UNIVERZITA KARLOVA

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA FARMAKOGNOZIE A FARMACEUTICKÉ BOTANIKY

DIPLOMOVÁ PRÁCE

BIOLOGICKÁ AKTIVITA ALKALOIDŮ Z *PEGANUM HARMALA* L. A JEJICH SEMISYNTETICKY PŘIPRAVENÝCH DERIVÁTŮ II.

Vedoucí diplomové práce: doc. PharmDr. Jakub Chlebek, Ph.D.

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

Hradec Králové, květen 2022 Martina Fejtková

CHARLES UNIVERSITY

FACULTY OF PHARMACY IN HRADEC KRÁLOVÉ

DEPARTMENT OF PHARMACOGNOSY AND PHARMACEUTICAL BOTANY

DIPLOMA THESIS

BIOLOGICAL ACTIVITY OF *PEGANUM HARMALA* L. ALKALOIDS AND THEIR SEMI-SYNTHETIC DERIVATIVES II.

Supervisor: doc. PharmDr. Jakub Chlebek, Ph.D.

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

Hradec Králové, květen 2022 Martina Fejtková

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala vedoucímu mé diplomové práce doc. PharmDr. Jakubovi Chlebkovi, Ph.D. za odborné konzultace, za všechny poskytnuté materiály, pomoc při interpretaci výsledků a za vstřícné a ochotné jednání. Dále bych ráda poděkovala PharmDr. Elišce Kohelové, Ph.D. za všechen čas, který mi věnovala během praktického zpracovávání mé diplomové práce, za všechny odborné rady a poskytnuté materiály. Dále bych chtěla poděkovat všem, kteří se zapojili do této práce, PharmDr. Daniele Hulcové, Ph.D. za změření inhibiční aktivity vůči acetylcholinesteráze a butyrylcholinesteráze, RNDr. Jaroslavu Jenčovi, Ph.D. za změření a interpretaci chromatografických spekter, doc. PharmDr. Jiřímu Kunešovi, Ph.D. z Katedry organické a bioorganické chemie za změření a interpretaci NMR spekter a nakonec celému kolektivu Katedry farmakognozie a farmaceutické botaniky za příjemné pracovní prostředí a pomoc při řešení mé diplomové práce.

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 či stejného titulu.

Tato práce byla zpracována za podpory projektu SVV 260 548 a Progres/UK Q42.

