

UNIVERZITA KARLOVA

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA FARMAKOGNOZIE



## DIPLOMOVÁ PRÁCE

**Izolace alkaloidů druhu *Geissospermum vellosii* Allemão a studium jejich biologické aktivity II.**

**Isolation of alkaloids of the species *Geissospermum vellosii* Allemão and study of their biological activity II.**

Autor práce: Kateřina Václavíková

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

HRADEC KRÁLOVÉ, KVĚTEN 2020

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. V seznamu použité literatury jsou všechny zdroje a literatura, ze které jsem během psaní čerpala, a všechny zdroje jsou v práci řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného vysokoškolského titulu.

V Hradci Králové, 2020

.....

Podpis

## **Poděkování**

Na tomto místě bych chtěla poděkovat především vedoucí mé práce PharmDr. Marcele Šafratové, Ph.D. za veškerou pomoc, cenné rady a trpělivost. Dále bych chtěla poděkovat PhramDr. Jakubu Chlebkovi, Ph.D. za pomoc a vysvětlení flash chromatografie a také všem ostatním pracovníkům z Katedry farmakognozie, se kterými jsem se během vypracování potkávala, za případnou pomoc.

# Obsah

Seznam zkratk.....	6
Seznam obrázků .....	8
Seznam tabulek .....	8
1 Úvod .....	9
2 Cíl diplomové práce .....	10
3 Teoretická část .....	11
3.1 <i>Geissospermum vellosii</i> Allemão .....	11
3.1.1 Botanické aspekty <i>G. vellosii</i> Allemão .....	12
3.1.2 Obsahové látky <i>G. vellosii</i> Allemão.....	13
3.2 Onemocnění s potenciální možností využití alkaloidů izolovaných z kůry <i>G. vellosii</i> .....	18
3.2.1 Malárie.....	18
3.2.2 Rakovina .....	18
3.2.3 Benigní hyperplazie prostaty.....	21
3.2.4 Alzheimerova choroba.....	22
3.3 Biologická aktivita $\beta$ -karbolinových alkaloidů izolovaných z kůry <i>G. vellosii</i> .....	24
3.3.1 Léčba malárie.....	24
3.3.2 Léčba rakoviny.....	24
3.3.3 Léčba testosteronem navozené BHP.....	27
3.3.4 Léčba Alzheimerovy choroby .....	28
3.3.5 Léčba bolesti.....	28
4 Experimentální část .....	30
4.1 Materiál a vybavení .....	30
4.1.1 Rozpouštědla a chemikálie .....	30
4.1.2 Pomocné látky .....	30
4.1.3 Vytvářecí soustavy pro tenkovrstvou chromatografii.....	30
4.1.4 Chromatografické adsorbenty.....	30
4.1.5 Přístrojové vybavení .....	31
4.1.6 Detekční činidla .....	31
4.1.7 Rostlinný materiál.....	31
4.2 Obecné postupy .....	32
4.2.1 Příprava a uchování rozpouštědel .....	32
4.2.2 Odpařování extraktů a frakcí.....	32
4.2.3 Chromatografické metody.....	32
4.2.4 Strukturní analýza.....	33

4.2.5	Měření biologické aktivity .....	33
4.3	Izolace alkaloidů .....	36
4.3.1	Příprava alkaloidního extraktu .....	36
4.3.2	Extrakce do etheru .....	37
4.3.3	Sloupcová chromatografie .....	37
4.3.4	Separace alkaloidů GV-8.....	40
5	Výsledky.....	42
5.1	GV-8-4-A-B.....	42
5.1.1	Molekulová hmotnost .....	42
5.1.2	MS analýza.....	42
5.1.3	NMR analýza.....	42
5.1.4	Optická otáčivost .....	43
5.2	Biologická aktivita u izolovaných alkaloidů .....	43
6	Diskuze a závěr .....	44
7	Abstrakt .....	46
8	Abstract .....	47
9	Citovaná literatura.....	48

## Seznam zkratek

AChE – acetylcholinesterasa

AD – Alzheimerova choroba

APP – amyloidní prekurzorový protein

ApoE – apolipoprotein E

AR – androgenní receptor

BHP – benigní hyperplazie prostaty

BuChE – butyrylcholinesterasa

Cp – karboplatina

CRPC – rakovina prostaty odolná kastraci

CRC – rakovina tlustého střeva

DHT – dihydrotestosteron

EE – ethanolový extrakt

EtOH – ethanol

Fin – finasterid

Gem – gentacibin

GV – *Geissospermum vellosii*

iAChE – inhibitory acetylcholinesterasy

NMDA – N-methyl-D-aspartát

NS – nebylo stanoveno

PC - počítač

PCNA – proliferativní nukleární buněčný antigen

PCPA - p-chlorofenylalaninmethylester

PPAC – ethanolová frakce z kůry *G. vellosii*

PSA - prostatický specifický antigen

St - standard

TLC – tenkovrstvá chromatografie

TP – testosteron-propionát

## Seznam obrázků

<b>Obrázek 1</b> - <i>Geissospermum vellosii</i> Allemão .....	11
<b>Obrázek 2</b> – Biosyntéza indolových alkaloidů .....	17
<b>Obrázek 3</b> - TLC po sloupcové chromatografii, Dragendorffovo činidlo .....	39
<b>Obrázek 4</b> - TLC po flash chromatografii .....	40
<b>Obrázek 5</b> - Vellosimin .....	42

## Seznam tabulek

<b>Tabulka 1</b> – Taxonomické zařazení .....	12
<b>Tabulka 2</b> - Druhy rodu <i>Geissospermum</i> a jejich výskyt .....	12
<b>Tabulka 3</b> - Obsahové látky <i>G. vellosii</i> Alemão .....	16
<b>Tabulka 4</b> - Jednotlivé frakce po rozdělení vzorku při sloupcové chromatografii .....	38
<b>Tabulka 5</b> - Porovnání inhibiční aktivity vůči AChE a BuChE se standardy (St) Galantaminem a Huperzinem A.....	43



# 1 Úvod

Medicína se s každým dnem posouvá kupředu velkými kroky. Ledacos už v dnešní době umíme vyléčit, operovat a technologie jsou stále vyspělejší. I přesto stále existují nemoci, na něž léčbu nemáme nebo máme, ale ta je buď s neuspokojivými výsledky, nebo časem přestává fungovat. Vznikající rezistence, mutace genů způsobujících nemoci nebo mutace genů, které jsou pro určité způsoby léčby nezbytné, to jsou jen jedny z mála příčin, kvůli kterým stále potřebujeme pokračovat v hledání. Hledáme nové způsoby, nové technologie, ale i nové látky a to jak mezi syntetickými sloučeninami, tak z přírodních zdrojů. Struktury látek z přírodních zdrojů se pak často stávají předlohou pro vytvoření právě polosyntetických derivátů.

V práci se věnuji izolaci alkaloidů z rostliny *Geissospermum vellosii*, jejíž obsahové látky jsou v tomto směru velmi nadějně. Zatím se z rostliny podařilo celkem izolovat 20 alkaloidů a u některých byly prokázány léčebné účinky u několika různých nemocí. Kůra stromů byla užívána už domorodými obyvateli v Jižní Americe, následně se zde začala užívat i v rámci medicíny a nyní probíhá snaha o izolaci jejích alkaloidů, popsání nalezených struktur a možností jejich využití v současné medicíně. <sup>(1)</sup>

První z těchto nemocí je malárie, na níž byl extrakt z *G. vellosii* používán již domorodými kmeny. <sup>(2)</sup> Další úspěšnost byla prokázána při studiu několika různých druhů rakoviny. Jak víme, tato nemoc je velmi nebezpečná s ne příliš vysokou šancí na uzdravení a metody užívané pro její vyléčení jsou mnohdy k tělu poměrně drastické. Je proto důležité pokračovat v hledání léku. V práci podrobně rozebírám rakovinu vaječnicků, prostaty, tlustého střeva a slinivky, u kterých byl extrakt s nadějnými výsledky zkoušen. <sup>(3) (4) (5) (6)</sup>

Nemocí, u které stále nemáme žádnou léčbu vedoucí k vyléčení onemocnění, je Alzheimerova choroba. Léky užívané u této nemoci nám zatím umožňují snížení symptomů onemocnění, zpomalení progresu nemoci a zlepšení kvality života nemocného. Nalezení léku, který by nemoc vyléčil, je proto dlouhodobě nezodpovězenou otázkou. <sup>(7)</sup>

Účinnost extraktu z *G. vellosii* byla dále sledována i u dalších onemocnění a z tohoto důvodu byla rostlina vybrána pro další fytochemickou práci.

## 2 Cíl diplomové práce

Cíle diplomové práce:

1. Zpracování kůry z kmene stromu *Geissospermum vellosii* Allemão.
2. Rozdělení extraktu na jednotlivé frakce provedením sloupcové chromatografie.
3. Izolace alespoň jednoho alkaloidu z kůry stromu *Geissospermum vellosii* (Apocynaceae) v čisté formě z jedné z frakcí získaných pomocí sloupcové a flash chromatografie.
4. Identifikace získaného alkaloidu a jeho struktury spektrálními metodami (NMR a GC-MS analýza) a následné porovnání s literaturou.
5. Vyhodnocení výsledků a teoretické zpracování tématu.

### 3 Teoretická část

#### 3.1 *Geissospermum vellosii* Allemão

*Geissospermum vellosii* Allemão (*Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.*) neboli Pao pereira (Apocynaceae) je nejznámějším ze šesti známých druhů rodu *Geissospermum*. Jedná se o strom rostoucí v Brazílii, jehož kůra je využívána především pro svojí hořkost a obsah léčivých látek, mezi nimiž hlavní skupinu tvoří indolové alkaloidy. Kůra *G. vellosii* našla mimo jiné tradiční využití pro léčbu bolesti, horečky, ztráty chuti k jídlu, zácpy nebo malárie.

Extrakt z kůry bohatý na již zmíněné monoterpenové indolové alkaloidy nachází širší využití při léčbě závažnějších onemocnění, jako je např. rakovina nebo benigní hyperplazie prostaty. Extrakty *G. vellosii* taktéž projevily účinek antinociceptivní a alkaloid geissospermin by se se svou anticholinesterasovou aktivitou mohl stát významným při léčbě Alzheimerovy choroby. Vědecky prokázán byl i účinek indolových alkaloidů proti malárii. V tomto případě se jednalo především o alkaloid geissolosimine.<sup>(1)</sup>



Obrázek 1 - *Geissospermum vellosii* Allemão<sup>(34)</sup>

### 3.1.1 Botanické aspekty *G. vellosii* Allemão

#### 3.1.1.1 Taxonomické zařazení

Říše	Plantae (Rostliny)
Podříše	Tracheobionta (Cévnaté rostliny)
Oddělení	Magnoliophyta (Dvojkříčnolistové)
Třída	Magnoliopsida (Dvojkříčnolistové)
Podtřída	Asteridae
Řád	Gentianales (Hořcotvaré)
Čeleď	Apocynaceae (Toješťovité)
Rod	<i>Geissospermum</i> Allemão
Druh	<i>Geissospermum vellosii</i> Allemão

Tabulka 1 – Taxonomické zařazení

#### 3.1.1.2 Morfologický popis

Jedná se o listnatý strom se střídavými listy dosahující výšky až 22 metrů. Šířka zvrásněného kmene se pohybuje od 25 do 55 cm s přechody barev od světle hnědé po žlutou a vyznačuje se malým nebo téměř žádným množstvím latexu, který je produkován pouze v plodech a na koncích větvíček. V květu se na koncích těchto větvíček objevují početné květy jasných barev a plody jsou podlouhlé bobule hořké chuti, ve kterých se nachází 5-15 semen.

V současné době je uznáváno šest druhů *Geissospermum*, z nichž všechny pocházejí z Brazílie a nacházejí se především v oblasti Amazonie. (Tabulka 2) <sup>(1) (8)</sup>

Uznávaný název druhu	Výskyt
<i>Geissospermum vellosii</i> (leave) Miers	Guaiana až Brazílie
<i>Geissospermum argentum</i> Woodson	Brazílie až Venezuela, Guaiana
<i>Geissospermum fuscum</i> Markgr.	Venezuela až Brazílie
<i>Geissospermum reticulatum</i> A. H. Gentry	Venezuela, Brazílie, Peru
<i>Geissospermum sericeum</i> Benth. & Hook f.	Guaiana, Brazílie
<i>Geissospermum urceolatum</i> A. H. Gentry	Brazílie

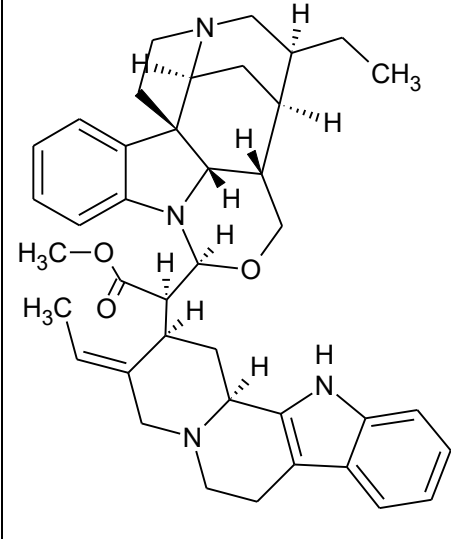
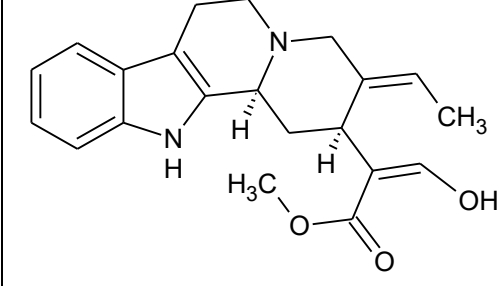
Tabulka 2 - Druhy rodu *Geissospermum* a jejich výskyt <sup>(1)</sup>

