorku do penicilinky (fotografie - obrázek 17). Ke vzorku se přidalo minimální množství EtOH a provedlo se odpaření na jehle v proudu vzduchu. Vzorky těchto sumárních extraktů byly uloženy na Katedře farmakognozie pod označeními AL-674-A, AL-675-A, AL-677-A, AL-678-A a AL-679-A.



Obr. 15, 16 a 17: Vakuová filtrace přes křemelinu; odpaření rozpouštědla na rotační odparce; navážení vzorků sumárních extraktů

IV.3.3 PŘÍPRAVA ALKALOIDNÍHO EXTRAKTU PRO SCREENING

Zbýlý odpařený sumární extrakt v baňce byl smíchán s 200 ml 2% HCl (která byla připravena naředěním 36% HCl) a zahříván na vodní lázni. Po vychladnutí byla baňka se suspenzí umístěna do ultrazvukové lázně SONOREX a sonikována při normální teplotě a stupni 10 po dobu 5 minut. Zakalený obsah baňky byl poté vakuově zfiltrován přes nízkou vrstvu křemeliny. Čirý filtrát byl 3x vytřepán s 1/3 svého objemu predestilovaným n-hexanem, čímž došlo k odstranění nežádoucích nečistot (silice, tuky). Vodná kyselá vrstva byla po převrstvení EtOAc zalkalizována 10% roztokem Na_2CO_3 na pH 10 a 3x vytřepána s 1/3 svého objemu predestilovaným EtOAc (fotografie - obrázky 18 a 19). Ve zbylé vodné fázi byla po okyselení na pH 3 (přidáním 2% HCl) ověřena nepřítomnost alkaloidů reakcí s Mayerovým činidlem. Spojené EtOAc výtřepky byly v zabroušené baňce po dobu cca 30 minut přerušovaně protřepávány s několika g bezvodého Na_2SO_4 - až do vyčeření kapaliny – a tímto způsobem byly zbaveny zbytků vody. Poté byl alkaloidní extrakt zfiltrován přes malou vrstvu vaty a filtrát byl zcela zbaven EtOAc na vakuové odparce. Alkaloidní extrakty byly označeny jako AL-674-E, AL-675-E, AL-677-E, AL-678-E a AL-679-E, byly zváženy jejich výtěžky a provedena kontrolní TLC (podrobněji v následující kapitole).

Každý odparek byl následně rozpuštěn v malém množství odměřeného EtOAc a převeden do zvážených injekčních ampulek. U vzorků, kde kontrolní TLC detekovala alkaloidy, do 3 ampulek tak, aby hmotnost v prvních dvou ampulkách byla 10 až 12 mg

v každé ampulce a ve 3. ampulce byl zbytek výtřepku. Přesného rozplnění bylo dosaženo metodou počítání kapek. U ostatních vzorků bylo celé množství převedeno do 1 ampulky. Rozpouštědlo bylo z ampulek odstraněno na jehle v proudu vzduchu, označené ampulky byly dosušeny ve vakuovém exsikátoru nad perlami silikagelu (po dobu 16 h) a nakonec zváženy.



Obr. 18 a 19: Vytřepávání filtrátu s EtOAc (po vyčištění n-hexanem a alkalizaci)

IV.3.4 KONTROLNÍ TENKOVrstvá CHROMATOGRÁFIE

Přibližně 1 mg každého extraktu byl rozpuštěn v mikrozkušavce nejprve v 1 až 2 kapkách EtOH, pak byly přidány 1 až 2 kapky CHCl_3 . Po usazení zákalu na dně zkumavky byl čirý roztok svrchu každé zkumavky nanesen na chromatografickou desku, která se nechala vyvinout v soustavě S 1 ($\text{To-Et}_2\text{NH}$ 95:5). Stejný postup byl zopakován pro soustavu S 2 ($\text{To-CHCl}_3\text{-Et}_2\text{NH}$ 70:25:5). Po vysušení desek se skvrny extraktů detekovaly pod UV (při 254 a 366 nm) a následně byly postříkány Dragendorffovým činidlem.

IV.3.5 GC/MS ANALÝZA ALKALOIDNÍHO EXTRAKTU

Analýza alkaloidních extraktů všech vzorků rostlin byla provedena pomocí plynového chromatografu Agilent 7890A GC 5975 inertní MSD, který pracuje s hmotnostním detektorem při elektronové ionizaci 70 eV (Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA), kolona HP-5 MS (30m × 0,25 mm × 0,25 μm; Agilent Technologies, Santa Clara,

California, USA). Pro analýzu byl zvolen následující teplotní program: 100 °C – 180 °C (15 °C/min), 180 °C (1 min), 180 – 300 °C (5 °C/min), 300 °C (15 min). Jako nosný plyn bylo použito helium o průtokové rychlosti 0,8 ml/min. Vzorky byly nastříkovány při teplotě 280 °C v množství 1 µl methanolického roztoku alkaloidního extraktu (koncentrace 1 mg/µl) při splitu 1:10.

IV.3.6 STANOVENÍ BIOLOGICKÉ AKTIVITY ALKALOIDNÍHO EXTRAKTU NA INHIBICI ACETYLCHOLINESTERASY A BUTYRYLCHOLINESTERASY

IV.3.6.1 BIOLOGICKÝ MATERIÁL A JEHO ÚPRAVA

Enzymy pro testování byly získány z čerstvé krve zdravých dobrovolníků – AChE z hemolyzátu erytrocytů (jejich pouzder) a BuChE z plazmy.

K odebrané krvi byl přidán 3,4% citrát sodný jako protisrážlivé činidlo (1 ml na 10 ml krve). Plazma byla z krve odstředěna centrifugou při rychlosti 4000 ot./min., oddělena pro stanovení inhibiční aktivity vůči BuChE a uchovávána ve zkumavkách při teplotě 4 °C do dalšího zpracování (maximálně 6 hodin).

Erytrocyty byly přemístěny do zkumavek o objemu 50 ml a 3x promyty 5mM fosfátovým pufr (pH 7,4) obsahujícím 150 mM NaCl (centrifugací 12000 ot./min.). K promytým erytrocytům se přidal 5mM fosfátový pufr (pH 7,4) v poměru 9:1 (erytrocyty:pufr) a tato suspenze byla asi 10 minut míchána, přičemž hemolyzovala. Okamžitě se změřila aktivita hemolyzátu, v případě potřeby byla upravena jeho absorbance na hodnotu 0,08–0,15 pomocí 5mM fosfátového pufru. Následovala další centrifugace (20000 ot./min.) a promytí pouzder erytrocytů 3x fosfátovým pufr. Upravený materiál byl přenesen do mikrozkušavek a uchováván při -22°C do doby použití.

Byla stanovena cholinesterasová aktivita plazmy, v případě potřeby byla upravena její absorbance na požadovanou hodnotu 0,15–0,20 a získaná plazma byla uchovávána stejným způsobem jako hemolyzát.

IV.3.6.2 STANOVENÍ CHOLINESTERASOVÉ INHIBIČNÍ AKTIVITY (IC₅₀)

Cholinesterasová aktivita byla stanovena s použitím Ellmanovy spektrofotometrické metody. Tato metoda je založena na barevné změně DTNB po navázání SH-skupin thiocholinu (vzniká žlutě zbarvený produkt). Cholinesterasy (enzymy) přidávané k příslušným

esterům thiocholinu (substráty) je štěpí na kyselinu a thiocholin, jehož narůstající koncentrace se spektrofotometricky stanovuje při vlnových délkách 436 nm (pro AChE) a 412 nm (pro BuChE). Byl změřen nárůst absorbance za 1 minutu, odpovídající nárůstu koncentrace barevného produktu reakce DTNB a thiocholinu.

Do jamek mikrotitračních destiček se napipetovalo 8,3 μ l hemolyzátu (AChE) nebo plazmy (BuChE), přidalo se 283 μ l 5 mM DTNB (připravené naředěním 100mM fosfátovým pufrům) a 8,3 μ l DMSO (rozpouštědla použitého pro ředění vzorků). Pro měření aktivit enzymů bez inhibitoru (v 6 jamkách) a vytvoření slepého vzorku byl použit samotný DMSO, pro měření testovaných extraktů pak DMSO obsahující jejich různé koncentrace (20, 2, 0,2, 0,02 a 0,002 mg/ml). Po promíchání na mikrotřepačce po dobu 1 minuty se směs inkubovala v komoře přístroje Reader SynergyTM HT Multi-Detection Microplate Reader po dobu 5 minut při teplotě 37 °C. Následně se přidalo 33,3 μ l roztoku substrátu (10 mM acetylcholinthiojodidu nebo 10 mM butyrylthiocholinjodidu) a po 2 minutách se zjistila absorbance při příslušné vlnové délce.