V Hradci Králové, 12. května 2022 Martina Fejtková

Obsah

1. Úvod 9

2. Cíl práce 10

3. Teoretická část 11

3.1 Alzheimerova choroba 11

3.1.1 Epidemiologie 11

3.1.2 Rizikové faktory 11

3.1.3 Prevence 11

3.1.4 Diagnostika 12

3.1.5 Klinický obraz 12

3.1.6 Patofyziologie AD 13

3.1.6.1 Amyloidní hypotéza 13

3.1.6.2 Tau hypotéza 14

3.1.6.3 Cholinergní hypotéza 14

3.1.6.4 Glutamátergní hypotéza 16

3.1.6.5 Neurozánět 17

3.1.6.6 Hypotéza oxidačního stresu 17

3.1.6.7 Aktivita prolyloligopeptidasy 18

3.1.7 Terapie 18

3.1.7.1 Inhibitory cholinesteras 18

3.1.7.2 Inhibitory NMDA receptorů 19

3.1.7.3 Huperzin A 19

3.1.7.4 Aducanumab 20

3.1.7.5 Další možnosti v terapii AD 20

3.1.7.6 Imunoterapie 22

3.2 *Peganum harmala* L. (Nitrariaceae) 23
3.2.1 Charakteristika čeledi Nitrariaceae, rod *Peganum*, *Peganum harmala* 23
3.2.2 Harmalové alkaloidy 26
3.2.2.1 Biosyntéza harmalových alkaloidů 29
3.2.2.2 Obecná fakta o harminu 29
3.2.2.3 Biologická aktivita harminu ve vztahu k Alzheimerově chorobě 30
3.2.2.4 Další biologické aktivity harminu 32
4. Experimentální část 35
4.1. Chemikálie, materiály a metody 35
4.1.1 Rozpouštědla, chemikálie 35
4.1.2 Detekční činidla 36
4.1.3 Materiál pro preparativní a analytickou tenkovrstvou chromatografii 36
4.1.4 Mobilní fáze pro preparativní a analytickou tenkovrstvou chromatografii 36
4.1.5 Izolace harminu 37
4.1.5.1 Flash chromatografie 37
4.1.6 Obecné postupy 39
4.1.6.1 Příprava a uchovávání rozpouštědel 39
4.1.6.2 Odpařování extraktů a frakcí 39
4.1.6.3 Sušení a skladování frakcí a chemicky čistých látek 39
4.1.6.4 Příprava litých desek pro preparativní tenkovrstvou chromatografii 39
4.1.6.7 Tenkovrstvá chromatografie 40
4.2 Strukturní analýza připravených derivátů 40
4.2.1 LC-MS analýza 41
4.2.2 GC-MS analýza 41
4.2.3 Hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením (ESI-HRMS analýza) 42
4.2.4 NMR analýza 42

4.3 Přípravy syntetických derivátů harminu a jejich strukturní identifikace 42
4.3.1 Příprava 9-*N*-benzylharminu 43
4.3.2 Příprava 9-*N*-(3-bromobenzyl)harminu 45
4.3.3 Příprava 9-*N*-(4-bromobenzyl)harminu 46
4.3.4 Příprava 9-*N*-(2-bromobenzyl)harminu 48
4.3.5 Příprava 9-*N*-(4-methylbenzyl)harminu 49
4.3.6 Příprava 9-*N*-(3-methylbenzyl)harminu 51
4.3.7 Příprava 9-*N*-(4-isopropylbenzyl)harminu 52
4.3.8 Příprava 9-*N*-(4-chlorobenzyl)harminu 53
4.3.9 Příprava 9-*N*-(3-chlorobenzyl)harminu 55
4.3.10 Příprava 9-*N*-(2-chlorobenzyl)harminu 56
4.3.11 Příprava 9-*N*-(3-fluorobenzyl)harminu 58
4.3.12 Příprava 9-*N*-(2-fluorobenzyl)harminu 59
4.3.13 Příprava 9-*N*-(3-methoxybenzyl)harminu 61
4.3.14 Příprava 9-*N*-(2,4-dimethylbenzyl)harminu 62
4.3.15 Příprava 9-*N*-(3,5-dimethylbenzyl)harminu 63
4.3.16 Příprava 9-*N*-(3,5-dimethoxybenzyl)harminu 65
4.3.17 Příprava 9-*N*-(3,4-dichlorobenzyl)harmin 66
4.4 Metody pro screening biologických aktivit připravených sloučenin 67
4.4.1 Stanovení inhibiční aktivity derivátů proti AChE a BuChE 67
4.4.2 Stanovení cytotoxické aktivity 67
4.4.3 Stanovení inhibiční aktivity proti GSK-3β 68
5. Výsledky 69
5.1 Příprava syntetických derivátů 69
5.2 Screening biologických aktivit 70
5.2.1 Inhibiční aktivita derivátů proti AChE a BuChE 70

5.2.2 Predikce průchodu látek přes hematoencefalickou bariéru 71
5.2.3 Inhibiční aktivita derivátů proti GSK-3β 71
5.2.4 Cytotoxická aktivita 72
6. Diskuse a závěr 73
7. Seznam použitých zkratek 77
8. Přehled obrázků 79
9. Přehled tabulek 81
10. Literatura 82
Abstrakt 91
Abstract 92