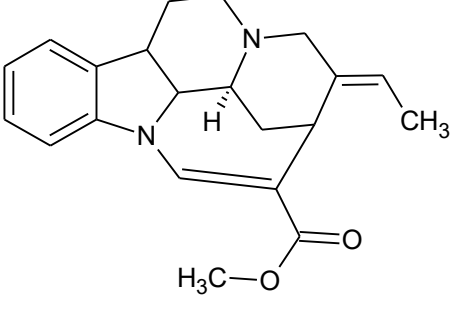
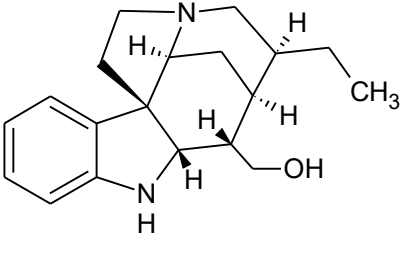
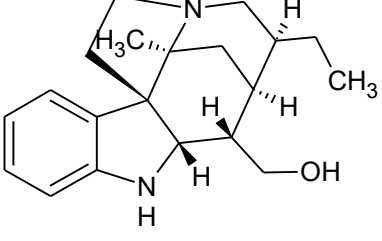
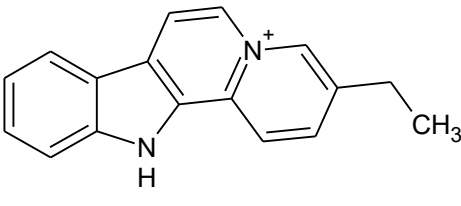
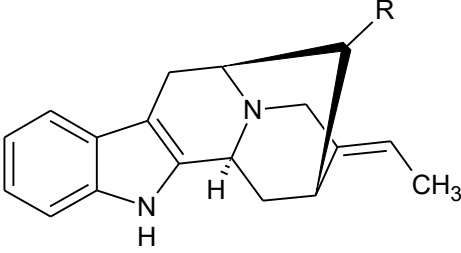
### 3.1.1.3 Toxicita

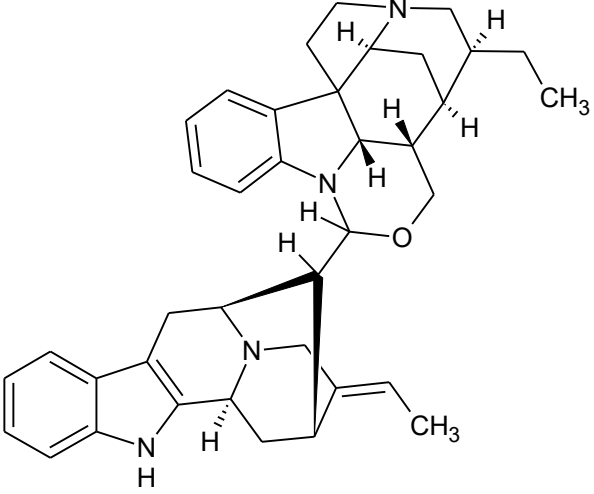
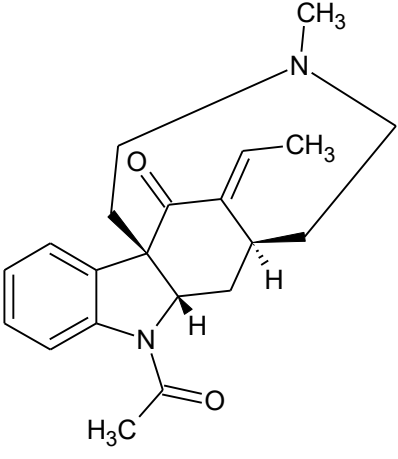
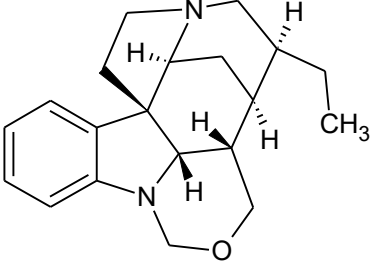
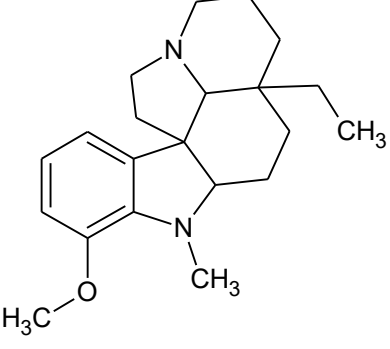
*G. vellosii* obsahuje množství alkaloidů, z nichž některé mohou být i toxické. Prokázána byla toxicita u geissosperminu v případě, že se do těla dostane subkutánním, intravenózním nebo intraperitoneálním podáním, v případě perorálního podání je jeho toxicita mírná. Extrakty s obsahem geissosperminu byly dříve používány domorodými kmeny v Brazílii jako šípový jed pro usmrcení zvířat. Naopak alkaloidem s velmi dobrým bezpečnostním profilem je flavopereirin, který vykazoval dobrou snášenlivost v preklinických studiích a stejně tak i v klinickém testování. <sup>(8)</sup>

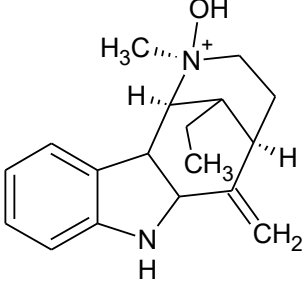
### 3.1.2 Obsahové látky *G. vellosii* Allemão

Mezi hlavní obsahové látky rodu *Geissospermum* patří  $\beta$ -karbolinové indolové alkaloidy. (**Tabulka 3**) První alkaloid z *G. vellosii* byl izolován už v roce 1877. Od té doby jich bylo izolováno a popsáno celkem 13, poslední pausperadin v roce 2005. První 4 alkaloidy (geissospermin, geissoschizin, apogeissoschizin a geissoschizolin) byly určeny jako hlavní obsahové látky *G. vellosii*. <sup>(1)</sup>

	Struktura alkaloidu	Název alkaloidu
1		Geissospermin
2		Geissoschizin

3		Apogeissoschizin
4		Geissoschizolin
5		Pereirin
6		Flavopereirin
7 8	 <p data-bbox="400 1529 507 1563">7 R=CHO</p> <p data-bbox="400 1581 536 1615">8 R=CH<sub>2</sub>OH</p>	Vellosimin Vellosiminol

9	 <p>The structure of Geissolosimin is a complex polycyclic alkaloid. It features a central bicyclic core with a benzene ring fused to one of the rings. A nitrogen atom is part of a five-membered ring containing an oxygen atom. Another nitrogen atom is part of a six-membered ring. A methyl group (CH<sub>3</sub>) is attached to the six-membered ring. The structure is highly substituted with various stereocenters indicated by wedges and dashes.</p>	Geissolosimin
10	 <p>The structure of Geissovelin is a complex polycyclic alkaloid. It features a central bicyclic core with a benzene ring fused to one of the rings. A nitrogen atom is part of a five-membered ring containing a carbonyl group (C=O) and a methyl group (CH<sub>3</sub>). Another nitrogen atom is part of a six-membered ring. The structure is highly substituted with various stereocenters indicated by wedges and dashes.</p>	Geissovelin
11	 <p>The structure of Geissoschizon is a complex polycyclic alkaloid. It features a central bicyclic core with a benzene ring fused to one of the rings. A nitrogen atom is part of a five-membered ring containing an oxygen atom. Another nitrogen atom is part of a six-membered ring. A methyl group (CH<sub>3</sub>) is attached to the six-membered ring. The structure is highly substituted with various stereocenters indicated by wedges and dashes.</p>	Geissoschizon
12	 <p>The structure of 12-methoxy-1-methylaspidospermidin is a complex polycyclic alkaloid. It features a central bicyclic core with a benzene ring fused to one of the rings. A nitrogen atom is part of a five-membered ring containing a methoxy group (H<sub>3</sub>C-O). Another nitrogen atom is part of a six-membered ring. A methyl group (CH<sub>3</sub>) is attached to the six-membered ring. The structure is highly substituted with various stereocenters indicated by wedges and dashes.</p>	12-methoxy-1-methylaspidospermidin

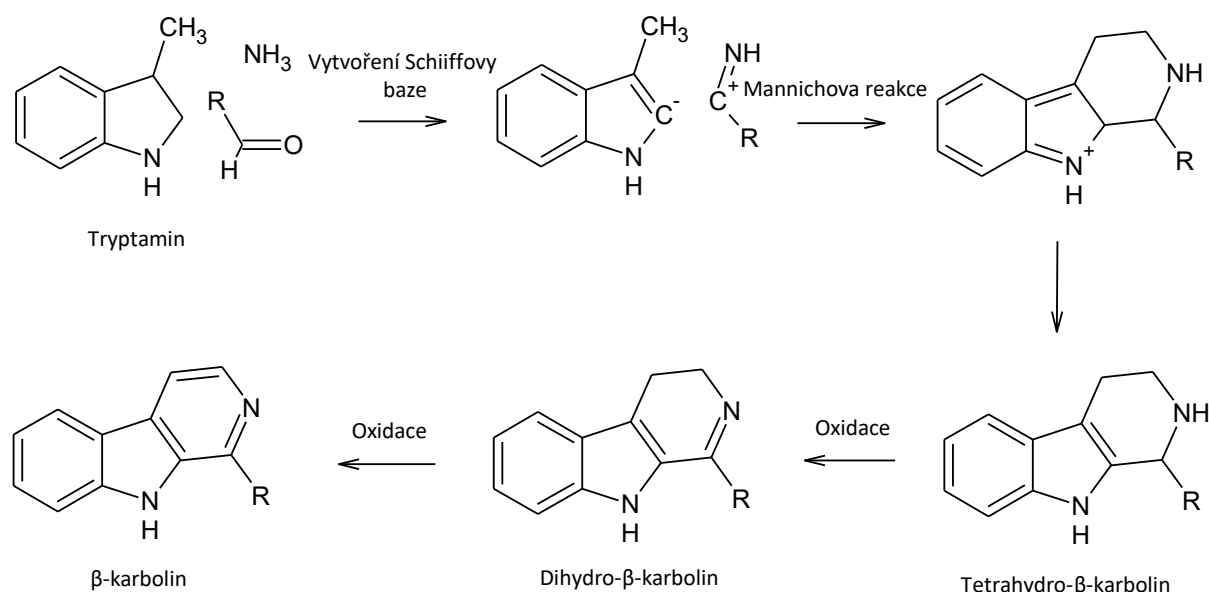
13		Pausperadin
----	---	-------------

Tabulka 3 - Obsahové látky *G. vellosii* Alemão <sup>(1)</sup>



### 3.1.2.1 Základní struktury $\beta$ -karbolinových alkaloidů

Základním skeletem  $\beta$ -karbolinových alkaloidů je 9H-pyrido[3,4-b]indol. Biosyntéza probíhá z tryptofanu. (Obrázek 2) Tyto alkaloidy se dále podle svého oxidačního stavu dělí na deriváty  $\beta$ -karbolinů a na dihydro- $\beta$ -karboliny.



Obrázek 2 – Biosyntéza indolových alkaloidů <sup>(9)</sup>

## 3.2 Onemocnění s potenciální možností využití alkaloidů izolovaných z kůry

### *G. vellosii*

#### 3.2.1 Malárie

Jedná se o onemocnění způsobené parazitem rodu *Plasmodia*. Tento parazit je na člověka přenášen kousnutím nakaženého komára rodu *Anopheles*. Po nakažení cestují parazité (v této fázi známí jako sporozoita) krevním oběhem do jater, v nichž se vyvíjejí, dospívají a vypouští dál další formu parazitů, tzv. merozoity. V této životní fázi se vrací zpět do krevního řečiště a napadají červené krvinky, v nichž se množí a po 48 až 72 hodinách krvinka praská a vypouští do krevního řečiště další a další parazity, kteří pokračují v invazi do ostatních červených krvinek.

První symptomy se obvykle vyskytnou v časovém odstupu 10 dní až 4 týdny od nakažení a od té doby se objevují v 48 až 72hodinovém cyklu. Většina symptomů je připisována úniku merozoitů do krevního řečiště, anemii vznikající v důsledku úbytku červených krvinek a velkému množství hemoglobinu, který taktéž z červených krvinek uniká. Mezi symptomy řadíme anemii, horečku, zimnici, křeče, kóma, bolesti svalů, zvracení, nevolnost a pocení. Problémem u malárie může být i přenos z matky na její nenarozené dítě a přenos infekce krevní transfuzí. Parazitům se dobře daří v horkém podnebí, přes zimu většinou vymizí.

Tato nemoc je problémem především v tropickém a subtropickém podnebném pásmu, přičemž každý rok je zaznamenáno 300-500 milionů případů nákazy malárií. Více než milion lidí ročně na tuto nemoc umírá. Komáři v některých ohrožených zemích si již vyvinuli rezistenci na insekticidy a stejně tak si někteří parazité dokázali vyvinout rezistenci na některá antibiotika.

Co se týče léčby malárie, je lékem volby chlorochin. Ovšem některé druhy původců si již na chlorochin vyvinuly rezistenci a těmto maláriím proto říkáme „chlorochin-rezistentní“. Možnostmi léčby u těchto infekcí jsou deriváty artemisininu, atovachon, proguanil, léčba založená na kombinaci chininu s doxycyklinem nebo klindamycinem a meflochin v kombinaci s doxycyklinem nebo artesunatem. Ve většině léčených případů malárie je prognóza dobrá, s vysokou pravděpodobností uzdravení, s výjimkou infekcí způsobených *Plasmodium falciparum* s přidruženými komplikacemi. <sup>(10)</sup>

#### 3.2.2 Rakovina

##### 3.2.2.1 Rakovina vaječníků

Rakovina vaječníků není až tak běžná, ale způsobuje více úmrtí než jakákoli jiná rakovina ženského reprodukčního systému. Čím dříve je rakovina diagnostikována a zahájena terapie, tím vyšší je šance na vyléčení. Z důvodu nedostatečných možností screeningových testů v rané fázi onemocnění je však ve většině případů (až 63 %) diagnostikována příliš pozdě.

Ženy s rakovinou vaječníků nevykazují žádné symptomy onemocnění nebo vykazují symptomy příliš nezřetelné, a když se objeví první z nich, je nemoc většinou již v závažné fázi. Mezi tyto symptomy patří pocit těžkosti v oblasti pánve, bolest v podbřišku, krvácení z vagíny, přibírání nebo naopak úbytek na váze, nepravidelné periody, nevysvětlitelná bolest zad a dále zvracení nebo nevolnost.

Není zcela jasné, co je příčinou rakoviny vaječníků, ale obecně se riziko onemocnění zvyšuje díky mutacím v buněčné DNA. K rizikovým faktorům patří vyšší věk, vrozené genové mutace, rodinná historie rakoviny vaječníků, substituční léčba estrogenem a počátek menstruace v brzkém věku nebo naopak její ukončení v příliš pozdním věku.