Z naměřených hodnot poklesu aktivity AChE nebo BuChE v přítomnosti potenciálního inhibitoru (testovaného vzorku) byly následně vypočteny hodnoty IC_{50} (50% inhibiční koncentrace) nelineární regresí v programu GraphPad Prism. Zjištěné výsledky byly porovnány s hodnotami IC_{50} referenčních inhibitorů AChE – galantaminem (IC_{50} AChE = 1,71 \pm 0,07 μ M, IC_{50} BuChE = 42,30 \pm 1,30 μ M) a huperzinem A (IC_{50} AChE = 0,033 \pm 0,001 μ M, IC_{50} BuChE > 1000 μ M). Inhibice (I) v % byla vypočtena z následujícího vzorce: $I = 100 - (\Delta ABL / \Delta ASA) \times 100$, kde ΔABL je nárůst absorbance slepého vzorku za 1 minutu a ΔASA je nárůst absorbance měřeného vzorku. Výše popsaným způsobem se vypočetl rozdíl a stanovil průměr a směrodatná odchylka.

IV.3.7 STANOVENÍ PROTINÁDOROVÉ AKTIVITY ALKALOIDNÍHO EXTRAKTU

Cytotoxicitu proti vybraným buněčným liniím stanovoval RNDr. Radim Havelek, Ph.D. z Ústavu lékařské biochemie Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové.

Stanovení probíhalo na buněčných liniích Jurkat (akutní leukémie T-buněk), MOLT-4 (akutní lymfoblastická leukémie), A549 (karcinom plic), HT-29 (kolorektální adenokarcinom), PANC-1 (epiteliální karcinom pankreatu), A2780 (karcinom ovarií), HeLa (adenokarcinom děložního čípku), MCF-7 (adenokarcinom prsu), SAOS-2 (osteosarkom) a na jedné kontrolní linii nenádorových buněk MRC-5 (primární lidské plicní fibroblasty).

U jednotlivých extraktů se měřila buněčná viabilita po jejich 48hodinovém působení, která je vyjádřena jako procento přeživších buněk. Referenční sloučeninou byl doxorubicin. Buňky byly vystavovány extraktům o koncentraci 50 µg/ml a doxorubicinu 1 µmol/L.

Detekce byla provedena metodou MTT testu, který je založen na buněčném vychytávání žlutého barviva MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromid) a jeho následné redukci v mitochondriích přeživších buněk na tmavě modrý krystalický formazan, jehož absorbance je spektrofotometricky měřena při 440 nm.

V. VÝSLEDKY

V.1 PŘÍPRAVA ALKALOIDNÍCH EXTRAKTŮ

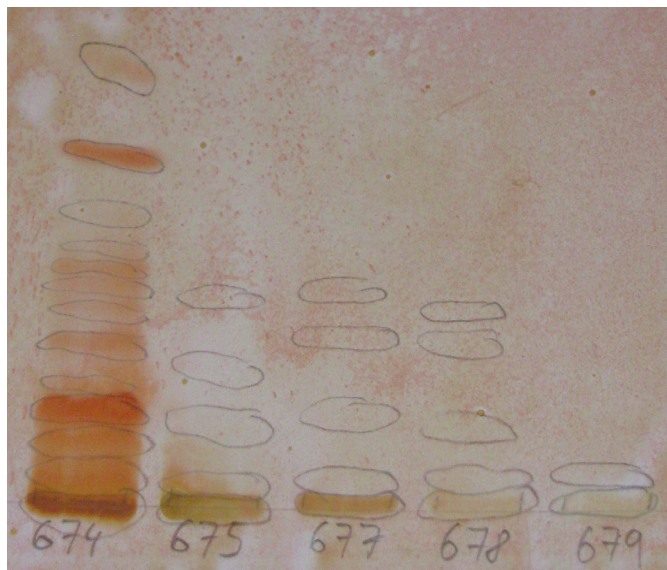
Zpracování morfologických částí vybraných taxonů přineslo data shrnutá v tabulce 8. Nejvyšší výtěžek poskytlo zpracování *Geissospermum vellosii*, naopak z *Virola surinamensis* byl získán výtěžek téměř 4x nižší.

Tab. 8: Zpracování morfologických částí vybraných taxonů

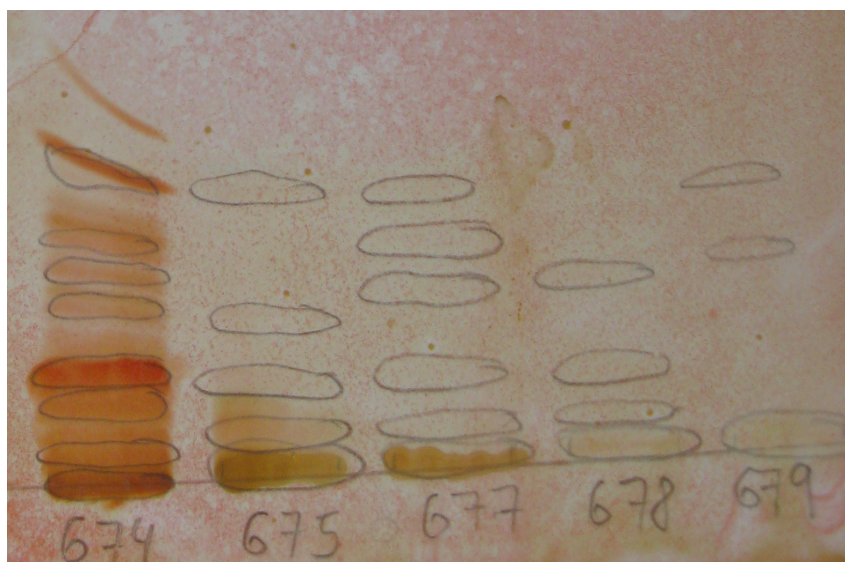
Číslo vzorku	Taxon	Část	Původ	Množství (g)	Extrakt EtOAc (g)	Výtěžek (%)
AL-674	<i>Geissospermum vellosii</i>	Kůra	Amazon herbs, Surinam	30,02	0,1095	0,36
AL-675	<i>Calotropis gigantean</i>	Nať	Amazon herbs, Surinam	10,33 19,70	0,0593	0,20
AL-677	<i>Cissampelos pareira</i>	Stonky	Amazon herbs, Surinam	30,02	0,0434	0,14
AL-678	<i>Virola sebifera</i>	Kůra	Amazon herbs, Surinam	30,03	0,0503	0,17
AL-679	<i>Virola surinamensis</i>	Kůra	Amazon herbs, Surinam	30,03	0,0299	0,10

V.2 KONTROLNÍ TENKOVrstVÁ CHROMATOGRafIE

Kontrolní TLC potvrdila (detekce UV, Dragendorffovo činidlo) přítomnost alkaloidů v extraktech *Geissospermum vellosii*, *Calotropis gigantea* a *Virola sebifera*. Fotografie výsledků ukazují obrázky 20 a 21, nicméně skvrny byly nejlépe viditelné ihned po postříkání Dragendorffovým činidlem, fotografie byly pořízeny o něco později.



Obr. 20: Kontrolní TLC sumárních extraktů AL-674-A, AL-675-A, AL-677-A, AL-678-A a AL-679-A, To-Et₂NH 95:5, komora nasycená, vyvíjení 2x, detekce Dragendorffovo činidlo.