1. Úvod

Přestože žijeme v moderním světě a máme k dispozici ty nejmodernější technologie a metody, nejsme dosud schopni kompletně vyléčit některá onemocnění. Onemocnění centrálního nervového systému patří mezi hlavní zdravotní komplikace a často končí invaliditou nebo úmrtím[1]. Mezi tato onemocnění se řadí také neurodegenerativní poruchy. S rychlým nárůstem celosvětové populace a se stále se prodlužující střední délkou života se Alzheimerova nemoc stala důležitou výzvou veřejného zdravotnictví. V posledních letech je Alzheimerově nemoci věnována větší pozornost a stále více a více studií je zaměřeno na souvislosti s Alzheimerovou nemocí, především na objasnění kompletní etiopatogeneze, terapii a nové možnosti léčby[2]. V současnosti máme v České republice k dispozici několik registrovaných léčiv, mezi které se řadí inhibitory cholinesteras, jmenovitě donepezil, rivastigmin a galantamin, a dále antagonistu na NMDA receptorech, memantin. Kauzální terapie však doposud neexistuje, všechna jmenovaná léčiva tlumí pouze symptomy doprovázející onemocnění[3].

Již po staletí jsou léčivé rostliny nedílnou součástí medicíny a hrají velmi důležitou roli v léčbě nejrůznějších onemocnění. Představují potenciální zdroje pro farmaceutické přírodní produkty a stále se používají pro vývoj nových léků chemickou syntézou[4,5]. Galantamin, jeden z výše jmenovaných používaných inhibitorů acetylcholinesterasy, je alkaloid poprvé izolovaný z rostliny *Galanthus woronowi* (Amaryllidaceae). Nejen v čeledi Amaryllidaceae jsou nalézané inhibitory cholinesteras. Příkladem inhibitorů z dalších čeledí může být látka huperzin A, izolovaná z rostliny *Huperzia serrata* z čeledi Lycopodiaceae, alkaloidy corydin a corydalin izolované z *Corydalis cava* (Fumariaceae), α-solanin z rostliny *Solanum tuberosum* (Solanaceae), chelidonin z *Chelidonium majus* (Papaveraceae) a mnoho dalších nejen alkaloidních látek[6].

Harmin, poprvé izolovaný z rostliny *Peganum harmala* (Nitrariaceae), je β-karbolinový alkaloid hojně využívaný v tradiční čínské medicíně pro své komplexní spektrum farmakologických účinků. Mezi tyto účinky patří také inhibiční vliv vůči cholinesterasam, selektivnější vůči acetylcholinesterase[7]. Tato diplomová práce se věnuje a nastiňuje inhibiční efekt vůči acetylcholinesterase i butyrylcholinesterase, jak samotného harminu, izolovaného z alkaloidního extraktu *Peganum harmala*, tak jeho připravených N^9-substituovaných derivátů.

2. Cíl práce

Tato práce navazuje na předchozí studie Katedry farmaceutické botaniky, která se již dlouhodobě věnuje výzkumu v oblasti přírodních látek jako léčiv v terapii Alzheimerovy choroby. Výzkum se věnuje nejen měření biologické aktivity izolovaných přírodních substancí, tedy harminu, ale též jeho synteticky připravených derivátů, čímž se zabývá i tato práce. Hlavními cíli této diplomové práce byly:

1) Zpracování literatury na téma harmin a jeho biologická aktivita
2) Izolace harminu z *Peganum harmala* L.
3) Příprava syntetických derivátů harminu
4) Měření biologické aktivity připravených derivátů vůči AChE a BuChE
5) Vyhodnocení výsledků a napsání diplomové práce

3. Teoretická část

3.1 Alzheimerova choroba

Alzheimerova choroba (AD) je primární neurodegenerativní onemocnění[8]. Je nejčastějším typem demence na světě. Rozdělujeme ji na formu presenilní, která má časný začátek symptomatologie a formu senilní se začátkem pozdním. U presenilní formy se klinická symptomatologie objevuje do 65 roku života, u senilní naopak až po 65 roce[9].