U pacientů s rakovinou vaječníků v pokročilejších stádiích již není příliš příznivá prognóza a je zde velmi snížená kvalita života. Předpokládaná doba dožití je zde kolem 5 let díky užití primární terapie a toto číslo se během let příliš nezvyšuje, protože u většiny pacientů (více než 70 %) se dříve nebo později vyvine rezistence na léčbu. V posledních stádiích života se u 28 % pacientů dále vyvine maligní ascites, zcela rezistentní na chemoterapeutickou léčbu. <sup>(11)</sup>

### **3.2.2.2 Rakovina tlustého střeva**

Rakovina tlustého střeva je druhým nejčastěji diagnostikovaným onemocněním na světě. Objevuje se jak u mužů, tak i u žen a riziko výskytu se zvyšuje po 50 letech života. Mezi rizikové faktory dále patří kolorektální polypy, rodinná historie rakoviny tlustého střeva, ulcerativní kolitida, Crohnova choroba nebo strava s vysokým obsahem tuků. Symptomy se nemusí projevit hned na začátku. Patří mezi ně průjem nebo zácpa, pocit nedostatečného vyprazdňování, krev ve stolici, častější křeče, úbytek váhy, zvracení a nevolnosti. Je proto důležité podrobit se screeningovým testům, přičemž každý člověk nad 50 let by se měl nechávat pravidelně vyšetřit. Testy zahrnují kolonoskopii a test na krev ve stolici.

Přestože se jedná o druhé nejčastěji diagnostikované onemocnění na světě, úspěšnost léčby, mezi níž se řadí chirurgické odstranění nádoru v časně fázi, odstranění nádoru zmražením (kryoterapie), radiofrekvenční ablace (využití speciálních elektrod, které zabíjí rakovinné buňky), cílená terapie (léky nebo jiné substance využívané k označení a zničení rakovinných buněk, může se jednat o monoklonální protilátky nebo inhibitory angiogeneze), imunoterapie (posílení imunitního systému, aby byl schopen bojovat s nádorovými buňkami), chemoterapie a radioterapie, není příliš vysoká a je nezbytně nutné najít nové možnosti terapie. <sup>(12)</sup>

### **3.2.2.3 Rakovina prostaty**

Rakovina prostaty se nejčastěji vyskytuje u starších mužů, u mužů mladších 40 let je velmi vzácná. Mezi rizikové faktory patří věk nad 65 let, rodinná historie a také jsou častěji postiženi

afroameričané. Nádor prostaty se obvykle zvětšuje pomalu a často se z prostaty ani nešíří dál. Některé typy ovšem mohou být i agresivnější a šířit se rychle.

Mezi nejvýznamnější symptomy patří problematické močení, snižující se síla proudu moči, krev v ejakulátu, nepříjemné bolesti v oblasti pánve nebo erektilní dysfunkce. V počátečních stádiích nemusí nemoc vykazovat vůbec žádné příznaky. Pokud je ovšem diagnostikována včas, je její léčba poměrně úspěšná. Problematická je u rakoviny prostaty i diagnóza. Vedou se debaty o tom, zda rizika nakonec nepřevažují nad výhodami pravidelného screeningu. Ani jeden z prováděných testů totiž 100 % nezaručí správnost svého výsledku. Objevují se jak falešně-positivní, tak falešně-negativní výsledky. Ty potom mohou vést buď k neléčení nemocného člověka nebo naopak k biopsii s rizikem bolestivosti, krvácení nebo infekce u člověka zdravého. Lékaři navíc ani nedokážou s jistotou říct, zda rakovina objevená při screeningu je nebezpečná nebo ne. Potom se stává, že u pacienta, kde by nezhoubný nádor nikdy nemusel vést k větším problémům nebo úmrtí, je prováděna chemoterapie, jednak proto, že lékař neví, jak rychle se daný nádor šíří nebo mizí a jednak proto, že pacientovi, kterému je diagnostikována rakovina by mohlo být nepříjemné zůstat bez léčby.

U pacientů s rakovinou prostaty je několik možností léčby. Některé z nich jsou pravidelně používané a některé jsou teprve testovány v rámci klinických studií. Klinické studie mají za úkol jednak vylepšit stávající léčbu a jednak vyzkoušet úplně nové možnosti pro léčbu rakoviny prostaty. V léčbě je možno využít sedm typů postupů. Prvním z nich je vyčkávání a pozorování. Provádí se u mužů, u kterých se zatím neprojeví žádné symptomy nemoci. V této fázi se provádí různé testy, jako rektální vyšetření prostaty, PSA, transrektální ultrazvuk nebo transrektální biopsie a zjišťuje se, zda nezačal nádor růst. Pokud růst začne, je nasazena léčba. Druhou možností u jinak zdravých pacientů, u kterých je nádor pouze v prostatě, může být operace pro mechanické odstranění nádoru. Existuje několik způsobů, jak nádor z prostaty odoperovat. Po operaci se mohou u pacientů objevit obtíže jako impotence, únik moči nebo zkrácení penisu. Třetí možností je radioterapie, která může být externí, za použití přístrojů mimo tělo k seslání radiace, nebo interní, která využívá radioaktivní substance aplikované jehlami přímo do těla do místa nebo poblíž místa nádoru. U mužů léčených radioterapií může dojít k rozvoji rakoviny močového měchýře nebo trávicího traktu. Také může navodit impotenci a únik moči. Čtvrtou možností je hormonální terapie, která díky blokaci nebo přesunu hormonů zabrání rakovinným buňkám v růstu. Může spočívat v odstranění varlat nebo podávání hormonů, které zabraňují tvorbě testosteronu. Vedlejší účinky zahrnují ztrátu sexuálního apetitu, impotenci a oslabení kostí. Pátou možností je chemoterapie, při které jsou využívány léky k zastavení růstu nádorových buněk. Může být podávána systémově nebo přímo do oblasti postižené rakovinou. Šestou možností je biologická terapie, která využívá pacientova imunitního systému a umožní tak jeho povzbuzení v boji proti rakovinným buňkám.

Sedmou a poslední možností je bisfosfonátová terapie, která je využívána až v případě rozšíření rakoviny do kostí a v případě hormonální terapie, kdy dochází k jejich oslabení.<sup>(13)</sup>

#### **3.2.2.4 Rakovina pankreatu**

Rakovina pankreatu je jedním z nejletálnějších typů rakoviny. Pacienti s touto chorobou mají šanci na 5 let přežití kolem 3-5 %, což se příliš nezměnilo během posledních 30 let. Je to dáno především omezenými možnostmi při léčbě tohoto onemocnění, jeho agresivností a problémem s včasnou diagnózou. Rakovinou jsou obvykle jako první napadeny buňky produkující žaludeční šťávy.

Mezi rizikové faktory patří kouření, diabetes, chronická pankreatitida a jisté dědičné předpoklady. Problém je toto onemocnění včas zachytit, protože v prvotních fázích nevykazuje žádné symptomy. Když už se první symptomy objeví, jsou často sotva znatelné a pacient jim nevěnuje příliš velkou pozornost. Symptomy zahrnují žloutnutí očí a kůže, ztrátu váhy, bolest v abdominální oblasti a v zádech a únavu. Navíc z toho důvodu, že je slinivka ukryta mezi ostatními orgány, nemůže lékař nádorové změny vycítit při běžném vyšetření pacienta.

Vzhledem k obvykle pozdnímu nálezu u rakoviny pankreatu je obtížné ji léčit. U tohoto onemocnění se v současné době nabízí pět možností léčby. První z nich je chirurgické vyjmutí nádoru. Pokud nádor ještě není rozšířen, tím lépe, vyjme se celý. Pokud již rozšířen je, provádějí se také různé operace jako například pankreatický nebo žaludeční bypass, ty ovšem slouží hlavně k úlevě od příznaků. Další možností je opět vnější a vnitřní radioterapie, následovaná chemoradiací, cílenou terapií s využitím inhibitorů tyrosinkinasy, a chemoterapií. Základním léčivem v této problematice zůstává už po dlouhou dobu gemcitabin (Gem), díky kterému dochází k prodloužení života o dalších 12 měsíců v porovnání s terapií fluorouracylem. Nově se používá i kombinace 5-fluorouracylu, lekovorinu, irinotekanu a oxaliplatinu, která prokazuje ještě o 5 měsíců delší prodloužení života oproti Gem. U této kombinace se zase na druhou stranu objevuje více nežádoucích účinků.<sup>(14)</sup>

#### **3.2.3 Benigní hyperplazie prostaty**

Prostata u mužů je žláza, která napomáhá k tvorbě spermatu a oklopuje močovou trubici. Se zvyšujícím se věkem se u mužů prostata postupně zvětšuje, což nemusí způsobovat žádné problémy až do té doby, kdy je příliš velká a problémy způsobí. Tento stav je také nazýván benigní hyperplazie prostaty (BHP) a objevuje se u většiny mužů nad 50 let. BHP není rakovinou a ani se nezdá, že by riziko vzniku rakoviny prostaty zvyšovala. Rané symptomy jsou ovšem rakovině prostaty velmi podobné. Řadí se mezi ně časté nutkání k močení, slabý proud moči, problém se zahájením močení, pocit neustálé potřeby jít močit nebo malé množství krve v moči. Pokud je onemocnění vážnější a léčba zahájena příliš pozdě, mohou se přidávat komplikace jako časté infekce močových cest nebo poškození močového měchýře a ledvin.

Příčina vzniku BHP není tak úplně jasná. Existuje však několik teorií, jak by toto onemocnění mohlo vznikat. BHP se objevuje u mužů se vzrůstajícím věkem, ale u mužů, u nichž byla již v dětském věku odstraněna varlata, se neobjevuje vůbec. Jednou z teorií je tedy ta, že faktory pro BHP jsou stárnutí a změna poměru produkovaných hormonů. Během života muži produkují mužský hormon testosteron a v menším množství ženský hormon estrogen. Produkce testosteronu s věkem klesá a přenechává tak větší prostor pro estrogen. Tato teorie tedy předpokládá, že vyšší hladina estrogenu způsobuje růst buněk prostaty. Druhá teorie se zabývá dihydrotestosteronem (DHT). Opět se jedná o mužský hormon, který ovšem způsobuje růst prostaty. Vědci vyzkoumali, že pokud se hromadí DHT v prostatě, potencuje její růst. Pokud muž DHT neprodukuje, potom se u něj BHP nevyvine.

Léčba BHP zahrnuje v počátečních stádiích změnu životního stylu, jako snížení příjmu tekutin, kofeinových přípravků, antidepresiv, diuretik nebo cvičení. Dále je nasazena medikace. Léčiv využívaných při BHP je několik. Prvními z nich jsou  $\alpha$ -blokátory. Jejich působením dochází k uvolnění hladké svaloviny prostaty a močového měchýře a patří sem terazosin, doxazosin, tamsulosin, alfuzosin a silodosin. Další skupinou léků jsou inhibitory 5-fosfodiesterasy, které jsou často předepisovány jako léky na erektilní dysfunkci a ty uvolňují hladké svalstvo ve spodní části močového traktu. Patří sem tadalafil. Třetí skupinou jsou inhibitory 5 $\alpha$ -reduktasy, které blokují produkci DHT, který se hromadí v prostatě a způsobuje její růst. Do této skupiny se řadí finasterid a dutasterid. Jako poslední se využívá kombinovaná terapie, přičemž kombinace některých skupin léčiv může výrazně zvýšit účinek oproti tomu, když jsou využívány jednotlivě. Mezi užívané kombinace patří finasterid + doxazosin, dutasterid + tamsulosin nebo  $\alpha$ -blokátory + antimuskarinika. <sup>(15) (16)</sup>

### 3.2.4 Alzheimerova choroba

Alzheimerova choroba (AD) je jedním z nejčastěji se vyskytujících neurodegenerativních onemocnění u starších lidí. Projevuje se jako pomalu progredující demence, tedy onemocnění mozku, které závažně ovlivňuje schopnost pacienta samostatně vykonávat běžné denní činnosti. Začátek AD je pozvolný a průběh je u každého pacienta odlišný. Nejprve napadá části mozku ovlivňující myšlení, paměť a jazyk. Pacienti mají problém rozvzpomenout se na nedávné události nebo na jména svých blízkých. S postupem času se tyto příznaky začnou zhoršovat a pacienti mají problém své blízké rozpoznat, mají problém se čtením, mluvením, mohou si zapomínat vyčistit zuby nebo česat vlasy. Později mohou začít být agresivní nebo zabloudit na cestě domů. V pozdějších fázích již potřebují, aby se o ně někdo neustále staral. Ve velmi malém množství případů se AD rozvine ve věku od 30 do 60 let. <sup>(10)</sup>

Bylo prokázáno, že u 2-5% případů je AD způsobena autozomálně dominantní mutací na chromozomech 21, 14 a 1, které jsou nositeli genů pro amyloidní prekurzorový protein (APP), presenilin 1 a presenilin 2. Další genetický faktor, který způsobuje až 20% onemocnění AD,

je přítomnost apolipoproteinu E (ApoE). Tento druhý faktor je zodpovědný za obě formy AD, ale především za tu časnou. Mezi další rizikové faktory řadíme kouření, hypertenzi, diabetes mellitus nebo zvýšený cholesterol. <sup>(17) (18) (19)</sup>

Tato nemoc je nevyléčitelná, je možné pouze zmírnit symptomy a zpomalit průběh nemoci. Předními léčivými užívanými v terapii AD jsou inhibitory acetylcholinesterasy (iAChE). Tyto léky by měly pomoci zmírnit symptomy probíhající AD. Mezi tyto léky řadíme donepezil, rivastigmin a galantamin. Ještě není zcela porozuměno mechanismu, jakým pomáhají při kontrole AD, ale zatím víme, že pomáhají inhibovat odbourávání acetylcholinu, který je mediátorem v mozku důležitý pro paměť a myšlení. S postupující AD produkuje mozek čím dál méně acetylcholinu a iAChE pak ztrácí svůj účinek. I přesto, že mají léky téměř stejný mechanismus účinku, může pacient reagovat lépe na jeden než na druhý. iAChE se využívají pro léčbu mírných až středně těžkých forem AD. Novějším lékem v léčbě AD je memantin, antagonist NMDA receptorů, který je předepisován pro léčbu již pokročilejších stádií onemocnění. Tento lék by měl pomoci zmírnit symptomy projevující se nesoběstačností v každodenním životě. Mechanismem účinku je nejspíše regulace dalšího důležitého mediátoru v mozku, glutamátu. Když je glutamát totiž produkován v příliš velkém množství, může jeho produkce vést ke smrti mozkových buněk. Možností je i předepsání kombinace léčiv, a to vždy kombinace iAChE a memantinu, protože každý z nich funguje jiným mechanismem. <sup>(10)</sup>

### 3.3 Biologická aktivita $\beta$ -karbolinových alkaloidů izolovaných z kůry *G. vellosii*

#### 3.3.1 Léčba malárie

V lidovém léčitelství byla kůra stromu *G. vellosii* využívána domorodými kmeny severní části Jižní Ameriky k léčbě malárie.