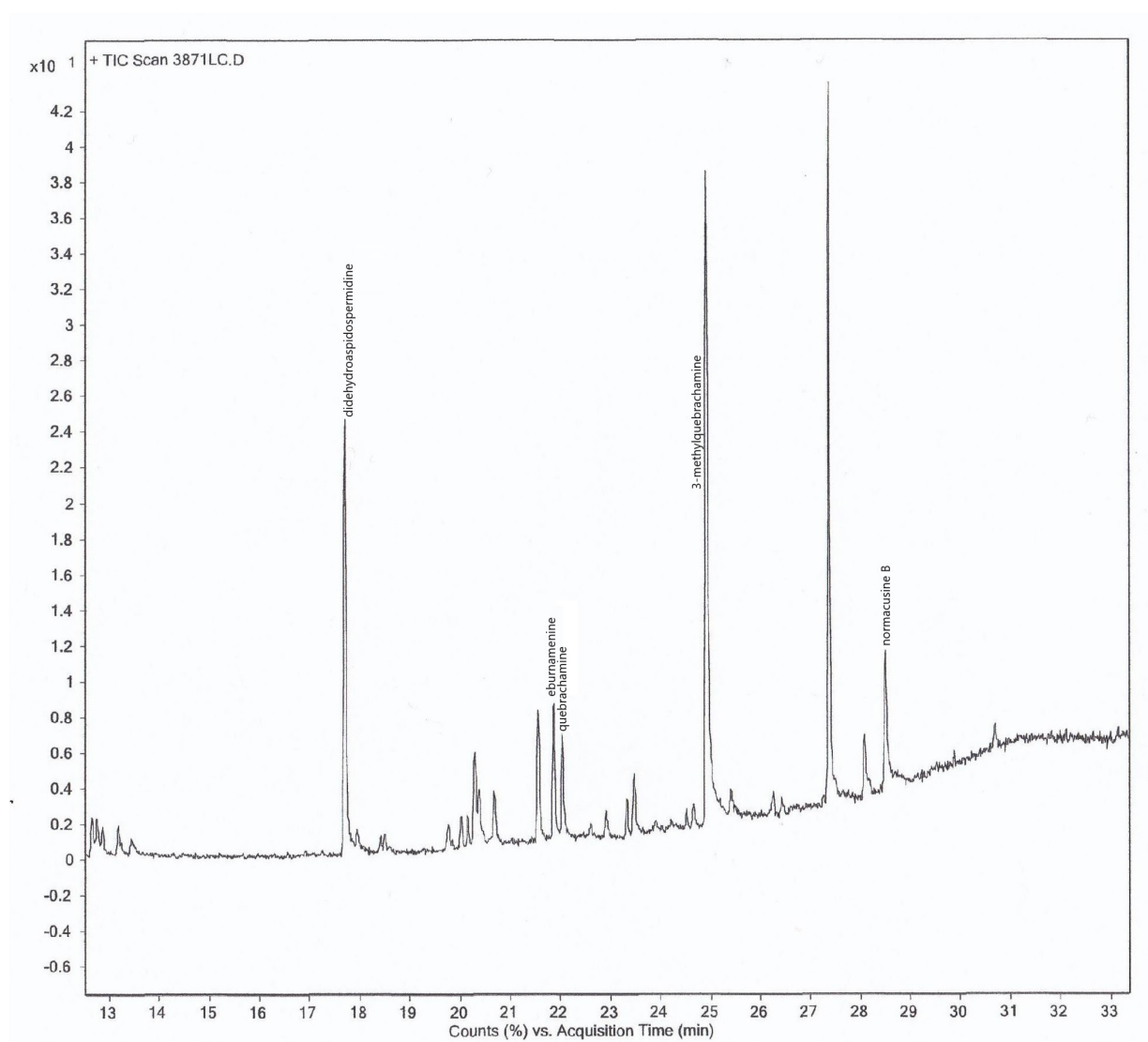


Obr. 21: Kontrolní TLC spojených frakcí z alkaloidních výtřepků AL-674-E, AL-675-E, AL-677-E, AL-678-E a AL-679-E, To-CHCl₃-Et₂NH 70:25:5, komora nasycená, vyvíjení 2x, detekce Dragendorffovo činidlo.

V.3 GC/MS ANALÝZA ALKALOIDNÍCH EXTRAKTŮ

Připravený extrakt z *Geissospermum vellosii* byl podroben GC/MS analýze za účelem identifikace obsahových látek. Screening ukázal přítomnost alespoň 13 látek, které bylo možné pomocí této metody zaznamenat (obrázek 22). Po porovnání spekter přítomných látek s knihovnou můžeme předpokládat v extraktu přítomnost didehydroaspidospermidinu, eburnameninu, quebrachaminu, 3-methylquebrachaminu a normacusine B. Další látky však nemusí zplyňovat, a proto se předpokládá přítomnost dalších zajímavých látek, které patří do skupiny indolových a β -karbolinových alkaloidů.

Ostatní extrakty po analýze nevykazovaly přítomnost sekundárních metabolitů, proto nebyly v rámci práce použity záznamy z plynového chromatografu.



Obr. 22: GC/MS analýza alkaloidního extraktu AL-674-E (*Geissospermum vellosii*).

V.4 STANOVENÍ BIOLOGICKÉ AKTIVITY ALKALOIDNÍCH EXTRAKTŮ NA INHIBICI ACETYLCHOLINESTERASY A BUTYRYLCHOLINESTERASY

U extraktů s TLC potvrzenou (detekce UV, Dragendorffovo činidlo) přítomností alkaloidů (*Geissospermum vellosii*, *Calotropis gigantea* a *Virola sebifera*) byla dále stanovena jejich inhibiční aktivita vůči lidské AChE a BuChE pomocí Ellmanovy metody a porovnána se standardy (galantamin, huperzin A a rivastigmin). EtOAc extrakt kůry *Geissospermum vellosii* dosáhl hodnot inhibiční aktivity s IC_{50} pro AChE $15,19 \pm 0,96$ $\mu\text{g/ml}$ a pro BuChE $0,37 \pm 0,049$ $\mu\text{g/ml}$. Výsledky zobrazuje tabulka 9.

Tab. 9: Inhibice AChE a BuChE extraktů z morfologických částí vybraných taxonů

Číslo vzorku	Taxon	Část	IC_{50} extraktů EtOAc a standardů ($\mu\text{g/ml}$)	
			AChE	BuChE
AL-674	<i>Geissospermum vellosii</i>	Kůra	$15,19 \pm 0,96$	$0,37 \pm 0,049$
AL-675	<i>Calotropis gigantea</i>	Nať	> 500	$128,7 \pm 13,42$
AL-678	<i>Virola sebifera</i>	Kůra	> 500	$431,45 \pm 58,42$
Standard				
	Galantamin		$0,51 \pm 0,019$	$12,16 \pm 0,37$
	Huperzin A		$0,008 \pm 0,0$	> 242
	Rivastigmin		$0,009 \pm 0,0$	$0,0008 \pm 0,0$

V.5 STANOVENÍ PROTINÁDOROVÉ AKTIVITY ALKALOIDNÍCH EXTRAKTŮ

Také byla otestována protinádorová aktivita těchto extraktů na nádorových liniích Jurkat, MOLT-4, A549, HT-29, PANC-1, A2780, HeLa, MCF-7, SAOS-2 a kontrolní nenádorové linii MRC-5 s využitím metody MTT a výsledky porovnány s referenčními hodnotami doxorubicinu. Výsledky stanovení protinádorové aktivity jsou znázorněny jako aritmetický průměr ze tří nezávislých měření \pm směrodatná odchylka. EtOAc extrakt kůry *Geissospermum vellosii* dosáhl hodnot cytotoxicity významně lepších než referenční doxorubicin u linií Jurkat, HT-29, PANC-1, MCF-7, SAOS-2, totéž ovšem platí i pro nenádorovou linii MRC-5. Na základě těchto výsledků lze kůru *Geissospermum vellosii* doporučit k detailnějšímu výzkumu.