3.1.1 Epidemiologie

Prevalence choroby, tedy počet případů onemocnění v celé populaci, prudce stoupá s věkem. Ve věku kolem 65 let se prevalence pohybuje okolo 2 %, nad 80 let je to již kolem 30 %, u žen je pak prevalence dvojnásobně vyšší než u mužů[10]. Stále se prodlužující délka života má za následek též zvyšující se počet pacientů trpících AD, která je v současnosti čtvrtou až pátou příčinou úmrtí na světě[11].

Česká alzheimerovská společnost na základě prevalenční studie udává odhad počtu lidí trpících AD na téměř 153 tisíc. Poté, co jsou lidé s demencí diagnostikováni, se odhaduje doba jejich přežití na sedm až deset let[12].

3.1.2 Rizikové faktory

Mezi rizikové faktory pro vznik AD řadíme vyšší věk a genetickou predispozici. Z genetické zátěže se jedná především o apolipoprotein E (ApoE), respektive jeho izoformu ApoE4, která navíc zvyšuje toxicitu β-amyloidu (Aβ). Lidé, kteří mají alelu ApoE4, jsou více ohroženi rozvojem AD. Z dalších genetických abnormalit se jedná například o mutaci genu kódující presenilin 1 a presenilin 2, nebo gen kódující amyloidový prekurzorový protein (APP)[10,13]. Mezi další, diskutované rizikové faktory, patří ženské pohlaví, poranění hlavy a vaskulární příhody, hypertenze, kouření, hliník a další těžké kovy a nově je uváděna též vyšší hladina sérového homocysteinu[10]. Kromě těchto zmíněných faktorů má na rozvoj AD vliv také fyzická a kognitivní aktivita, nižší vzdělání, příjem vitamínů a stravovací návyky, obezita a metabolický syndrom, diabetes mellitus, zánětlivé markery, podle některých studií též depresivní symptomy a osamělost v životě[14,15].

3.1.3 Prevence

AD je možné částečně předcházet správnou prevencí. V primární prevenci se jedná především o zdravý životní styl. Správná životospráva v kombinaci s vhodnou pohybovou

aktivitou, omezení příjmu alkoholu, abstinence kouření a omezení užívání návykových látek jsou hlavními nástroji v oblasti primární prevence. Psychosociální prevence je pak zaměřena na individuální vzdělávání, udržování kondice paměti četbou, luštěním křížovek, hrami, kulturními a dalšími aktivitami, taktéž je důležité udržovat kontakt a sociální vazby s okolím. Důležitá je také včasná diagnostika počínající demence, která je předpokladem pro včasné zahájení léčby AD[16].

3.1.4 Diagnostika

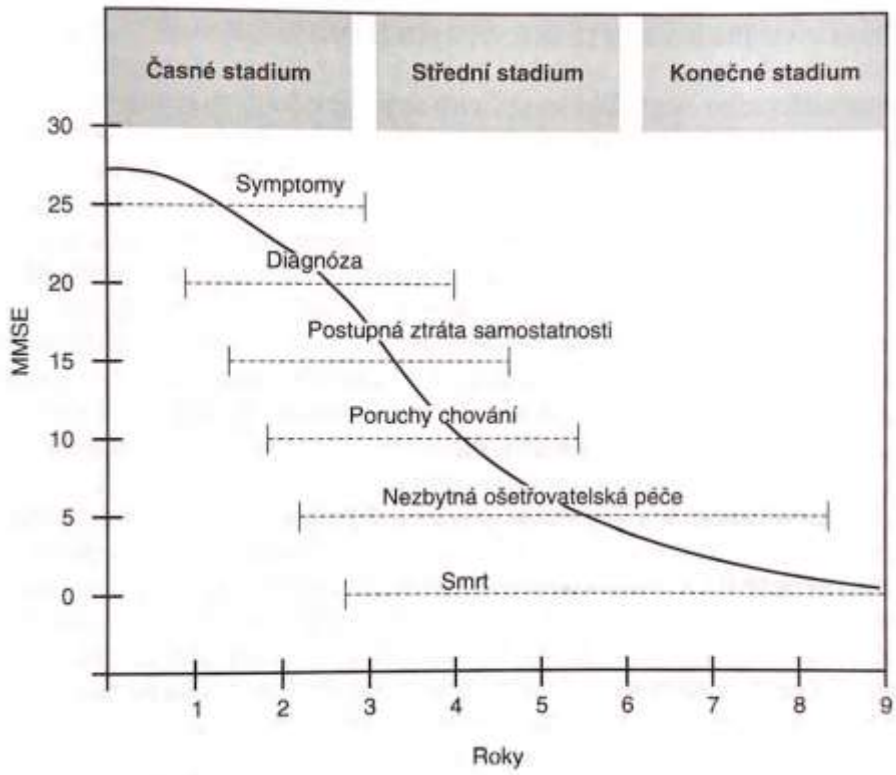
Pro stanovení diagnózy AD je významný klinický obraz. Často bývá chybně diagnostikována jako jiný typ demence. Lékař stanovuje diagnózu na základě pacientovy zdravotní historie, sleduje se také psychiatrická anamnéza a familiární předpoklady. Součástí diagnostiky je též rozhovor lékaře s osobou pacientovi blízkou [10,17].