Extrakt z *G. vellosii* byl pro svou antimalarickou aktivitu poprvé zkoumán během druhé světové války, kdy výzkum prokázal účinnost extraktu z kůry podobnou účinnosti chininu po tom, co byl podáván kuřatům nakaženým *Plasmodium gallinaceum*.<sup>(20)</sup>

Během studie tohoto extraktu, tradičně užívaného komunitou Chácobo Amerindian v Bolívijské části Amazonie, prokázal ethanolový extrakt z kůry *G. vellosii* inhibiční aktivitu jak proti *Plasmodium falciparum* senzitivnímu na chlorochin ( $IC_{50} = 3,1 \mu\text{g/mL}$ ), tak i na chlorochin rezistentnímu ( $IC_{50} = 2,0 \mu\text{g/mL}$ ). Při čtyřdenním testu na myších nakažených *P. vinckei* a *P. berghei* byly myším podávány dávky extraktu v množství 50 mg/kg a výsledky ukázaly potlačení parazitů o 36 a 41% oproti kontrolním skupinám. Toxické dávky byly zjištěny až při koncentraci 100 mg/kg.<sup>(21)</sup>

Ve Francouzské Guyaně byla taktéž provedena studie na tradičně využívané extrakty z kůry stromů druhu *Geissospermum*. Během této studie byla kůra z *G. vellosii* uvařena, zchlazena a macerována v rumu po dobu jednoho měsíce. Po odpaření a otestování se ukázalo, že extrakt byl *in vitro* neaktivní proti *P. falciparum* rezistentnímu na chlorochin. Tento extrakt však prokázal aktivitu *in vivo* proti šíření parazitů *P. yoelli*. Myším byl podáván v dávce 23 mg/kg a oproti kontrolním skupinám bylo šíření parazitů potlačeno o 35%.<sup>(22)</sup>

Další důkaz aktivity *G. vellosii* proti *P. falciparum* citlivému na chlorochin byl získán o několik let později, při testování metanolového extraktu *in vitro* ( $IC_{50} = 2,22 \mu\text{g/mL}$ ). Z tohoto extraktu byly izolovány jednotlivé alkaloidy, aby se prokázalo, který z nich je nositelem účinku. Izolované alkaloidy byly geissospermin, geissoschizolin, geissolosimin a geissoschizon, z nichž nejvyšší aktivitu vykazoval geissolosimin ( $IC_{50} = 0,96 \mu\text{M}$ ) a vellosiminol byl naopak inaktivní ( $IC_{50} = 157 \mu\text{M}$ ).<sup>(2)</sup>

Aktivita jednotlivých alkaloidů byla znovu *in vitro* otestovaná v roce 2012. Jednalo se o stejné alkaloidy jako v předchozí studii a výsledky byly velice podobné. Geissolosimin, jakožto alkaloid s nejvyšší aktivitou proti plasmodiím, se proto stal jednou z hlavních struktur pro výzkum léčby malárie za využití extraktu z *G. vellosii*.<sup>(2)</sup>

#### 3.3.2 Léčba rakoviny

##### 3.3.2.1 Rakovina vaječníků

V Jižní Americe byl výtažek z *G. vellosii* dlouhodobě využíván onkologickými pacienty a lékaři integrativní medicíny, ale jeho protirakovinné účinky nebyly do té doby podrobně studovány. Proto



byla v roce 2013 provedena studie, díky níž se začala zkoumat protirakovinná aktivita extraktu z *G. vellosii* obsahující  $\beta$ -karbolinové alkaloidy buď samostatně nebo v kombinaci s karboplatinou (Cp), primárním léčivem v terapii rakoviny vaječníků.

V průběhu studie byla nejprve na několika liniích lidských nádorových buněk otestována cytotoxicita extraktu z *G. vellosii*. Cytotoxicita byla sledována v porovnání s nenádorovými buňkami epiteliální tkáně a bylo zjištěno, že nádorové buňky vykazovaly mnohem větší citlivost k extraktu, než ty nenádorové, což je u cytotoxického účinku velmi vítané. V jedné z nádorových buněčných linií byla v použité dávce zaznamenána i apoptóza, která byla v tomto případě na dávce závislá a byla hlavním důvodem úmrtí nádorových buněk po vystavení extraktu.

V další fázi byla sledována účinnost extraktu *G. vellosii* v kombinaci s konvenčně užívanou Cp a ve všech testovaných buněčných liniích tato kombinace prokázala jednak zvýšení účinku a jednak možnost snížení užívaných dávek Cp. Díky tomu by bylo možné se stejným účinkem užívat nižší dávky Cp, čímž by se snížilo i množství nežádoucích účinků.

K testování *in vivo* byly použity myši, které byly intraperitoneálně nakaženy rakovinou vaječníků. Léčba probíhala použitím extraktu *G. vellosii* o koncentracích 20 nebo 50 mg/kg/den a některým z nich byla v dávce 15 mg/kg/týden podávána i Cp. Po porovnání výsledků bylo zřejmé, že nevýznamnější pokles růstu nádoru vyvolala kombinace *G. vellosii* a Cp (87 a 97%), významné bylo i potlačení u samostatně užitého extraktu z *G. vellosii* (58 a 79%) a nejnižší bylo u samostatně použité Cp (pouhých 15%). Po ukončení léčby ani jedna z myší nevykazovala známky poškození důležitých orgánů, což nasvědčuje tomu, že v těchto dávkách by extrakt z *G. vellosii* nemusel mít ani žádné závažné nežádoucí účinky. <sup>(3)</sup>

### **3.3.2.2 Rakovina tlustého střeva**

Již dříve bylo zjištěno, že  $\beta$ -karbolinové alkaloidy mají schopnost inhibovat DNA rakovinných buněk, aniž by inhibovaly DNA zdravých buněk. <sup>(23)</sup> Flavopereirin a dihydroflavopereirin jsou součástí protirakovinného séra PB-100, které dokáže selektivně inhibovat růst rakovinných buněk tlustého střeva. Přesný mechanismus tohoto účinku není dosud znám.

Při testování účinku flavopereirinu se zjistilo, že potlačení růstu rakovinných buněk probíhá především cestou přes P-53. Tento mechanismus uzamyká fázi G2/M buněčného dělení a navozuje tak apoptózu. Přesný mechanismus tohoto děje zůstává zatím neobjasněný.

Účinné navození apoptózy nastalo díky flavopereirinu i u obou wild typů a mutací kolorektálního karcinomu, ovšem pouze za předpokladu, že byla funkční exprese P-53. Pokud dojde k mutaci P-53, je účinnost terapie CRC snížena o 35-40%. Za jednu z efektivních strategií je tedy

v současné době považována reaktivace P-53, což se zatím podařilo použitím chetominu. Bylo tak docíleno jeho přetvoření do wild typu a následného navození apoptózy. (24) Dalším alkaloidem ze skupiny  $\beta$ -karbolinových alkaloidů je krukovin, izolovaný z rostliny *Abuta grandifolia* (Menispermaceae), u něž se prokázala účinnost u mutace *Kras*. Na základě tohoto zjištění byl prověřen i flavopereirin a snížení životaschopnosti rakovinných buněk s mutací *Kras* se prokázala i u něj. (5)

### 3.3.2.3 Rakovina prostaty

Extrakt z kůry *G. vellosii* byl taktéž zkoumán *in vitro* i *in vivo* pro účinky na rakovinu prostaty. (25) Bylo prokázáno, že tento extrakt po přidání k rakovinným buňkám prostaty linie LNCaP zpomalil jejich růst a navodil apoptózu v závislosti na dávce. Zajímavým zjištěním této studie bylo, že extrakt byl účinný pouze v nižších dávkách. Pokud dávka přesahovala 50 mg/kg/den, byly výsledky s kontrolní skupinou srovnatelné. Toto zjištění bylo potvrzeno jak sledováním velikosti nádoru, tak sledováním navození apoptózy. Tento efekt byl nejspíše způsoben vyšší zátěží na trávicí trakt, u myši ovšem nebyla pozorována ztráta váhy, ani jiné obtíže na zvýšenou zátěž poukazující. (4)

Pro prevenci a léčbu rakoviny prostaty byla připravena nová účinná kombinace smícháním extraktu z kůry *G. vellosii* a extraktu z rostliny *Rauwolfia vomitoria* (Apocynaceae). Účinnými látkami ve směsi jsou flavopereirin z *G. vellosii* a alstonin z *R. vomitoria*. Každý z nich zpomaluje jiné mechanismy, obecně však dochází k vyvolání apoptózy pomocí destabilizace DNA nádorových buněk. Zároveň dochází ke snížení PSA, jednoho z hlavních markerů pro rakovinu buněk tohoto typu. (26)

V roce 2014 byl také vyzkoumán mechanismus, kterým extrakt z *G. vellosii* působí v případě rakoviny prostaty rezistentní na kastraci (CRPC). Dochází zde k zastavení buněčného růstu a navození apoptózy prostřednictvím inhibice aktivace NF- $\kappa$ B v nádorových buňkách. Zároveň buňky vystavené extraktu z *G. vellosii* vykazovaly až o 65% nižší schopnost invaze. CRPC je jedním z nejhůř léčitelných druhů rakoviny prostaty a extrakt z *G. vellosii* by v tomto směru mohl být velmi nápomocný. (27)

### 3.3.2.4 Rakovina pankreatu

Účinnost extraktu z *G. vellosii* byla po předchozích úspěšných pokusech u ostatních typů rakoviny zkoumána i u rakoviny prostaty. Po otestování cytotoxicity extraktu, která prokázala úmrtnost buněk z 85-100%, byla účinnost extraktu ověřena i v kombinaci s Gemtacinem (Gem), jedním z hlavních chemoterapeutik užívaných v léčbě rakoviny pankreatu. V porovnání se samostatně užitým Gem byl účinek výrazně zvýšen jak při testech *in vitro*, tak *in vivo*. Gem vykazoval inhibiční účinek v raných fázích léčby (prvních 20 dní), v pozdějších fázích už však inhibice nebyla nijak výrazná. Oproti tomu extrakt z *G. vellosii* prokazoval zpomalení růstu nádoru po celou dobu léčby. Léčba v kombinaci byla obdobná jako léčba extraktem z *G. vellosii* samostatně. Z tohoto pokusu vyplývá, že extrakt

z *G. vellosii* by mohl být velmi nadějným lékem v léčbě rakoviny pankreatu a to jak samostatně, tak i v kombinaci s Gem. <sup>(28)</sup>

Problémem u rakoviny pankreatu je výskyt nádorových kmenových buněk, které odolávají léčbě chemoterapií a jsou zodpovědné za metastázování a navracení nádorů. Znakem schopnosti sebeobnovy kmenových buněk je i schopnost vytvářet sféroidní útvary, jejichž počet byl po vystavení extraktu z *G. vellosii* výrazně snížen a při vyšších koncentracích úplně eliminován. U sebeobnovy a vzniku sféroidních útvarů u nádorových kmenových buněk hraje velkou roli i signální cesta Wnt/ $\beta$ -katenin. Hlavním znakem aktivace přes tuto cestu je hromadění  $\beta$ -kateninu v jádře, jehož degradace je regulovaná genem zvaným Nanog. Ten navozuje jeho fosforylaci a degradaci tak urychluje. Po vystavení extraktu z *G. vellosii* byla zvýšena exprese genu Nanog a tím snížena koncentrace  $\beta$ -kateninu v jádře. Po 48 hodinách byla exprese genu naopak snížena, což je nejspíše dáno zpětnou vazbou, tedy tím, že snížení hladin  $\beta$ -kateninu vedlo k inhibici exprese genu Nanog.

Testy na myších prokázaly účinek extraktu z *G. vellosii* na rakovinu pankreatu až po 6 dnech léčby. Ve 20. dni, kdy nádory myší v kontrolní skupině dosáhly 100% velikosti, dosáhly nádory myší léčených extraktem 30%. <sup>(6)</sup>

### 3.3.3 Léčba testosteronem navozené BHP

Na základě objevené účinnosti extraktu z *G. vellosii* u rakoviny prostaty byl zkoumán její potenciál i pro léčbu testosteronem navozené benigní hyperplazie prostaty (BHP). Zvýšení hladiny testosteronu naočkováním testosteron-propionátem (TP) u myší vedlo ke zvětšení prostaty v porovnání s kontrolní skupinou. Během pokusu byla jedna skupina léčena běžně používaným lékem finasteridem (Fin), druhá extraktem z *G. vellosii* a třetí neléčena. U prvních dvou skupin bylo zmenšení prostaty srovnatelné, oproti léčbě Fin však léčba extraktem z *G. vellosii* nezpůsobila snížení počtu spermií ani snížení hmotnosti.

Extrakt z *G. vellosii* výrazně snížil ztenčování epiteliální buněčné vrstvy a stejně tak i proliferaci buněk prostaty. Tento aspekt byl měřen prostřednictvím hladiny proliferativního buněčného nukleárního antigenu (PCNA), jehož hladiny se po vystavení extraktu výrazně snížily.

Další cestou proliferace buněk prostaty je cesta přes androgenní receptor (AR). Jak Fin, tak extrakt z *G. vellosii* jaderné hladiny AR výrazně snížily, stejně tak jako hladiny 5 $\alpha$ -reduktasy a v kaskádě po AR následujícím PSA.