Tab. 10: Stanovení protinádorové aktivity alkaloidního extraktu

Buněčná linie	% přeživších buněk	
	AL-674	Doxorubicin
Jurkat	5,03 \pm 0,72	8,98 \pm 6,75
MOLT-4	7,42 \pm 2,33	3,50 \pm 1,69
A549	7,42 \pm 3,36	6,78 \pm 4,43
HT-29	11,63 \pm 1,65	39,43 \pm 7,48
PANC-1	18,21 \pm 2,03	62,97 \pm 4,87
A2780	9,75 \pm 0,85	5,08 \pm 1,34
HeLa	14,11 \pm 7,47	10,08 \pm 5,46
MCF-7	6,04 \pm 1,02	36,06 \pm 2,41
SAOS-2	16,91 \pm 13,28	35,90 \pm 13,67
MRC-5	8,53 \pm 1,70	25,86 \pm 18,70

VI. DISKUSE

V této práci jsme studovali a analyzovali pět velmi zajímavých tropických rostlin. Všechny mají bohatý léčebný potenciál a dlouhou historii používání v tradičním léčitelství. Původní záměr literární rešerše, tedy vyhotovení přehledných tabulek obsažených alkaloidů a jejich biologických účinků, bylo nutné přizpůsobit dostupným informacím o jednotlivých rostlinách. Proto jsou tabulky u každé rostliny pojaty trochu jiným způsobem, tak aby co nejprehledněji shrnovaly současné poznatky na tomto poli.

Z literární rešerše obsahových látek kůry *Geissospermum vellosii* vyplynul dlouhý seznam alkaloidů již identifikovaných v této rostlině, nebylo tedy překvapením, že námi provedená kontrolní TLC jejich přítomnost také jasně potvrdila. Kůra *Geissospermum vellosii* navíc poskytla největší výtěžek sušiny EtOAc extraktu. Pro tuto rostlinu je již dostupná řada studií biologických účinků, a to nejen pouze pro její extrakty, ale i pro mnohé z izolovaných alkaloidů. Tyto studie uvádějí zejména cytotoxické, antiparazitické a anticholinesterásové účinky.

V naší práci dosáhl EtOAc extrakt kůry *Geissospermum vellosii* hodnot inhibiční aktivity s IC_{50} pro AChE $15,19 \pm 0,96 \mu\text{g/ml}$ a pro BuChE $0,37 \pm 0,049 \mu\text{g/ml}$ a zároveň i hodnot cytotoxicity významně lepších než referenční doxorubicin u linií Jurkat, HT-29, PANC-1, MCF-7, SAOS-2, totéž ovšem platí i pro nenádorovou linii MRC-5. GC/MS analýza ukázala přítomnost alespoň 13 látek, které bylo možné pomocí této metody zaznamenat. Po porovnání spekter přítomných látek s knihovnou můžeme předpokládat v extraktu přítomnost didehydroaspidospermidinu, eburnameninu, quebrachaminu, 3-methylquebrachaminu a normacusicinu B. Z uvedených látek byl dle dostupné literatury dosud v kůře *Geissospermum vellosii* zaznamenán pouze quebrachamin. Další obsažené látky nemusí zplyňovat, a proto se předpokládá přítomnost i jiných zajímavých látek ze skupiny indolových a β -karbolinových alkaloidů.

Na základě těchto výsledků lze kůru *Geissospermum vellosii* doporučit k detailnějšímu výzkumu, který naváže na tuto práci. Pozoruhodná je obzvláště inhibiční aktivita BuChE ve srovnání se standardy a cytotoxicita k liniím HT-29 (kolorektální adenokarcinom), PANC-1 (epiteliální karcinom pankreatu), MCF-7 (adenokarcinom prsu) a SAOS-2 (osteosarkom).

V oblasti inhibiční aktivity vůči AChE by bylo dále zajímavé podrobněji prostudovat účinky geissoschizin methyl etheru, který byl izolován z rostlin rodu *Uncaria*. Jedná se o

alkaloid blízký alkaloidu geissoschizinu z kůry *Geissospermum vellosii* a některé studie uvádějí jeho výraznou schopnost inhibovat AChE.

Literatura analyzující *Calotropis gigantea* rovněž uvádí obsah alkaloidů, a to v nadzemních částech rostliny. Nicméně jejich kvantitativní zastoupení je menší oproti dominantním skupinám látek jako jsou glykosidy – kardenolidy a flavonoidy. Dosud byly izolovány a identifikovány pouze dva alkaloidy. Tato práce obsah alkaloidů v nati *Calotropis gigantea* potvrzuje, přičemž pozitivita kontrolní TLC byla viditelně méně výrazná než u *Geissospermum vellosii*, jak lze na základě rešerše předpokládat. V oblasti biologických účinků uvádějí vědecké práce hlavně působení antimikrobiální, antiparazitické a cytotoxické. Anticholinesterásovou aktivitu jsme tedy neočekávali a neobjevila se. Nezaznamenali jsme však ani cytotoxické účinky, což může být způsobeno tím, že jejich nosiči v *Calotropis gigantea* nejsou alkaloidy, ale jiné sekundární metabolity, nejspíše flavonoidy.

V případě *Cissampelos pareira* jsme zaznamenali diskrepanci mezi výsledky literární rešerše a našimi laboratorními výsledky. Vědecké články uvádějí alkaloidy jako hlavní sekundární metabolity *Cissampelos pareira*, mnoho jich bylo izolováno a identifikováno a u některých z nich byly již také prokázány specifické biologické aktivity. Bylo pro nás proto překvapivé, že v naší kontrolní TLC alkaloidy zachyceny nebyly a zamýšleli jsme se nad možnými důvody. Kromě všeobecných vlivů na obsah alkaloidů v rostlině jako jsou oblast sběru, stádium vývoje rostliny nebo doba sběru (např. u *Cissampelos pareira* je vyšší obsah alkaloidů během období dešťů⁸², které sběr poněkud komplikují) jsme identifikovali následující problém. Naše droga byla vedena jako nadzemní část, měla by tedy obsahovat i listy, ve kterých jsme očekávali největší obsah alkaloidů. Droga nicméně téměř žádné listové části neobsahovala, jednalo se spíše jen o stonky, které naopak alkaloidy obsahují v mnohem menší míře. Během podrobné rešerše se také ukázalo, že velmi zajímavý v oblasti anticholinesterasové aktivity a cytotoxicity by mohl být i kořen této rostliny, zatímco stonky a listy mohou mít největší potenciál v antimikrobiálním a antioxidačním účinku. Vzhledem k vědeckému zaměření naší linie prací bych doporučila k dalšímu prozkoumání spíše kořen *Cissampelos pareira*.

Rod *Virola* vzbudil zájem vědců v 60. letech minulého století díky halucinogenním účinkům využívaných amazonskými indiány a záhy v druzích *Virola* byly identifikovány zejména indolové alkaloidy - deriváty triptaminu. Takovým druhem je např. *Virola sebifera*. Naopak u *Virola surinamensis* dosud alkaloidy identifikovány nebyly. Protože má však také

bohatou historií používání v tradičním léčitelství, chtěli jsme tuto skutečnost ověřit. Naše výsledky potvrzují výsledky ostatních vědeckých prací – u *Virola sebifera* jsme zaznamenali přítomnost alkaloidů v extraktu z kůry, u *Virola surinamensis* nikoliv. Vzhledem k tomu, že jsme u *Virola sebifera* neprokázali anticholinesterásovou ani cytotoxickou aktivitu, prozatím nedošlo k jejímu podrobnějšímu screeningu.