U lidské BHP dochází také ke zmnožení epiteliální tkáně prostaty, přičemž po vystavení extraktu z *G. vellosii* se tato proliferace taktéž snížila, zvláště pak po delším časovém úseku, kdy po 48 hodinách klesla životaschopnost buněk o 30% a po 6 dnech o 70%. Mechanismus, jakým se tak děje, spočívá

v uzamčení buněčného cyklu v G2/M fázi dělení. U lidských buněk byl prokázán pokles exprese AR, 5 $\alpha$ -reduktasy a PSA proteinů.

Za účinnou složku extraktu byl stejně jako u rakoviny tlustého střeva označen flavopereirin, který tedy u testosteronem navozené BHP způsobuje inhibici proliferace buněk prostaty zablokováním dělení v G2/M fázi, snížení ztenčování epiteliální vrstvy a potlačuje hladiny AR, 5 $\alpha$ -reduktasy a PSA. Extrakt z *G. vellosii* by tak mohl být úspěšným, účinným a bezpečným léčivem v terapii BHP. <sup>(29)</sup>

### 3.3.4 Léčba Alzheimerovy choroby

Další onemocnění, jehož léčba prostřednictvím jednoho z alkaloidů izolovaných z *G. vellosii* byla zkoumána, je Alzheimerova choroba. V terapii této choroby se uplatnil především indolový alkaloid s názvem geissospermin. Tento alkaloid prokázal schopnost inhibice acetylcholinesterasy (AChE) v mozku myši. Geissospermin podaný 45 minut před zahájením testu v dávce 30 mg/kg/den výrazně snížil skopolaminem navozenou amnézii. V nejvyšší efektivní dávce (60 mg/kg/den) nevykazoval žádné nežádoucí centrální ani periferní cholinergní účinky. Až po dávce 200 mg/kg/den se dostavily závažné křeče doprovázené úmrtím zvířete. Díky této studii je zřejmé, že alkaloidy kůry *G. vellosii* vykazují anticholinergní aktivitu a mohou být proto využívány pro zvrácení kognitivních poruch spojených se sníženou funkcí cholinergního systému.

Významným zjištěním této studie bylo i to, že *in vitro* je extrakt z *G. vellosii* mnohem selektivnější k inhibici butyrylcholinesterasy (BuChE) než AChE. <sup>(30)</sup>

Dále byl objeven i mechanismus, kterým se geissospermin váže na AChE, čímž byl poskytnut základ pro navrhování strukturálních změn ve struktuře geissosperminu, jako je zjednodušení molekuly nebo isosterická záměna, pro výzkum dalších potenciálních inhibitorů AChE. <sup>(7)</sup>

### 3.3.5 Léčba bolesti

Tradičně domorodci v Brazílii využívali kůru z *G. vellosii* i k léčbě bolesti. Ve studii z roku 2009 vědci zkoumali působení tohoto extraktu přes 5-HT(1A) receptory.

Tato studie prokázala, že surový extrakt *G. vellosii* nebo jeho dichlormethanová frakce (1-100 mg/kg) vykazovaly výrazné antinociceptivní účinky v chemických modelech nocicepce. Tyto modely zahrnovaly bolest navozenou v myších kyselinou octovou nebo formalínem. Použité dávky (1, 10, 30 a 100 mg/kg) nijak nenarušovaly přirozený pohyb zvířat. Antinociceptivní efekt dichlormethanové frakce zahrnoval interakci s 5-HT serotoninerním systémem. Léčba touto frakcí byla významně narušena, pokud byly myši před podáním léčeny p-chlorophenylalaninmethyl esterem (PCPA, inhibitor serotoninové syntézy, 100 mg/kg/den po dobu 4 dní) nebo WAY-100635 (antagonista receptoru 5-HT(1A), 0,3 mg/kg). Naopak předlčení ketanserinem (antagonista 5-HT(2) receptoru,

0,3 mg/kg) nebo ondansetronem (antagonista 5-HT(3) receptoru, 0,5 mg/kg) antinociceptivní efekt dichlormethanu nijak neovlivnilo.

Ze závěrů této studie vyplývá, že antinociceptivní účinek extraktu *G. vellosii* prochází přes 5-HT(1A) receptory. Izolací z extraktu bylo dále zjištěno, že alkaloid zodpovědný za tento účinek je 12-methoxy-1-methyl-aspidospermidin.<sup>(31)</sup>

Další studie z roku 2016 proběhla na základě snahy o propojení znalostí o anticholinergní aktivitě extraktu z *G. vellosii*<sup>(30)</sup> a vědomostech o roli cholinergního systému při protizánětlivé léčbě. Cílem bylo přijít s terapií, která by spojovala anticholinesterasovou aktivitu s aktivitou podporující kognitivní funkce a mohla by tak vnést nový vhled do léčby patologických onemocnění zahrnujících neurologické záněty a ztrátu paměti, jako je Alzheimerova choroba.

V této studii došlo k testování frakce z kůry (PPAC) a jejího ethanolového extraktu (EE) na klasických modelech bolesti a zánětu. Obojí bylo v dávce 30 mg/kg podáváno myším, u kterých došlo k výraznému snížení křečovitých abdominálních bolestí navozených kyselinou octovou o 34,8% (EE) a 47,5% (PPAC). U formalínového testu došlo ke snížení bolesti až ve druhé fázi o 82,8% (EE, 30 mg/kg), 84,9% (PPAC, 30 mg/kg) a 100% (PPAC, 60mg/kg). V porovnání s indometacinem byly dávky EE a PPAC téměř dvojnásobně účinnější při navozování nocicepce. Při hot plate testu nebyla PPAC frakce efektivní, ale snížila protizánětlivou odpověď během druhé (50,6%) a třetí (57,8%) hodiny trvání zánětlivého edému na tlapce myši navozeném karagenanem.

Podle těchto výsledků je zřejmé, že složky obsažené v PPAC frakci mají protizánětlivou a antinociceptivní aktivitu, jejíž mechanismus zjevně není spojen s opioidním systémem. Vzhledem k podobnostem s působením indometacinu je účinek PPAC frakce nejspíš spojen hlavně s účinkem acetylcholinu.<sup>(32)</sup>

## 4 Experimentální část

### 4.1 Materiál a vybavení

#### 4.1.1 Rozpouštědla a chemikálie

- Amoniak vodný roztok 25-29% č (NH<sub>3</sub>), Penta, Praha
- Destilovaná voda (H<sub>2</sub>O)
- Diethylamin p.a. (Et<sub>2</sub>NH), LachNer, CZ
- Diethylether č. (Et<sub>2</sub>O), LachNer, CZ
- Dichlormethan p. a. (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>), Balex, Ing. Kroupa
- Dusičnan bismutitý (Bi(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>)
- Ethanol 95%, denaturovaný metanolem (EtOH), p. a., Penta, Praha
- Ethylacetát (EtOAc), p. a., Penta, Praha
- Chlorid draselný (KCl)
- Chlorid rtuťnatý (HgCl<sub>2</sub>)
- Chloroform p. a. (CHCl<sub>3</sub>), Penta, Praha
- Jodid draselný (KI)
- Kyselina chlorovodíková 5% p.a. (HCl), Penta, Praha
- Lékařský benzín lékopisné kvality ČL 2009 (LB), Penta , Praha
- Metanol p. a. (MeOH), Penta, Praha
- Uhličitan sodný (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>)

#### 4.1.2 Pomocné látky

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

#### 4.1.3 Vyvíjecí soustavy pro tenkovrstvou chromatografii

S1: EtOH + MeOH (9:1)

S2: CHCl<sub>3</sub> + MeOH (9:1)

S3: EtOAc + CHCl<sub>3</sub> + MeOH (7:3:2)

S4: CHCl<sub>3</sub> + MeOH (8:2)

S5: To + EtOAc + Et<sub>2</sub>NH (7:2:1)

#### 4.1.4 Chromatografické adsorbenty

- Komerční desky silikagel 60 GF<sub>254</sub> (Merck, Praha)
- Neutrální Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, velikost zrn 50 – 200 μm, Across, deaktivovaný přídatkem 6% H<sub>2</sub>O

- Silikagel (SiO<sub>2</sub>), 0,063 – 0,2 mm, deaktivovaný přídavkem 10% H<sub>2</sub>O (Fluka, Bukurešť)
- Silikagel pro preparativní chromatografii Kiegsel GF 254 (Merck, Praha)

#### 4.1.5 Přístrojové vybavení

- Vakuová odparka Büchi rotavapor R-114 (Büchi, Flavil, Switzerland)
- Flash chromatograf, kontrolní jednotka C-620 (Büchi, Switzerland)
- UV spektrometr
- Plynový chromatograf s hmotnostním detektorem Agilent 7890 A GC 5975 inert MSD
- Polarimetr P3000, A. Krüs Optronic, Germany

#### 4.1.6 Detekční čidla

##### 4.1.6.1 Dragendorfovo čidlo

Čidlo využívané pro detekci alkaloidů a sloučenin, které ve své struktuře obsahují navázaný dusík. Skládá se z roztoků A a B připravených v poměru 1:1.

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

Roztok B – připraven rozpuštěním jodidu draselného ve 40 ml destilované vody

##### 4.1.6.2 Meyerovo čidlo

Čidlo využívané pro zjištění alkaloidů v organickém rozpouštědle. Vzniká rozpuštěním 1,36 g chloridu rtuťnatého a 5 g jodidu draselného ve 100 ml destilované vody. Po jejich rozpuštění dochází ke vzniku tetrajodortuťnatanu draselného, který následně reaguje s alkaloidy.

#### 4.1.7 Rostlinný materiál

Na izolaci bylo použito 43 kg kůry *Geissospermum vellosii* Allemão od dodavatele Amazon Herbs Surinam. Materiál byl na fakultu dodán dne 10. 10. 2018. Po přijetí byla kůra na kulovém mlýnu rozemleta na kusy o velikosti 5 mm a dále použita k izolaci alkaloidů. Alkaloidní extrakt vykazoval zajímavou inhibiční aktivitu vůči BuChE (IC<sub>50</sub> = 11,79 ± 0,74 µg/ml).

## 4.2 Obecné postupy

### 4.2.1 Příprava a uchování rozpouštědel

Všechna rozpouštědla byla před použitím dle laboratorních zvyklostí predestilována a uchována v tmavě hnědých stojátkách za účelem jejich ochrany před světlem.

### 4.2.2 Odpařování extraktů a frakcí

Získané frakce byly odpařovány na vodní lázni o teplotě 40°C za sníženého tlaku na vakuové odparce. Tím došlo k odpaření rozpouštědel jednotlivých alkaloidních frakcí, získaných z chromatografických sloupců a preparativní TLC.

### 4.2.3 Chromatografické metody

#### 4.2.3.1 Sloupcová chromatografie

Sloupcová chromatografie spočívá v naplnění sloupcové kolony adsorbentem (neutrální  $\text{Al}_2\text{O}_3$ , velikost zrn 50 – 200  $\mu\text{m}$ , Across, deaktivovaný přísadkem 6%  $\text{H}_2\text{O}$ ), na nějž je navrstven předem připravený roztěr (extrakt naadsorbovaný na  $\text{Al}_2\text{O}_3$ ). K separaci alkaloidů byla využita stupňovitá eluce zvyšováním polaritu mobilní fáze.

#### 4.2.3.2 Tenkovrstvá chromatografie

Metoda TLC nám umožňuje zjistit přítomnost a zároveň i čistotu alkaloidů obsažených v extraktu. Pracuje se s deskami pokrytými silikagelem, na který se kapilárou nanese vzorek. Destička se vzorkem se následně vloží do komory s vyvíjecí směsí, kterou jsme si nechali alespoň půl hodiny nasytit. Pod UV lampou lze vidět tmavé skvrny. Pokud se objeví i po přestříkání Dragendorffovým činidlem, jedná se o alkaloidy.

#### 4.2.3.3 Flash chromatografie

Flash chromatografie umožňuje rychlou a přesnou separaci v plastových kolonách plněných různými typy sorbentu. Součástí přístroje jsou dvě pumpy pro rozpouštědla.

A – méně polární (dichlormethan)

B – více polární (metanol + amoniak).

Nejprve se pumpy musí propláchnout rozpouštědly, která chceme používat. Následně probíhá kondicionování kolony – nechá se protéct 3-5 násobek objemu kolony, což z ní odstraní vzduch, nedochází ke vzniku turbulencí a nečiní to problémy při měření. V posledním kroku se umístí předkolona s alkaloidním roztěrem, který chceme dělit před kolonu, a zahájí se samotné dělení.

Vše probíhá automaticky, jednotlivé frakce jsou odchyťovány do předem připravených zkumavek, polarita rozpouštědel v průběhu dělení narůstá, jedná se o gradientovou eluci.



## 4.2.4 Strukturní analýza

### 4.2.4.1 GS/MS analýza

Analýza struktury izolovaného alkaloidu byla provedena pomocí plynového chromatogramu Agilent 7890A GC 5975, který pracuje s hmotnostním detektorem při elektronové ionizaci 70 eV. Pro separaci byla využita kolona HP-5 MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 mm, Agilent Technologies, USA) a teplotní program 100°C – 180°C (7 minut), 180°C (1 min), 180°C – 300°C (24 min). Nosným plynem bylo helium s průtokovou rychlostí 1 ml/min a teplota při nástřiku vzorku činila 180°C. Alkaloidní roztok byl na kolonu nastříknut v množství 1 µl o koncentraci 1 mg/ml v poměru 1:10 ve „split mode“. Vzniklá spektra alkaloidů byla porovnávána se spektry dostupnými v komerční knihovně spekter NIST 11 (National Institute of Standards and Technology Library, USA), daty publikovanými v odborné literatuře a se standardy látek, které již byly izolovány na našem pracovišti.

### 4.2.4.2 NMR (Nukleární magnetická rezonance)

NMR spektra byla měřena na spektrometru VNMR S500 v roztocích CDCl<sub>3</sub> při teplotě 25°C. Spektrometr pracuje při 499,87 MHz pro jádra <sup>1</sup>H a 125,70 MHz pro jádra <sup>13</sup>C. K ozařování a detekci signálu byla využita širokopásmová dvoukanálová gradientová sonda s regulací teploty (OneNMR).

### 4.2.4.3 Měření optické otáčivosti

Optická otáčivost byla měřena na polarimetru P3000 v metanolových nebo chloroformových roztocích alkaloidu.