VII. LITERATURA

1. Klouček P., Landa P., Vaněk T.: Rostliny *in vitro* — továrny na léčiva? *Živa* 6, 241 (2005).
2. Spilková J., Martin J., Siatka T., Tůmová L., Kašparová M.: *Farmakognosie*. Karolinum, Praha 2016.
3. Lima J. A., Costa R. S., Epifanio R. A., Castro N. G., Rocha M. S., Pinto A. C.: *Geissospermum vellosii* stem bark: anticholinesterase activity and improvement of scopolamine-induced memory deficits. *Pharmacol., Biochem. Behav.* 92, 508 (2009).
4. Lullmann H., Mohr K., Wehling M.: *Farmakologie a Toxikologie*. Grada, Praha 2004.
5. Bemis D. L., Capodice J. L., Desai M., Katz A. E., Buttyan R.: B-Carboline Alkaloid-Enriched Extract from the Amazonian Rain Forest Tree Pao Pereira Suppresses Prostate Cancer Cells. *J. Soc. Integr. Oncol.* 7(2), 59 (2009).
6. Yu J., Chen Q.: The plant extract of Pao pereira potentiates carboplatin effects against ovarian cancer. *Pharm. Biol.* 52(1), 36 (2014).
7. Jiráček R.: Farmakoterapie Alzheimerovy choroby. *Klinická farmakologie a farmacie* 18, 212 (2004).
8. Araújo J. Q., Lima J. A., Pinto A. C., De Alencastro R. B., Albuquerque M. G.: Docking of the alkaloid geissospermine into acetylcholinesterase: A natural scaffold targeting the treatment of Alzheimer's disease. *J. Mol. Model.* 17(6), 1401 (2011).
9. Silbernagl S., Lang F.: *Atlas patofyziologie*. Grada, Praha 2012.
10. Sigalapalli D. K., Rangaswamy R., Tangellamudi N. D.: Novel huperzine A based NMDA antagonists: insights from molecular docking, ADME/T and molecular dynamics simulation studies. *R. Soc. Chem. Adv.* 10, 25446 (2020).
11. Seo D., Boros B. D., Holtzman D. M.: The microbiome: A target for Alzheimer disease? *Cell Res.* 29, 779 (2019).
12. Martin J., Kršková Z., Dušek J.: Huperzin a jiné přírodní látky v léčbě Alzheimerovy nemoci. *Praktické lékařství* 7(1), 39 (2011).
13. Tolar M., Abushakra S., Hey J. A., Porsteinsson A., Sabbagh M.: Aducanumab, gantenerumab, BAN2401, and ALZ-801—the first wave of amyloid targeting drugs for Alzheimer's disease with potential for near term approval. *Alzheimer's Res. Ther.* 12, 95 (2020).

14. Tanzi R. E.: FDA Approval of Aduhelm Paves a New Path for Alzheimer's Disease. *ACS Chem. Neurosci.* *12(15)*, 2714 (2021).
15. Bureš J., Horáček J.: *Základy vnitřního lékařství*. Galén, Praha 2003.
16. Cragg G. M., Newman D. J.: Plants as a source of anti-cancer agents. *J. Ethnopharmacol.* *100 (1–2)*, 72 (2005).
17. Sari S., Tomek P., Leung E., Reynisson J.: Discovery and Characterisation of Dual Inhibitors of Tryptophan 2,3-Dioxygenase (TDO2) and Indoleamine 2,3-Dioxygenase 1 (IDO1) Using Virtual Screening. *Molecules* *24(23)*, 4346 (2019).
18. Chen H., Yang J., Hao J., Lv Y., Chen L., Lin Q., Yuan J., Yang X.: A Novel Flavonoid Kushenol Z from *Sophora flavescens* Mediates mTOR Pathway by Inhibiting Phosphodiesterase and Akt Activity to Induce Apoptosis in Non-Small-Cell Lung Cancer Cells. *Molecules* *24(24)*, 4425 (2019).
19. Prieto-Vila M., Shimomura I., Kogure A., Usuba W., Takahashi R., Ochiya T., Yamamoto Y.: Quercetin Inhibits Lef1 and Resensitizes Docetaxel-Resistant Breast Cancer Cells. *Molecules* *25(11)*, 2576 (2020).
20. Ediriweera M. K., Moon J. Y., Nguyen Y. T., Cho S. K.: 10-Gingerol Targets Lipid Rafts Associated PI3K/Akt Signaling in Radio-Resistant Triple Negative Breast Cancer Cells. *Molecules* *25(14)*, 3164 (2020).
21. Youness R. A., Kamel R., Elkasabgy N. A., Shao P., Farag M. A.: Recent Advances in Tannic Acid (Gallotannin) Anticancer Activities and Drug Delivery Systems for Efficacy Improvement; A Comprehensive Review. *Molecules* *26(5)*, 1486 (2021).
22. Christensen L. P.: Bioactive C17 and C18 Acetylenic Oxylipins from Terrestrial Plants as Potential Lead Compounds for Anticancer Drug Development. *Molecules* *25(11)*, 2568 (2020).
23. Chen X., Winstead A., Yu H., Peng J.: Taccalonolides: A Novel Class of Microtubule-Stabilizing Anticancer Agents. *Cancers* *13(4)*, 920 (2021).
24. Camargo M. R. M., Amorim R. C. N., Silva L. F. R., Carneiro A. L. B., Vital M. J. S., Pohlit A. M.: Chemical composition, ethnopharmacology and biological activity of *Geissospermum Allemão* species (Apocynaceae Juss.). *Rev. Fitos* *8(2)*, 73 (2013).
25. Fox Ramos A. E., Alcover C., Evanno L., Maciuk A., Litaudon M., Duplais C., Bernadat G., Gallard J. F., Jullian J. C., Mouray E., Grellier P., Loiseau P. M., Pomel S., Poupon E., Champy

- P., Beniddir M. A.: Revisiting Previously Investigated Plants: A Molecular Networking-Based Study of *Geissospermum laeve*. *J. Nat. Prod.* *80*, 1007 (2017).
26. Miers J.: *On the Apocynaceae of South America: with some preliminary remarks on the whole family...* . Ed. Williams and Norgate, London 1878.
27. Allemão F. F.: *Plantas Novas do Brasil*. Rio de Janeiro 1846.
28. Obr. 3: Martius C., Eichler A.G., Urban I.: *Flora Brasiliensis* *6(1)*, 28 (1860).
29. Obr. 4: <https://ceticismo.wordpress.com/2007/09/06/pereirina-o-primeiro-alcaloide-extraido-no-brasil/>, staženo 19.8.2018.
30. Rapoport H., Windgassen R. J., Hughes N. A., Onak T. P.: Alkaloids of *Geissospermum vellosii*. Further Studies on Geissospermine and the Structures of the Indolic Cleavage Products, Geissoschizine and Apogeissoschizine. *J. Am. Chem. Soc.* *82(16)*, 4404 (1960).
31. Rapoport H., Moore R. E.: Alkaloids of *Geissospermum vellosii*. Isolation and Structure Determinations of Velloimine, Velloiminol, and Geissosimine. *J. Org. Chem.* *27(9)*, 2981 (1962).
32. Moore R. E., Rapoport H.: Geissovelline, a new alkaloid from *Geissospermum vellosii*. *J. Org. Chem.* *38(2)*, 215 (1973).
33. Bertho A., Koll M.: Alkaloide der Pereiro-Rinde, VI. Die Konstitution von Pereirin. *Chem. Berichte* *94(10)*, 2737 (1961).
34. Ishiyama H., Matsumoto M., Sekiguchi M.: Two New Indole Alkaloids from *Aspidosperma subincanum* and *Geissospermum vellosii*. *Heterocycles* *66*, 651 (2005).
35. Almeida M. R., Lima J. A., Santos N. P., Pinto A. C.: Pereirina: o primeiro alcalóide isolado no Brasil? *Brazil. J. Pharmacogn.* *19(4)*, 942 (2009).
36. Werner J. A. T., Oliveira S. M., Martins D. F., Ferreira J., Santos A. R. S.: Evidence for a role of 5-HT_{1A} receptor on antinociceptive action from *Geissospermum vellosii*. *J. Ethnopharmacol.* *125*, 163 (2009).
37. Tanae M. M., Souccar C., Lapa A. J., Lima-Landman M. T. R.: Molecular interaction of *Geissospermum's* alkaloids with $\alpha 7$ or muscle-type nicotinic receptors (nAChR) subtypes and with acetylcholinesterase (AChE). *Acta Pharmacol. Sin.* *27*, 347 (2006).
38. Beljanski M., Beljanski M. S.: Selective Inhibition of *in vitro* Synthesis of Cancer DNA by Alkaloids of β -Carboline Class. *Expl. Cell. Biol.* *50*, 79 (1982).
39. Beljanski M., Crochet S., Beljanski M. S.: PB-100: a potent and selective inhibitor of human BCNU resistant glioblastoma cell multiplication. *Anticancer Res.* *13(6A)*, 2301 (1993).