## 4.2.5 Měření biologické aktivity

### 4.2.5.1 Testování inhibiční aktivity získaných alkaloidů proti cholinesterasám

Chemikálie:

- Acetylthiocholin jodid (Sigma-Aldrich) (použitý 10mM roztok)
- Butyrylthiocholin jodid (Sigma-Aldrich) (použitý 10mM roztok)
- 5,5' -ditiobis-2nitrobenzoová kyselina ≥98% (Sigma Aldrich) (použitý 5mM roztok)
- Dimethylsulfoxid p.a. (Sigma-Aldrich) (DMSO)
- Galanthamin hydrobromid 95% (Changsha Organic Haerb Inc., China)
- Huperzin A 95% (TAZHONGHUI) (Tai'an zhonghui Plant Biochemical Co., Ltd., China)
- 5mM fosfátový pufr pH 7,4
- 5mM fosfátový pufr pH 7,4 obsahující 150 mM chloridu sodného
- 100mM fosfátový pufr pH 7,4
- Rekombinantní AChE (Univerzita Hradec Králové)
- Rekombinantní BuChE (Univerzita Hradec Králové)

### **Přístroje:**

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

### **Podmínky měření:**

- Teplota 37 °C
- Prostředí fosfátového pufru (pH 7,4)
- Spektrofotometrické stanovení barevných produktů při vlnové délce 436 nm (AChE) a 412 nm (BuChE)

### **Vlastní stanovení inhibiční aktivity izolovaných alkaloidů**

Pro stanovení hodnoty  $IC_{50}$  byla použita Ellmanova spektrofotometrická metoda s použitím 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoové kyseliny (DTNB) [178] [ $\lambda = 436$  nm (AChE), nebo  $\lambda = 412$  nm (BuChE)]. Během stanovení byl sledován nárůst absorpance za 1 min. Hodnoty  $IC_{50}$  byly vypočítány ze získaných hodnot poklesu aktivity AChE nebo BuChE nelineární regresí v programu GraphPad Prism (verze pro Windows; výrobce GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Výsledky byly porovnány s hodnotami  $IC_{50}$  známých inhibitorů cholinesteras - galanthaminem a huperzinem A. Procenta inhibice (% I) byla vypočítána podle vzorce:

$$\%I = 100 - \left(100 \times \frac{\Delta A_{Bl}}{\Delta A_{Sa}}\right)$$

% I – procento inhibice;  $\Delta A_{Bl}$  – pokles absorpance slepého vzorku během 1 min;  $\Delta A_{Sa}$  – absorpance testovaného vzorku během 1 min.

### **Stanovení aktivity látek**

Nejprve byl proveden screening při 100 mM, pokud byla inhibiční aktivita vyšší než 50%, došlo ke stanovení  $IC_{50}$ . Pro měření inhibiční aktivity látky byly použity koncentrace 40; 10; 4; 1 a 0,4 mM, případně další série koncentrací v tomto početním modu, byla-li aktivita vysoká. Do poslední 6. řady byl pipetován DMSO jako slepý vzorek.

Získané inhibiční aktivity  $IC_{50}$  AChE a  $IC_{50}$  BuChE pro jednotlivé látky byly porovnávány s inhibičními aktivitami referenčních látek – Galanthaminem ( $IC_{50}$  AChE =  $1,710 \pm 0,065$   $\mu$ M,  $IC_{50}$  BuChE =  $42,301 \pm 0,065$   $\mu$ M), Huperzinem A ( $IC_{50}$  AChE =  $0,033 \pm 0,001$   $\mu$ M,  $IC_{50}$  BuChE > 1000  $\mu$ M) a berberinem ( $IC_{50}$  AChE =  $0,705 \pm 0,104$   $\mu$ M,  $IC_{50}$  BuChE =  $30,721 \pm 3,492$   $\mu$ M).

#### **4.2.5.2 Stanovení inhibiční aktivity vůči GSK-3 $\beta$**

##### **Chemikálie**

- Dimethylsulfoxid p.a. (DMSO) (Sigma-Aldrich)
- Adenosin 5-trifosfát (ATP) (Sigma-Aldrich)
- GSM (Sigma-Aldrich)
- GSK-3 $\beta$  (Sigma-Aldrich)
- SB 415286 (Sigma-Aldrich)
- Souprava činidel Kinase-Glo (Promega) (Sigma-Aldrich)
- Pufir pH 7,4(složení: octan hořečnatý (Sigma-Aldrich)
- Kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA) (Sigma-Aldrich)
- Tetra sodná sůl EGTA (Sigma-Aldrich)
- 2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethansulfonová kyselina (HEPES) (Sigma-Aldrich)

##### **Přístroje**

- Multireader Victor X3

##### **Vlastní stanovení inhibiční aktivity izolovaných alkaloidů**

Stanovení inhibiční aktivity proběhlo ve spolupráci s dr. Vincenzou Andrisano z Department for Life Quality Studies University of Bologna. Stanovení bylo provedeno pomocí Kinase-Glo Kit (Promega Biotech Iberica, S.L., Madrid, Španělsko), humánní rekombinantní GSK-3 $\beta$  a GSM substrátu napodobujícího svalovou glykogen synthasu (Merck Millipore, Darmstadt, Německo) luminiscenční metodou podle Bakiho et al. Stanovení bylo provedeno v bílých 96-jamkových destičkách s plochým dnem. V každé jamce bylo 10  $\mu$ l roztoku testované látky v DMSO o výsledné koncentraci 1 mM naředěného pufrem (50 mM HEPES, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA a 15 mM octanu hořečnatého) na požadovanou koncentraci. K tomuto roztoku bylo přidáno 10  $\mu$ l ATP (výsledná koncentrace 1  $\mu$ M), 10  $\mu$ l 100  $\mu$ M GSM a 10  $\mu$ l GSK-3 $\beta$  (20 ng). Negativní kontrola byla vytvořena přidáním dalších 10  $\mu$ l pufru a do pozitivní kontroly bylo přidáno 10  $\mu$ l standardu SB-415286. Celková koncentrace DMSO ve výsledné směsi nepřesáhla 5 %. Reakční směs byla 30 min inkubována při teplotě 37 °C, poté byla enzymatická reakce zastavena přidáním 40  $\mu$ l Kinase-Glo činidla a po dalších 10 min byla měřena luminiscence (dlouhodobý typ luminiscence). Hodnoty IC<sub>50</sub> byly spočítány a vyhodnoceny pomocí programu GraphPaD Prism (verze pro Windows; výrobce GraphPaD Software, San Diego, CA, USA).

## 4.3 Izolace alkaloidů

### 4.3.1 Příprava alkaloidního extraktu

K přípravě alkaloidního extraktu bylo použito 43 kg sušené rozemleté drogy *Geisospermum vellosii* Allemão. Droga rozemletá na části o velikosti 5 mm byla následně po 250 g extrahována do 95% ethanolu za varu po dobu 30 minut. Objemově vycházel poměr rozpouštědlo:droga 4:1. Vzniklý extrakt byl vždy zfiltrován přes vliselin a odpařen při snížené teplotě. Celkem vzniklo 5 kg primárního extraktu tmavě hnědého zbarvení a viskózní konzistence.

#### 4.3.1.1 Získání terciárních bazí

K tomuto extraktu bylo přidáno cca 500 ml 95% EtOH, extrakt byl rozpuštěn, převeden do destilační baňky. V destilační baňce bylo přidáno 1,5 l destilované vody, směs byla zahřáta na 60°C a EtOH oddestilován. Ke zbytku bylo přidáno 5 litrů horké destilované vody o teplotě 80°C a takové množství 5% HCl, aby bylo výsledné pH filtrátu v rozmezí 1,3 – 1,5. Roztok byl doplněn destilovanou vodou na cca 15 litrů a ponechán přes noc sedimentovat. Po sedimentaci byla provedena opatrná dekantace, roztok pokojové teploty byl zfiltrován přes neutrální křemelinu a zbytek promyt malým množstvím vody. Tímto způsobem bylo získáno 17,5 litrů primárního extraktu.

Před vytřepáváním alkaloidů byl filtrát naředěn destilovanou vodou v poměru 1:1. Každý litr tohoto roztoku byl alkalizován 200 ml 10% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> v Erlenmayerově baňce a bylo přidáno 500 ml CHCl<sub>3</sub>. Prvotní třepání bylo provedeno v Erlenmayerově baňce a roztok byl zfiltrován do třepačky přes vliselin. Vytřepávání terciárních bazí bylo provedeno celkem 5x a chloroformový výtřepek byl odpařen. Celkem se vytřepáváním extraktu ze 43 kg drogy získalo 1530 g tmavě hnědého velmi viskózního odparku.

#### 4.3.1.2 Čištění terciárních bazí (výtřepky Et<sub>2</sub>O a CHCl<sub>3</sub>) – AL-674

1530 g hnědého viskózního odparku bylo rozpuštěno v CHCl<sub>3</sub> a rozděleno do 6 baněk po 255 g. Odparek v každé baňce byl zpracováván zvlášť. Každá baňka, obsahující 255 g odparku, byla zahřáta do ztekucení (při cca 70°C) a bylo přidáno 200 ml 5% HCl. Na vodní lázni bylo vše důkladně promícháno, následně se přidalo 300 ml vody a opět důkladně promícháno. Suspenze byla ponechána chvíli zchladnout, kyselý hnědý roztok byl slit a postup opakován znovu s tím rozdílem, že na konci byla provedena sonikace po dobu 5 minut. Rozpuštěné zbytky ze všech 6 baněk byly nakonec spojeny a přidalo se 500 ml 5% HCl. Po důkladném protřepání s 600 ml destilované vody, bylo zahřáto na 70°C, sonifikováno a vodná vrstva opět slita. Kyselé roztoky alkaloidů byly zředěny vodou a tento roztok byl po zchladnutí zfiltrován. Z tohoto postupu vzniklo 12,5 litru hnědého, kyselého roztoku.

### 4.3.2 Extrakce do etheru

12,5 litru získaného hnědého, kyselého roztoku bylo vytřepáváno po 1 litru. V dělicí nálevce bylo k 1 litru roztoku přidáno 230 ml 10%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  a při prvním protřepávání 600 ml  $\text{Et}_2\text{O}$ . Při dalších 4 protřepáváních bylo postupně přidáváno 300 ml  $\text{Et}_2\text{O}$ . Etherová vrstva se dělila dobře a dělení vedlo k vyloučení hnědošedé sraženiny. Etherové vrstvy byly následně slity a rozpouštědlo oddestilováno. Výsledkem byl světle žlutý medovitý velmi viskózní odparek. Z 1250 g primárního alkaloidního výtřepku jsme získali 50,4 g tohoto odparku. Zbýlý vodní roztok byl testován Mayerovým činidlem a reagoval velmi silně na přítomnost alkaloidů. Byl proto znovu vytřepán (1x 500 ml  $\text{CHCl}_3$  a 5x 350 ml  $\text{CHCl}_3$ ), výtřepky spojeny a odpařeny za vzniku šedohnědého nafouknutého odparku. Celková hmotnost odparku z 1250 g primárního alkaloidního výtřepku byla tedy 53,8 g.

### 4.3.3 Sloupcová chromatografie

Roztěr byl připraven smícháním 53,8 g alkaloidního extraktu rozpuštěného v  $\text{CHCl}_3$  s 200 gramy neutrálního oxidu hlinitého ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ , velikost zrn 50 – 200  $\mu\text{m}$ , Across, deaktivovaný 6%  $\text{H}_2\text{O}$ ). Na vodní lázni byl z roztěru za stálého míchání  $\text{CHCl}_3$  odpařen a ten byl následně umístěn do exsikátoru na 24 hodin.

K separaci alkaloidů byla využita stupňovitá eluce zvyšováním polaritní mobilní fáze. Nejprve byl použit  $\text{CHCl}_3$ : lékářský benzín, poté čistý  $\text{CHCl}_3$  a nakonec  $\text{CHCl}_3$ :  $\text{EtOH}$ .

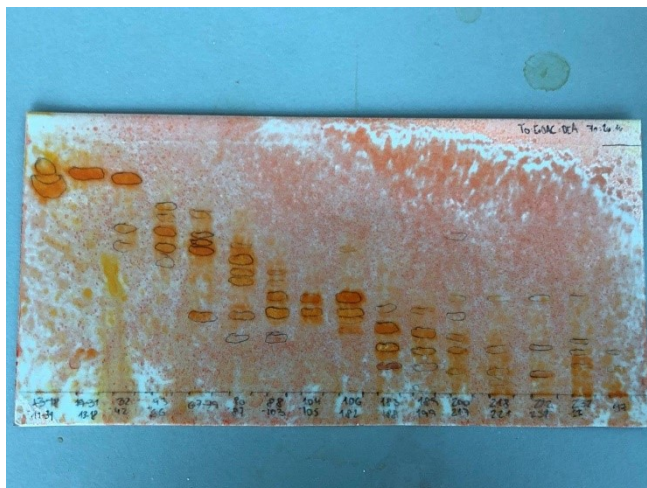
Jednotlivé frakce byly jímány po 250 ml a tímto způsobem bylo získáno 272 frakcí. Každá z frakcí byla zkoušena pomocí TLC, shodné fáze sloučeny k sobě a výsledkem bylo 16 frakcí GV-(1-16).