40. Chang C., Zhao W., Xie B., Deng Y., Han T., Cui Y., Dai Y., Zhang Z., Gao J., Guo H., Yan J.: Pao Pereira Extract Suppresses Castration Resistant Prostate Cancer Cell Growth, Survival, and Invasion Through Inhibition of NF κ B Signaling. *Integr. Cancer Ther.* 13(3), 249 (2014).
41. Yu J., Drisko J., Chen Q.: Inhibition of pancreatic cancer and potentiation of gemcitabine effects by the extract of Pao Pereira. *Oncol. Rep.* 30, 149 (2013).
42. Steele J. C. P., Veitch N. C., Kite G. C., Simmonds M. S. J., Warhurst D. C.: Indole and β -Carboline Alkaloids from *Geissospermum sericeum*. *J. Nat. Prod.* 65(1), 85 (2002).
43. Mbeunkui F., Grace M. H., Lategan C., Smith P. J., Raskin I., Lila M. A.: *In vitro* antiplasmodial activity of indole alkaloids from the stem bark of *Geissospermum vellosii*. *J. Ethnopharmacol.* 139, 471 (2012).
44. Lima J. A., Costa T. W. R., Silva L. L., Miranda A. L. P., Pinto A. C.: Antinociceptive and anti-inflammatory effects of a *Geissospermum vellosii* stem bark fraction. *Ann. Brazil. Acad. Sci.* 88(1), 237 (2016).
45. Glick S. D., Kuehne M. E., Raucci J., Wilson T. E., Larson D., Keller R. W., Carlson J. N.: Effects of iboga alkaloids on morphine and cocaine self-administration in rats: relationship to tremorigenic effects and to effects on dopamine release in nucleus accumbens and striatum. *Brain Res.* 657(1–2), 14 (1994).
46. Deutsch H. F., Evenson M. A., Drescher P., Sparwasser C., Madsen P. O.: Isolation and biological activity of aspidospermine and quebrachamine from an *Aspidosperma* tree source. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 12(10), 1283 (1994).
47. Roquebert J., Demichel P.: Inhibition of the α_1 - and α_2 -adrenoceptor-mediated pressor response in pithed rats by raubasine, tetrahydroalstonine and akuammigine. *Eur. J. Pharmacol.* 106(1), 203 (1984).
48. Pereira D. M., Ferreres F., Oliveira J. M. A., Gaspar L., Faria J., Valentão P., Sottomayor M., Andrade P. B.: Pharmacological effects of *Catharanthus roseus* root alkaloids in acetylcholinesterase inhibition and cholinergic neurotransmission. *Phytomedicine* 17(8–9), 646 (2010).
49. Beljanski M., Beljanski M. S.: Three Alkaloids as Selective Destroyers of Cancer Cells in Mice. *Oncology* 43, 198 (1986).
50. Dassonneville L., Bonjean K., Pauw-Gillet M. C., Colson P., Houssier C., Quetin-Leclercq J., Angenot L., Bailly C.: Stimulation of Topoisomerase II-Mediated DNA Cleavage by Three

DNA-Intercalating Plant Alkaloids: Cryptolepine, Matadine, and Serpentine.

Biochemistry 38(24), 7719 (1999).

51. Yang Z., Duan D., Du J., Yang M., Li S., Yao X.: Geissoschizine methyl ether, a corynanthean-type indole alkaloid from *Uncaria rhynchophylla* as a potential acetylcholinesterase inhibitor. Nat. Prod. Res. 26(1), 22 (2012).

52. Shimada Y., Goto H., Itoh T., Sakakibara I., Kubo M., Sasaki H., Terasawa K.: Evaluation of the Protective Effects of Alkaloids Isolated from the Hooks and Stems of *Uncaria sinensis* on Glutamate-induced Neuronal Death in Cultured Cerebellar Granule Cells from Rats. J. Pharm. Pharmacol. 51(6), 715 (1999).

53. Morita S., Tatsumi K., Makinodan M., Okuda H., Kishimoto T., Wanaka A.: Geissoschizine Methyl Ether, an Alkaloid from the *Uncaria* Hook, Improves Remyelination After Cuprizone-Induced Demyelination in Medial Prefrontal Cortex of Adult Mice. Neurochem. Res. 39(1), 59 (2014).

54. Sakakibara I., Terabayashi S., Kubo M., Higuchi M., Komatsu Y., Okada M., Taki K., Kamei J.: Effect on locomotion of indole alkaloids from the hooks of *Uncaria* plants. Phytomedicine 6(3), 163 (1999).

55. Yuzurihara M., Kazuhiro Y., Sakakibara G., Hayakawa T., Sasaki H.: Geissoschizine methyl ether, an indole alkaloid extracted from *Uncariae* Ramulus et Uncus, is a potent vasorelaxant of isolated rat aorta. Eur. J. Pharmacol. 444(3), 183 (2002).

56. Reddy T. J., Birman V. B., Rawal V. H.: Catalytic Asymmetric Total Synthesis of (+) Geissoschizine. Abstracts of Papers, 226th ACS National Meeting, New York, Sept 7-11 (2003).

57. Mbeunkui F., Grace M. H., Lila M. A.: Isolation and structural elucidation of indole alkaloids from *Geissospermum vellosii* by mass spectrometry. J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci. 885-886, 83 (2012).

58. Kanchan T., Atreya A.: *Calotropis gigantea*. Wilderness Environ. Med. 27, 350 (2016).

59. Singh N., Gupta P., Patel A. V., Pathak A. K.: *Calotropis gigantea*: a review on its Phytochemical & Pharmacological profile. Int. J. Pharmacogn. 1(1), 1 (2014).

60. Dhivya R., Manimegalai K.: Preliminary Phytochemical Screening and GC- MS Profiling of Ethanolic Flower Extract of *Calotropis gigantea* Linn. (Apocynaceae). J. Pharmacogn. Phytochem. 2(3), 28 (2013).

61. <http://botany.cz/cs/calotropis-gigantea/>, staženo 27.12.2019.

62. http://www.eastafricanplants.senckenberg.de/root/index.php?page_id=47&id=3160#image=77148, staženo 27.12.2019.
63. <https://picclick.com/50-Seeds-White-Calotropis-Gigantea-Crown-Flower-Giant-252048316318.html#&gid=1&pid=5>, staženo 27.12.2019.
64. Chan E. W. C., Wong S. K., Chan H. T.: Apocynaceae species with antiproliferative and/or antiplasmodial properties: a review of ten genera. *J. Integr. Med.* **14**(4), 269 (2016).
65. Kaur K., Kumar D., Kumar S.: Screening of Neuropharmacological Activities of *Calotropis gigantea* roots. *J. Pharm. Chem. Biol. Sci.* **2**(3), 186 (2014).
66. Ravi R. G., Harikesh D., Chandrasekhar T. R., Pramod Y. G., Angad P. M.: Cytotoxic activity of Ethanolic root extract of *Calotropis gigantea* Linn. *Int. J. Drug Dev. & Res.* **3**(4), 101 (2011).
67. Habib M. R., Karim M. R.: Evaluation of antitumour activity of *Calotropis gigantea* L. root bark against Ehrlich ascites carcinoma in Swiss albino mice. *Asian Pac. J. Trop. Med.* **4**(10), 786 (2011).
68. Ashrafudoulla M., Luna N. A., Jyothy F. H., Khatun T., Rafa T. F., Parvin S., Islam S. M.: Phytochemical and Pharmacological investigation of *Calotropis gigantea*. *J. Med. Plants Stud.* **4**(4), 245 (2016).
69. Satish P. V. V., Kumari Santha D., Sunita K.: Antiplasmodial efficacy of *Calotropis gigantea* (L.) against *Plasmodium falciparum* (3D7 strain) and *Plasmodium berghei* (ANKA). *J. Vector. Borne. Dis.* **54**, 215 (2017).
70. Seniya C., Trivedia S. S., Verma S. K.: Antibacterial efficacy and Phytochemical analysis of organic solvent extracts of *Calotropis gigantea*. *J. Chem. Pharm. Res.* **3**(6), 330 (2011).
71. Habib M. R., Karim M. R.: Antimicrobial and Cytotoxic Activity of Di-(2-ethylhexyl) Phthalate and Anhydrosophoradiol-3-acetate Isolated from *Calotropis gigantea* (Linn.) Flower. *Mycobiology* **37**(1), 31 (2009).
72. Habib M. R., Karim M. R.: Antitumour evaluation of di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) isolated from *Calotropis gigantea* L. flower. *Acta Pharm.* **62**, 607 (2012).
73. Adak M., Gupta J. K.: Evaluation of anti-inflammatory activity of *Calotropis gigantea* (AKANDA) in various biological systems. *Nepal Med. Coll. J.* **8**(3), 156 (2006).
74. Jain S. K., Ahirwar S. K., Kumar A.: Review of *Cissampelos pareira* Linn. *Int. J. App. Res.* **1**(6), 8 (2015).

75. Singh S., Nishteswar K.: Review on *Cissampelos Pareira* & *Cyclea Peltata* (Patha Dwaya) Phyto-Pharmacological Perspectives. *Int. J. Ayurvedic Med.* 4(4), 282 (2013).
76. Singh A., Duggal S., Singh J., Katekhaye S.: An inside preview of Ethnopharmacology of *Cissampelos pareira* Linn. *Int. J. Biol. Technol.* 1(1), 114 (2010).
77. <http://www.rain-tree.com/Plant-Images/abuta-pic.htm>, staženo 28.12.2019.
78. http://www.efloras.org/object_page.aspx?object_id=115769&flora_id=5, staženo 28.12.2019.
79. Devkota H. P., Miyazaki S., Yahara S.: Amentoflavone and Kaempferol Glycosides from the Aerial Parts of *Cissampelos pareira*. *Nepal J. Biotechnol.* 5(1), 1-4 (2017).
80. Piero N. M., Eliud N. N. M., Susan K. N., George O. O., David N. J. M. M.: *In Vivo* Antidiabetic Activity and Safety In Rats of *Cissampelos pareira* Traditionally Used In The Management of Diabetes Mellitus In Embu County, Kenya. *J. Drug Metab. Toxicol.* 6(3), 184 (2015).
81. Kupchan S. M., Patel A. C., Fujita E.: Tumor Inhibitors VI. Cissampareine, New Cytotoxic Alkaloid from *Cissampelos pareira*. Cytotoxicity of Bisbenzylisoquinoline Alkaloids. *J. Pharm. Sci.* 54(4), 580 (1965).
82. Bala M., Kumar S., Pratap K., Kumar Verma P., Padwad Y., Singh B.: Bioactive isoquinoline alkaloids from *Cissampelos pareira*. *Nat. Prod. Res.* 33(5), 622 (2019).
83. Pradhan S. N., Pandey K., Badola R. P.: A clinical trial of hayatine methiodide as arelaxant in 100 cases. *Brit. J. Anesthesiol.* 36, 604 (1964).
84. Rukachaisirikul T., Kumjun S., Suebsakwong P., Apiratikul N., Suksamrarn A.: A new pyrrole alkaloid from the roots of *Cissampelos pareira*. *Nat. Prod. Res.* 35(1), 80 (2021).
85. Morita H., Matsumoto K., Takeya K., Itokawa H., Iitaka Y.: A novel antileukemic tropoloisoquinoline alkaloid, pareirubrine, from *Cissampelos pareira*. *Chem. Pharm. Bull.* 41, 1418 (1993).
86. Uthpala T., Raveesha H. R.: Studies on Antioxidant and Antibacterial Activity of *Cissampelos pareira* (L.). *Int. J. Advanced Scient. Res. Manage.* 4(4), 35 (2019).
87. Jannu V., Vishal D. S., Babu V. R., Harisha B., Reddy D.: Antidiabetic activity of hydro-alcoholic extract of *Cissampelos pareira* Linn. leaves in streptozotocin induced diabetic rats. *Int. J. Pharm. Technol.* 3(4), 3601 (2011).
88. Thakur, P., Rana, A. C.: Effect of *Cissampelos pareira* leaves on anxiety-like Behavior in experimental animals. *J. Tradit. Complementary Med.* 3, 188 (2013).

89. Ajaib M., Shafi F., Mirza S. A., Hassan A., Iqbal M. A.: Evaluation of the antimicrobial and antioxidant properties of *Cissampelos pareira* L. Pak. J. Sci. 70(3), 239 (2018).
90. Sood R., Raut R., Tyagi P., Pareek P. K., Barman T. K., Singhal S., Shirumalla R. K., Kanoje V., Subbarayan R., Rajerethinam R., Sharma N., Kanaujia A., Shukla G., Gupta Y. K., Katiyar C. K., Bhatnagar P. K., Upadhyay D. J., Swaminathan S., Khanna N.: *Cissampelos pareira* Linn: Natural Source of Potent Antiviral Activity against All Four Dengue Virus Serotypes. PLoS Negl. Trop. Dis. 9(12), 1 (2015).
91. Shrestha L., Gupta S. P.: Phytochemical analysis and antibacterial activity of *Cissampelos pareira* Lin. rhizome extract against some bacterial strain. World J. Pharm. Pharm. Sci. 8(4), 1330 (2019).
92. Njeru S. N., Obonyo M. A., Nyambati S. O., Ngari S. M.: Bioactivity of *Cissampelos pareira* medicinal plant against *Mycobacterium tuberculosis*. J. Pharmacogn. Phytochem. 3(6), 167 (2015).
93. Porto N. M., Barros Y. L., Diniz-Basílio I. J. L., Agra M. F.: Microscopic and UV/Vis spectrophotometric characterization of *Cissampelos pareira* of Brazil and Africa. Rev. Bras. Farmacogn. 26, 135 (2016).
94. Denny C., Zacharias M. E., Kohn L. K., Foglio M. A., Carvalho J. E.: Atividade antiproliferativa dos extratos e da fração orgânica obtidos das folhas de *Virola sebifera* Aubl. (Myristicaceae). Brazil. J. Pharmacogn. 17(4), 598 (2007).
95. Funasaki M., Barroso S. H., Fernandes A. V. L., Menezes S. I.: Amazon rainforest cosmetics: chemical approach for quality control. Quim. Nova 39(2), 194 (2016).
96. Aguilar S. D., Aguilar R., Lagomarsino L. P.: A taxonomic synopsis of *Virola* (Myristicaceae) in Mesoamerica, including six new species. PhytoKeys 134, 1 (2019).
97. Macbride J. F.: *Flora of Peru, part II*. Publications of Field Museum of Natural History: Botany 13(3), Chicago 1936.
98. Holmstedt B., Lindgren J. E., Plowman T., Rivier L., Schultes R. E., Tovar O.: Indole alkaloids in Amazonian Myristicaceae: field and laboratory research. Botanical Museum leaflets - Harvard University 28(3), 215 (1980).
99. Mckenna D. J., Towers G. H. N., Abbott F. S.: Monoamine oxidase inhibitors in South American hallucinogenic plants part 2: Constituents of orally-active Myristicaceous hallucinogens. J. Ethnopharmacol. 12(2), 179 (1984).

100. <http://tropical.theferns.info/plantimages/2/b/2be03ab6c988e38bac2c128e7e862bd48e4caf7b.jpg>, staženo 26.1.2021.
101. <http://tropical.theferns.info/plantimages/4/c/4cc5b29425f2f09033bf589912b18569cc7986bb.jpg>, staženo 26.1.2021.
102. <http://tropical.theferns.info/plantimages/8/8/882053825dbf3c8744fcd2de35052945d06125f0.jpg>, staženo 26.1.2021.
103. Kawanishi K., Uhara Y., Hashimoto Y.: Alkaloids from the hallucinogenic plant *Virola sebifera*. *Phytochemistry* 24(6), 1373 (1985).
104. Corothie E., Nakano T.: Constituents of the bark of *Virola sebifera*. *Planta Med.* 17(2), 184 (1969).
105. Lopes N. P., Yoshida M., Kato M. J.: Biosynthesis of tetrahydrofuran lignans in *Virola surinamensis*. *Brazil. J. Pharm. Sci.* 40(1), 53 (2004).
106. <https://www.iucnredlist.org/species/33959/9816820>, staženo 26.1.2021.
107. https://inpn.mnhn.fr/espece/cd_nom/630882?lg=en, staženo 26.1.2021.
108. Lopes N. P., Silva D. H. S., Kato M. J., Yoshida M.: Butanolides as a common feature of *Iryanthera lancifolia* and *Virola surinamensis*. *Phytochemistry* 49(5), 1405 (1998).
109. González-Rodríguez M., Ruiz-Fernández C., Francisco V., Eldjoudi D. A., AbdElHafez Y. R. F., Cordero-Barreal A., Pino J., Lago F., Campos-Toimil M., Carvalho G. R., Costa Pereira T. M., Gualillo O.: Pharmacological Extracts and Molecules from *Virola* Species: Traditional Uses, Phytochemistry, and Biological Activity. *Molecules* 26(4), 792 (2021).
110. Carvalho A. A. V., Galdino P. M., Nascimento M. V. M., Kato M. J., Valadares M. C., Cunha L. C., Costa E. A.: Antinociceptive and antiinflammatory activities of grandisin extracted from *Virola surinamensis*. *Phytother. Res.* 24(1), 113 (2010).
111. Beloz A.: Brine shrimp bioassay screening of two medicinal plants used by the Warao: *Solanum straminifolium* and *Virola surinamensis*. *J. Ethnopharmacol.* 37, 225 (1992).
112. Costa E. S., Hiruma-Lima C. A., Lima E. O., Sucupira G. C., Bertolin A. O., Lolis S. F., Andrade F. D. P., Vilegas W., Souza-Brito A. R. M.: Antimicrobial activity of some medicinal plants of the Cerrado, Brazil. *Phytother. Res.* 22, 705 (2008).
113. Hiruma-Lima C. A., Batista L. M., Almeida A. A. B., Magrib L. P., Santos L. C., Vilegas W., Souza Brito A. R. M.: Antiulcerogenic action of ethanolic extract of the resin from *Virola surinamensis* Warb. (Myristicaceae). *J. Ethnopharmacol.* 122, 406 (2009).