**(Tabulka 4)**

Název frakce	Číslo frakce	Eluční systém	Hmotnost odparku (g)
<b>GV-1</b>	13-18	CHCl <sub>3</sub> :Benzín 1:1	<b>0,0793</b>
<b>GV-2</b>	19-27 28-31	CHCl <sub>3</sub> :Benzín 1:1 CHCl <sub>3</sub> :Benzín 52:48	<b>0,0977</b>
<b>GV-3</b>	32-36 37-42	CHCl <sub>3</sub> :Benzín 52:48 CHCl <sub>3</sub> :Benzín 55:45	<b>1,3746</b>
<b>GV-4</b>	43-56 57-66	CHCl <sub>3</sub> :Benzín 55:45 CHCl <sub>3</sub> :Benzín 60:40	<b>5,1969</b>
<b>GV-5</b>	67-72 73-79	CHCl <sub>3</sub> :Benzín 60:40 CHCl <sub>3</sub> :Benzín 65:35	<b>0,7862</b>
<b>GV-6</b>	80-87	CHCl <sub>3</sub> :Benzín 65:35	<b>1,5764</b>
<b>GV-7</b>	88 89-103	CHCl <sub>3</sub> :Benzín 65:35 CHCl <sub>3</sub> :Benzín 70:30	<b>8,2681</b>
<b>GV-8</b>	104-105	CHCl <sub>3</sub> :Benzín 75:25	<b>1,0337</b>
<b>GV-9</b>	106-119 120-131 132-149 150-156 157-171 172-182	CHCl <sub>3</sub> :Benzín 75:25 CHCl <sub>3</sub> :Benzín 80:20 CHCl <sub>3</sub> :Benzín 85:15 CHCl <sub>3</sub> :Benzín 90:10 CHCl <sub>3</sub> :Benzín 95:5 CHCl <sub>3</sub> 100	<b>17,964</b>
<b>GV-10</b>	183-188	CHCl <sub>3</sub> :EtOH 99:1	<b>1,2305</b>
<b>GV-11</b>	189-199	CHCl <sub>3</sub> :EtOH 99:1	<b>3,0227</b>
<b>GV-12</b>	200-214 215-217	CHCl <sub>3</sub> :EtOH 99:1 CHCl <sub>3</sub> :EtOH 97:3	<b>2,2376</b>
<b>GV-13</b>	218-221	CHCl <sub>3</sub> :EtOH 95:5	<b>0,3827</b>
<b>GV-14</b>	222-231	CHCl <sub>3</sub> :EtOH 95:5	<b>1,3326</b>
<b>GV-15</b>	232-233 234-250 251-256	CHCl <sub>3</sub> :EtOH 95:5 CHCl <sub>3</sub> :EtOH 90:10 CHCl <sub>3</sub> :EtOH 85:15	<b>2,8556</b>
<b>GV-16</b>	257-264 265-272	CHCl <sub>3</sub> :EtOH 80:20 CHCl <sub>3</sub> :EtOH 50:50	<b>0,536</b>
			<b>47,9746</b>

Tabulka 4 - Jednotlivé frakce po rozdělení vzorku při sloupcové chromatografii

Jednotlivé spojené frakce byly naneseny na souhrnné TLC (adsorbent SiO<sub>2</sub> 60 F254 Merck). TLC bylo následně vyvinuto v soustavě S5 a detekce proběhla pod UV lampou a pomocí Dragendorffova činidla. (**Obrázek 3**) Díky detekci byla prokázána přítomnost jednotlivých alkaloidů.



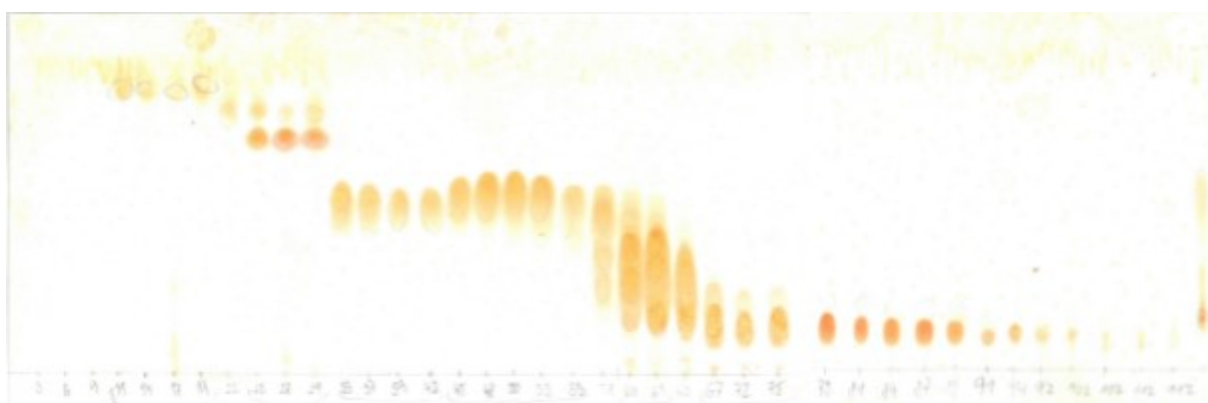
**Obrázek 3** - TLC po sloupcové chromatografii, Dragendorffovo činidlo

#### 4.3.4 Separace alkaloidů GV-8

##### 4.3.4.1 Flash chromatografie

Pomocí flash chromatografie došlo k rozdělení frakce GV-8 na další frakce GV-8 (1-8). Provedli jsme přípravu přístroje, naplnění kolony a předkolony, nastavili příslušné parametry do PC (absorpční maxima alkaloidů, změna polariry) a dělení již proběhlo na přístroji automaticky.

Po ukončení dělení látek bylo provedeno souhrnné TLC vybraných frakcí (každá třetí zkumavka + každá zkumavka v místech, kde záznam na PC ukazoval pík). Detekce proběhla pomocí UV záření a postříkání Dragendorffovým činidlem. (**Obrázek 4**) Na základě TLC vyvinutém v soustavě S2 byla frakce GV-8 rozdělena na podfrakce 1-8.



**Obrázek 4** - TLC po flash chromatografii



#### **4.3.4.2 Separace alkaloidů GV-8-4**

Pro další separaci byla vybrána frakce GV-8-4 o hmotnosti 0,1219 g. Nejprve byly vyhledány vhodné mobilní soustavy. Nejlépe se alkaloidy oddělily po postupném vyvinutí v mobilních soustavách S1 a S2. Celá frakce byla nanášena na skleněné desky (15x15 cm) a po pohledu pod UV rozdělena na podfrakce A, B a C. Jednotlivé frakce byly z desky seškrábány do kádinek, eluovány (přes vatou, křemelinu a proléváním EtOH a CHCl<sub>3</sub>, kontrola obsahu alkaloidů prováděna pomocí Dragendorffova činidla) a směs etanolu a chloroformu odpařena na vakuové odparce.

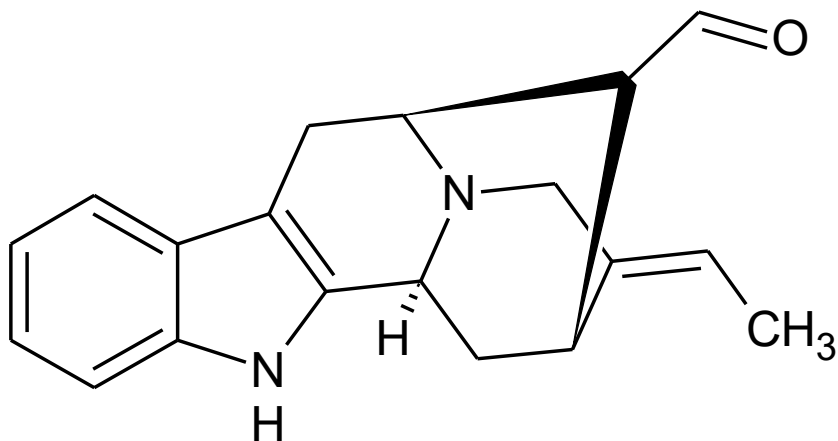
V další fázi bylo pracováno s frakcí GV-8-4-A. Po nalezení vhodné mobilní fáze, ve které se alkaloidy od sebe rozdělily ještě lépe, byla tato frakce vyvinuta na hliněné komerční desce dvakrát po sobě ve vyvíjecí soustavě S3. Díky tomu došlo k rozdělení vzorku GV-8-4-A na A, B, C, D, E. Z komerční desky byly jednotlivé alkaloidy opět seškrábány, eluovány a odpařeny na vakuové odparce stejným postupem, jako ve fázi předchozí.

Z podfrakce GV-8-4-A-B bylo získáno 60 mg bílých krystalů.

## 5 Výsledky

### 5.1 GV-8-4-A-B

Z frakce GV-8-4-A-B bylo v čisté formě izolováno 60 mg alkaloidu, který byl identifikován jako vellosimin. (**Obrázek 5**) Jednotlivá spektra byla porovnána s literaturou a knihovnou spekter.



Obrázek 5 - Vellosimin

#### 5.1.1 Molekulová hmotnost

Mr = 292

#### 5.1.2 MS analýza

EI-MS: m/z: 292 (67), 291 (43), 264 (20), 263 (100), 249 (23), 207 (29), 182 (18), 169 (83), 168 (52), 115 (16)

#### 5.1.3 NMR analýza

$^1\text{H NMR}$  (500MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ )  $\delta$ : 11.91 (1H, bs), 9.77 (1H, s), 7.69 (1H, d,  $J = 7.5$  Hz), 7.60 (1H, d,  $J = 7.5$  Hz), 7.31 (1H, td,  $J = 7.5$  Hz,  $J = 1.5$  Hz), 7.27 (1H, td,  $J = 7.5$  Hz,  $J = 1.5$  Hz), 5.24–5.16 (1H, m), 4.36 (1H, dd,  $J = 9.8$  Hz,  $J = 2.4$  Hz), 3.80–3.75 (1H, m), 3.64–3.51 (2H, m), 3.32 (1H, dd,  $J = 15.1$  Hz,  $J = 5.0$  Hz), 3.21–3.18 (1H, m), 2.75 (1H, dd,  $J = 15.1$  Hz,  $J = 1.4$  Hz), 2.51 (1H, d,  $J = 7.6$  Hz), 1.98–1.91 (1H, m), 1.87–1.81 (1H, m), 1.56 (3H, dt,  $J = 6.9$  Hz,  $J = 2.0$  Hz).

$^{13}\text{C NMR}$  (125MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ )  $\delta$ : 203.2, 140.0, 137.7, 136.2, 128.5, 121.4, 119.3, 118.4, 116.2, 111.8, 103.6, 56.2, 55.2, 51.2, 50.9, 33.4, 27.8, 27.3, 12.6.

#### 5.1.4 Optická otáčivost

Hodnota  $[\alpha]_D^{20} = -53^\circ$  ( $c = 0,12$ ; MeOH)

#### 5.2 Biologická aktivita u izolovaných alkaloidů

U izolovaného alkaloidu byla změřena jeho inhibiční aktivita vůči AChE, BuChE a GSK3  $\beta$ . V následující tabulce jsou porovnány inhibiční aktivity izolované látky s hodnotami standardů.

(Tabulka 5)

	Vellosimin	Galanthamin <sup>St</sup>	Huperzin A <sup>St</sup>	SB-415286 <sup>St</sup>
<b>% inhibice AChE (100 <math>\mu\text{M}</math>)</b>	15,23 $\pm$ 4,80	-	-	-
<b>IC<sub>50</sub> AChE <math>\mu\text{M}</math> (<math>\mu\text{g}/\text{ml}</math>)</b>	NS	1,7 $\pm$ 0,1	0,033 $\pm$ 0,001	-
<b>% inhibice BuChE (100 <math>\mu\text{M}</math>)</b>	83,92 $\pm$ 0,65	-	-	-
<b>IC<sub>50</sub> BuChE <math>\mu\text{M}</math> (<math>\mu\text{g}/\text{ml}</math>)</b>	11,79 $\pm$ 0,74	42,3 $\pm$ 1,3	> 500	-
<b>GSK3 <math>\beta</math> % inhibice (<math>c=50 \mu\text{M}</math>)</b>	100,00 $\pm$ 0,00	-	-	-
<b>IC<sub>50</sub> GSK3 <math>\beta</math> (<math>\mu\text{M}</math>)</b>	7.18 $\pm$ 1.12	-	-	70 nM

Tabulka 5 - Porovnání inhibiční aktivity vůči AChE a BuChE se standardy (St) Galantaminem a Huperzinem A

## 6 Diskuze a závěr

Na základě screeningové studie, která byla provedena na katedrách farmaceutické botaniky a farmakognozie bylo zjištěno, že alkaloidní extrakt z *Geissospermum vellosii* Allemão má velice zajímavou inhibiční aktivitu vůči lidským cholinesterasám. Tato stanovení probíhala pomocí spektrofotometrické Ellmanovy metody. Byla měřena inhibiční aktivita alkaloidního extraktu z kůry vůči lidské AChE (nebyla stanovena) a BuChE ( $11,79 \pm 0,74 \mu\text{M/ml}$ ).

Cílem diplomové práce bylo získat etherový alkaloidní extrakt, provést sloupcovou chromatografii a následně z vybrané frakce pomocí chromatografických metod izolovat obsahové látky. Pro chromatografické dělení byla vybrána frakce GV-8, která byla zpracována pomocí flash chromatografie a byl získán jeden alkaloid v čisté formě, u kterého byla změřena optická otáčivost.

Sušená kůra byla nejprve rozemleta a následně extrahována ethanolem, takto byl získán sumární extrakt. Sumární extrakt byl vytřepáván postupně do etheru a následně do chloroformu tak, aby došlo k rozdělení přítomných alkaloidů. Bylo získáno 50,4 g etherového extraktu a 53,8 g chloroformového extraktu.

Etherový extrakt byl dále zpracováván pomocí sloupcové chromatografie a bylo získáno 16 frakcí. Pro tuto práci byla vybrána frakce GV-8, která byla následně zpracována pomocí flash chromatografie tenkovrstvé chromatografie a výsledkem byla izolace jedné látky v čisté formě.

Látka byla pomocí GC-MS měření, NMR analýzy, měření optické otáčivosti a porovnání s literaturou identifikována jako vellosimin (GV-8-4-A-B).

Biologická aktivita vellosiminu vůči cholinesterasám byla stanovena pomocí Ellmanovy spektrofotometrické metody a byla porovnána se standardy galanthaminem a huperzinem A. Galanthamin je silný inhibitor acetylcholinesterasy ( $1,7 \pm 0,1 \mu\text{M}$ ), vůči butyrylcholinesterase nevykazuje silnou inhibici ( $42,3 \pm 1,3 \mu\text{M}$ ). Huperzin A vykazuje vyšší inhibiční aktivitu vůči AChE než galanthamin ( $0,033 \pm 0,001 \mu\text{M}$ ), ale vůči butyrylcholinesterase žádnou aktivitu nevykazuje ( $> 500 \mu\text{M}$ ). Inhibiční aktivita vellosiminu vůči acetylcholinesterase je velice nízká, a proto nebyla stanovena  $IC_{50}$ . Naproti tomu inhibiční aktivita vůči butyrylcholinesterase dosahuje zajímavých výsledků ( $11,79 \pm 0,74 \mu\text{M}$ ).

Izolovaný alkaloid byl v návaznosti na jeho dobrou aktivitu vůči BuChE testován na inhibici GSK-3 $\beta$ . Jeho aktivita se v porovnání s ostatními látkami přírodního rostlinného původu dá považovat

za velice dobrou. V porovnání se syntetickým standardem je však nižší. I tak by se dalo říci, že se naše cesta hledání látek s potenciálem k léčbě AD ubírá správným směrem. V dalším výzkumu bychom se mohli zaměřit i na tvorbu polosyntetických derivátů, pokud bude vellosimin izolován v dostatečném množství.

V budoucnu by bylo dobré izolované látky otestovat i pro jejich antimalarickou aktivitu, protinádorovou aktivitu a případně i antimikrobiální.

## 7 Abstrakt

Václavíková, K., Izolace alkaloidů druhu *Geissospermum vellosii* Alemão a studium jejich biologické aktivity II., Diplomová práce, Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra farmakognozie, Hradec Králové 2020.

Rod *Geissospermum* rostoucí v Jižní Americe je významný z fytochemického hlediska pro obsah indolových alkaloidů. Tento jihoamerický strom je v lidovém léčitelství využíván pro léčbu různých onemocnění, mezi něž řadíme například poruchy kognitivních funkcí, malárii, ale i léčbu nádorových onemocnění. Rostlina byla pro další výzkum vybrána na základě screeningové studie, ve které byla zjištěna velice zajímavá aktivita vůči cholinesterasám ( $IC_{50}$  AChE =  $10,51 \pm 3,03$   $\mu\text{g/ml}$  a  $IC_{50}$  BuChE =  $0,39 \pm 0,057$   $\mu\text{g/ml}$ ).

Cílem diplomové práce bylo získání sumárního extraktu z kůry stromu, jeho následné zpracování, izolace alespoň jednoho alkaloidu v čisté formě a definice jeho struktury. Pomocí chromatografických metod byl alkaloidní extrakt rozdělen na 16 frakcí, které byly dále zpracovány. Samotná izolace jednotlivých alkaloidů probíhala z frakce GV-8, která byla podrobena flash chromatografii a následnému přečištění izolovaných látek pomocí tenkovrstvé chromatografie. Z této frakce byla izolována jedna čistá látka (vellosimin), u které byla pomocí Ellmanovy metody stanovena její inhibiční aktivita vůči lidské rekombinantní acetylcholinesterase a butyrylcholinesterase a dále byla stanovena inhibiční aktivita vůči GSK-3 $\beta$ . V porovnání se standardy vykazoval vellosimin zajímavou inhibiční aktivitu vůči BuChE a GSK-3 $\beta$  ( $IC_{50}$  BuChE =  $11,79 \pm 0,74$   $\mu\text{M}$  a  $IC_{50}$  GSK-3 $\beta$  =  $7,18 \pm 1,12$   $\mu\text{M}$ ).

V teoretické části jsou uvedeny známé biologické aktivity zjištěné v minulosti u rozličných alkaloidů izolovaných z *G. vellosii*. U některých onemocnění je i známý konkrétní alkaloid, který je nositelem účinku, u jiných to zatím není specifikováno. Účinnost extraktu z *G. vellosii* byla prokázána při léčbě malárie (geissolosimin), rakoviny vaječníků, tlustého střeva (flavopereirin), prostaty (flavopereirin) a pankreatu, benigní hyperplazie prostaty (flavopereirin), Alzheimerovy choroby (geissospermin) a léčby bolesti (12-metoxy-1-methyl-aspidospermidin). U vellosiminu žádná biologická aktivita zatím prokázána nebyla.

**Klíčová slova:** *Geissospermum vellosii*, Apocynaceae, malárie, rakovina, Alzheimerova choroba, benigní hyperplazie prostaty, vellosimin, geissolosimin, flavopereirin, geissospermin

## 8 Abstract

Václavíková, K., Isolation of alkaloids of the species *Geissospermum vellosii* Allemão and study of their biological activity II., Diploma thesis, Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Department of Pharmacognosy, Hradec Králové 2020.

The genus *Geissospermum* growing in South America is important for phytochemistry because it contains indole alkaloids. This southamerican tree is in traditional treatment used for therapy of different diseases such as cognitive disorders, malaria or therapy of cancer. This plant was chosen for next investigation because of screening study that has shown very interesting activity against cholinesterases ( $IC_{50}$  AChE =  $10.51 \pm 3.03$   $\mu$ g/ml a  $IC_{50}$  BuChE =  $0.39 \pm 0.057$   $\mu$ g/ml).

The aim of this study was to get summary extract from the stem bark, its processing, isolation of at least one pure alkaloid and definition of its structure. Thanks to chromatographic methods the alkaloid extract was separated into 16 fractions, which were processed afterwards. The isolation of alkaloids was from the fraction GV-8, which was separated by flash chromatography and following purification of isolated alkaloids by thin layer chromatography. The only pure alkaloid was isolated from this fraction (vellosimine), in which was tested the inhibition activity against human recombinant acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase and inhibition activity against GSK-3 $\beta$ . In comparison with standart vellosimine shown interesting inhibition against BuChE and GSK-3 $\beta$  ( $IC_{50}$  BuChE =  $11.79 \pm 0.74$   $\mu$ M a  $IC_{50}$  GSK-3 $\beta$  =  $7.18 \pm 1.12$   $\mu$ M).

In the theoretical part I deal with known biological activities discovered in the past in different alkaloids isolated from *G. vellosii*. In some diseases there is known even alkaloid responsible for carrying of the effect, in some it is not specified yet. Effectiveness of the extract from *G. vellosii* was proved in treatment of malaria (geissolosimine), ovarian, colorectal (flavopereirine), prostatic (flavopereirine) and pancreatic cancer, benign prostate hyperplasia (flavopereirine), Alzheimer disease (geissospermine) and pain treatment (12-metoxy-1-methyl-aspidospermidine). Velloimine has no proved biological activity yet.

Key words: *Geissospermum vellosii*, Apocynaceae, malaria, cancer, Alzheimer disease, benign prostate hyperplasia, vellosimine, geissolosimine, flavopereirine, geissospermine.

## 9 Citovaná literatura

- <sup>1)</sup> Camargo M. R. M., Pohlit A. M., Carneiro A. L. B., Neves Amorim R. C., Rocha L. F., Vital M. J.S.: Chemical composition, ethnopharmacology and biological activity of *Geissospermum* Allemão species (Apocynaceae Juss.). (2013). *Revista Fitos*. 8(2), 73-160.
- <sup>2)</sup> Mbenkui 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*. *Journal of Ethnopharmacology*, (2012). 139, 471-477.
- <sup>3)</sup> Yu J., Chen Q.: The plant extract of Pao pereira potentiates carboplatin effects against ovarian cancer. *Pharmaceutical Biology*, (2013). 52(1).
- <sup>4)</sup> Bemis D. L., Capodice J. L., Desai M., Katz A. E., Buttyan R.:  $\beta$ -Carboline Alkaloid-Enriched Extract from the Amazonian Rain Forest Tree Pao Pereira Suppresses Prostate Cancer Cells. *Journal of the Society for Integrative Oncology*, (2009). 7(2), 59-65.
- <sup>5)</sup> Li J. M., Huang Y. Ch., Kuo Y. H., Cheng Ch. Ch., Kuan F. Ch., Chang S. F., Lee Y. R., Chin Ch. Ch., Shi Ch. S.: Flavopereirine Suppresses the Growth of Colorectal Cancer Cells through P53 Signaling Dependence. *Cancers (Basel)*, (2019). 11(7), 1034.
- <sup>6)</sup> Dong R., Chen P., Chen Q.: Extract of the Medicinal Plant Pao Pereira Inhibits Pancreatic Cancer Stem-Like Cell In Vitro and In Vivo. *Integrative Cancer Therapies*, (2018). 17(4), 1204-1215.
- <sup>7)</sup> Araújo J. Q., Lima J. A. C., Pinto A., de Alencastro R. B. G., Albuquerque M.: Docking of the alkaloid geissospermine into acetylcholinesterase: a natural scaffold targeting the treatment of Alzheimer's disease. *Journal of Molecular Modeling*, (2011). 17(6), 1401-1412.
- <sup>8)</sup> Beljanski M.: Pao Pereira Monograph. *The Beljanski Foundation, Inc.*
- <sup>9)</sup> Sayed M., Osman D., Hamdy N., Ahmed K.: Indoles as anticancer agents. *Advances in Modern Oncology Research*, (2015). 4
- <sup>10)</sup> Malaria. *Medline plus*. [Online] 2019. [Citace: 01. 03 2020.] <https://medlineplus.gov/malaria.html>.
- <sup>11)</sup> Ovarian, Fallopian Tube, and Primary Peritoneal Cancer Prevention (PDQ®)—Health Professional Version. *National Cancer Institute*. [Online] [Citace: 01. 03 2020.] <https://www.cancer.gov/types/ovarian/hp/ovarian-prevention-pdq>.
- <sup>12)</sup> Colon Cancer Treatment (PDQ®)—Health Professional Version. *National Cancer Institute*. [Online] [Citace: 01. 03 2020.] [https://www.cancer.gov/types/colorectal/hp/colon-treatment-pdq#\\_1](https://www.cancer.gov/types/colorectal/hp/colon-treatment-pdq#_1).



- <sup>13)</sup> Prostate Cancer Treatment (PDQ®)—Health Professional Version. *National Cancer Institute*. [Online] [Citace: 01. 03 2020.] <https://www.cancer.gov/types/prostate/hp/prostate-treatment-pdq>.
- <sup>14)</sup> Pancreatic Cancer Treatment (Adult) (PDQ®)—Health Professional Version. *National Cancer Institute*. [Online] [Citace: 01. 03 2020.] <https://www.cancer.gov/types/pancreatic/hp/pancreatic-treatment-pdq>.
- <sup>15)</sup> Enlarged prostate (BHP). *Medline plus*. [Online] [Citace: 01. 03 2020.] <https://medlineplus.gov/enlargedprostatebph.html>.
- <sup>16)</sup> Reviews in Urology.: Benign Prostatic Hyperplasia: An Overview. *Department of Urology, The University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas, TX*, (2005). 7: S3-S14.
- <sup>17)</sup> Cummings J. L., Vinters H. V., Cole G. M., Khachaturian Z. S.: Alzheimer's disease Etiologies, pathophysiology, cognitive reserve, and treatment opportunities. (1998). *Neurology.org*. 51: S2-S17.
- <sup>18)</sup> Povova J., Ambroz P., Bar M., Pavukova V., Sery O., Tomaskova H., Janout V.: Epidemiological of and risk factors for Alzheimer's disease: A review. *Biomedical Papers*. 2012.
- <sup>19)</sup> Alzheimer's disease facts and figures.: *Alzheimer's Association*, (2019). 15, 321-387.
- <sup>20)</sup> Spencer C. F., Koniuszy F. R., Rogers E. F., Shavel J., Easton N. R., Kaczka E. A., Kuehl F. A., Phillips R. F., Walti A., Folkers K., Mallanga C., Seeler A. O.: Surgery of plants for antimalarial activity. (1947).
- <sup>21)</sup> Munoz V., Suvain M.: A search for natural bioactive compounds in Bolivia through a multidisciplinary approach. Part I. Evaluation of the antimalarial activity of plants used by the Chacobo Indians. *Journal of Ethnopharmacology*, (2000). 69, 127-137.
- <sup>22)</sup> Bertani S., Bourdy G., Landau I.: Evaluation of French Guiana traditional antimalarial remedies. *Journal of Ethnopharmacology*, (2005). 98, 45-54.
- <sup>23)</sup> Beljanski M.: Selective inhibition of in vitro synthesis of cancer DNA by alkaloids of beta-carboline class. *Exp Cell Biol.*, (1982). 50(2), 79-87.
- <sup>24)</sup> Lai H., Wang Y., Duan F., Li Y., Jiang Z., Luo L., Liu L., Leung E. L. H., Yao X.: Krukovine Suppresses KRAS-Mutated Lung Cancer Cell Growth and Proliferation by Inhibiting the RAF-ERK Pathway and Inactivating AKT Pathway. *Frontiers in Pharmacology*, (2018). 9, 958.
- <sup>25)</sup> Bemis D. L., Capodice J. L., Gorroochurn P.: Antiprostata cancer activity of a beta-carboline alkaloid enriched extract from *Rauwolfia vomitoria*. *International Journal of Oncology*, (2006). ISSN: 1791-2423.

- <sup>26)</sup> Hall J. L., Beljanski S. P.: Flavopereirine and alstonine combinations in treatment and prevention of prostate cancer. *Espacenet*, (2005).
- <sup>27)</sup> 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- $\kappa$ B Signaling. *Sage Journals*, (2014). 13(3), 249-258.
- <sup>28)</sup> Yu J., Drisco J.: Inhibition of pancreatic cancer and potentiation of gemcitabine effects by the extract of Pao Pereira. *Oncology reports*, (2013). 30(1), 149-156.
- <sup>29)</sup> Liu J., Fang T., Li M., Song Y., Li J., Xue Z., Li J., Bu D., Liu W., Zeng Q., Zhang Y., Yun S., Huang R., Yan J.: Pao Pereira Extract Attenuates Testosterone-Induced Benign Prostatic Hyperplasia in Rats by inhibiting 5 $\alpha$ -Reductase. *Scientific Reports*, (2019). 9.
- <sup>30)</sup> Lima J. A. S., Costa R. A., Epifânio R. G., Castro N. S., Rocha M. C., Pinto A.: *Geissospermum vellosii* stem bark: anticholinesterase activity and improvement of scopolamine-induced memory deficits. *Pharmacology, biochemistry and behavior*, (2009). 92(3), 508-513.
- <sup>31)</sup> Werner J. A. T., Oliveira S. M., Martins D. F., Mazzardo L., de F. G. Dias J. L., Lordello A. L., Obdúlio G. M., Royes L. F., Ferreira J., Santosc A. R. S.: Evidence for a role of 5-HT<sub>1A</sub> receptor on antinociceptive action from *Geissospermum vellosii*. *Journal of Ethnopharmacology*, (2009). 125(1), 163-169.
- <sup>32)</sup> Lima A. J., 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. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, (2016). 88.
- <sup>33)</sup> Lai H., a další.: Krukovine Suppresses KRAS-Mutated Lung Cancer Cell Growth and Proliferation by Inhibiting the RAF-ERK Pathway and Inactivating AKT Pathway. 2018.
- <sup>34)</sup> Memorial Sloan Kettering Cancer Center . [Online] [Citace: 26. 02 2020.] <https://www.mskcc.org/cancer-care/integrative-medicine/herbs/pao-pereira>.