114. Barata L. E. S., Baker P. M., Gottlieb O. R., Rúveda E. A.: Neolignans of *Virola surinamensis*. *Phytochemistry* 17, 783 (1978).
115. Barata L. E. S., Santos L. S., Ferri P. H., Phillipson J. D., Simon A. P., Crofte L.: Anti-leishmanial activity of neolignans from *Virola* species and synthetic analogues. *Phytochemistry* 55(6), 589 (2000).
116. Veiga A., Albuquerque K., Corrêa M. E., Brigido H., Silva J., Campos M., Silveira F., Santos L., Dolabela M.: Leishmania *amazonensis* and *Leishmania chagasi*: *In vitro* leishmanicide activity of *Virola surinamensis* (rol.) warb. *Exp. Parasitol.* 175, 68 (2017).
117. Lopes N. P., Kato M. J., Andrade E. H. A., Maia J. G. S., Yoshida M., Planchart A. R., Katzin A. M.: Antimalarial use of volatile oil from leaves of *Virola surinamensis* (Rol.)Warb. By Waiapi Amazon Indians. *Planta Med.* 64, 667 (1998).
118. Lopes N. P., Chicaro P., Kato M. J., Albuquerque S., Yoshida M.: Flavonoids and Lignans from *Virola surinamensis* Twigs and their *in vitro* Activity against *Trypanosoma cruzi*. *Planta Med.* 64(7), 667 (1998).
119. Habenschus M., Moreira F. D. L., Lopes N. P., De Oliveira A. R. M.: *In Vitro* Inhibition of Human CYP450s 1A2, 2C9, 3A4/5, 2D6 and 2E1 by Grandisin. *Planta Med.* 83, 727 (2017).
120. Lopes N. P., Kato M. J., Yoshida M.: Antifungal constituents from roots of *Virola surinamensis*. *Phytochemistry* 51(1), 29 (1999).

VIII. ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra: farmakognozie a farmaceutické botaniky

Kandidát: MUDr. et Mgr. Lucie Richter

Konzultant: PharmDr. Marcela Šafratová, Ph.D.

Název rigorózní práce: SCREENINGOVÁ STUDIE RŮZNÝCH ROSTLINNÝCH TAXONŮ A JEJICH VLIV NA LIDSKÉ ENZYMATICKÉ SYSTÉMY II.

Byl proveden screening pěti tropických rostlin (kůry *Geissospermum vellosii*, nati *Calotropis gigantea*, stonku *Cissampelos pareira*, kůry *Virola sebifera* a kůry *Virola surinamensis*) za účelem zjištění přítomnosti alkaloidů a předběžného odhadu jejich potenciálu využití jako léčiv s anticholinesterasovou nebo cytotoxickou aktivitou.

Z rostlin byly získány EtOH sumární extrakty a z nich připraveny EtOAc alkaloidní extrakty, které byly podrobeny GC/MS analýze. U extraktů s TLC potvrzenou (detekce UV, Dragendorffovo činidlo) přítomností alkaloidů (*Geissospermum vellosii*, *Calotropis gigantea* a *Virola sebifera*) byla dále stanovena jejich inhibiční aktivita vůči lidské AChE a BuChE pomocí Ellmanovy metody a porovnána se standardy (galantamin, huperzin A a rivastigmin). Také byla otestována protinádorová aktivita těchto extraktů na nádorových liniích Jurkat, MOLT-4, A549, HT-29, PANC-1, A2780, HeLa, MCF-7, SAOS-2 a kontrolní nenádorové linii MRC-5 s využitím metody MTT a výsledky porovnány s referenčními hodnotami doxorubicinu.

EtOAc extrakt kůry *Geissospermum vellosii* dosáhl hodnot inhibiční aktivity s IC_{50} pro AChE $15,19 \pm 0,96 \mu\text{g/ml}$ a pro BuChE $0,37 \pm 0,049 \mu\text{g/ml}$ a zároveň i hodnot cytotoxicity významně lepších než referenční doxorubicin u linií Jurkat, HT-29, PANC-1, MCF-7, SAOS-2, totéž ovšem platí i pro nenádorovou linii MRC-5. GC/MS analýza ukázala přítomnost alespoň 13 látek, které bylo možné pomocí této metody zaznamenat. Na základě těchto výsledků lze kůru *Geissospermum vellosii* doporučit k detailnějšímu výzkumu.

Klíčová slova: alkaloidy, Alzheimerova choroba, *Geissospermum vellosii*, *Calotropis gigantea*, *Cissampelos pareira*, *Virola sebifera*, *Virola surinamensis*, cytotoxická aktivita, cholinesterasa.

IX. ABSTRACT

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of: Pharmacognosy and Pharmaceutical Botany

Candidate: MUDr. et Mgr. Lucie Richter

Consultant: PharmDr. Marcela Šafratová, Ph.D.

Title of Thesis: SCREENING STUDY OF SEVERAL PLANT SPECIES AND THEIR EFFECT ON HUMAN ENZYMATIC SYSTEMS II.

Five tropical plants (*Geissospermum vellosii* stembark, *Calotropis gigantea* aerial part, *Cissampelos pareira* stem, *Viola sebifera* stembark and *Viola surinamensis* stembark) were screened for alkaloid presence and a preliminary estimate of their potential as anticholinesterase or cytotoxic agent was performed.

Ethanollic extracts were prepared from these plants and further processed into the ethyl acetate alkaloid extracts, which were then analysed using the GC/MS method. For extracts with the confirmed presence of alkaloids (*Geissospermum vellosii*, *Calotropis gigantea* and *Viola sebifera*) by TLC including UV detection and Dragendorff test, the anticholinesterase activity against human AChE and BuChE was measured employing Ellman method and compared to standards (galantamine, huperzine A and rivastigmine). Cytotoxic activity of these extracts was also evaluated on Jurkat, MOLT-4, A549, HT-29, PANC-1, A2780, HeLa, MCF-7, SAOS-2 tumour cell lines and MRC-5 control cell line using MTT method and results were compared to doxorubicine reference values.

Ethyl acetate extract from *Geissospermum vellosii* stembark inhibited human AChE and BuChE with mean IC_{50} values of $15,19 \pm 0,96 \mu\text{g/ml}$ and $0,37 \pm 0,049 \mu\text{g/ml}$, respectively. Further, significantly higher cytotoxic activity was present against Jurkat, HT-29, PANC-1, MCF-7, SAOS-2 tumour cell lines compared to doxorubicine - unfortunately the same applied also to MRC-5 control cell line. GC/MS analysis showed the presence of at least 13 substances, which could have been noticed via this method. Based on these results, we recommend *Geissospermum vellosii* stembark to be further investigated in more detail.

Keywords: alkaloids, Alzheimer's disease, *Geissospermum vellosii*, *Calotropis gigantea*, *Cissampelos pareira*, *Viola sebifera*, *Viola surinamensis*, cytotoxic activity, cholinesterase.