V diagnostice se provádí různé fyzické a neuropsychologické testy. Nejčastěji využívaným je test MMSE (Mini-Mental State Examination), což je krátký kognitivní test složený z otázek zaměřených na orientaci, pozornost, paměť a jazyk. Dalším testem je Montrealský kognitivní test, což je velmi rychlý test kognice a momentálně patří k nejlepším screeningovým testům. Jedním z testů je také Test kreslení hodin, který je zaměřen na zrakově-prostorové funkce pacienta[17]. Ze zobrazovacích metod se využívá především počítačová tomografie (CT) a magnetická rezonance (MRI)[10].

3.1.5 Klinický obraz

Pro AD je typický plíživý, pomalý, nenápadný začátek, který ale trvale progreduje. Počátek onemocnění může být natolik nenápadný, že si okolí pacienta všimne projevů demence až v pozdějších stádiích. Mezi první příznaky patří drobné změny osobnosti, chování, návyků a zvyků člověka. Pacient ztrácí své zájmy, přestává být aktivní, objevují se výpadky krátkodobé paměti, dlouhodobá paměť je v počátečních stádiích zachována. Typická je zapomnětlivost, ochuzené myšlení, časté jsou též poruchy orientace v prostoru, přestože se jedná o pacientem dobře známé místo. Může dojít k redukci zájmu o sexuální život, někdy se ale naopak objeví nepřiměřené projevy sexuality. Postupně se rozvíjejí kognitivní dysfunkce, objevují se afázie, agnozie a apraxie, řeč i slovní zásoba nemocného je čím dál chudší. Častá je i inkontinence. V pozdějších stádiích nemoci se mohou objevit bludy a halucinace. V terminálních stádiích pak bývají pacienti upoutáni na lůžko s nutností neustálé péče okolí [9,18].

Kromě kognitivních dysfunkcí se objevují též poruchy nekognitivních funkcí. Jedná se o poruchy nálad, afektů, spánku i chování. Obecně se tyto poruchy označují jako behaviorální a psychologické symptomy demence[10].



Obrázek 1: Klasický průběh Alzheimerovy choroby[18]

3.1.6 Patofyziologie AD

Etiopatogeneze AD stále není zcela objasněna. Jedná se multifaktoriální onemocnění. Existuje několik hypotéz, které se snaží vysvětlit vznik a vývoj AD. Hlavní patogenetickou změnou je atrofie mozku s úbytkem neuronů, která je doprovázena řadou chorobných morfologických a biochemických změn[3].

3.1.6.1 Amyloidní hypotéza

Klíčovou roli v etiopatogenezi AD hraje tvorba a ukládání β-amyloidu (Aβ), který vzniká z tělu vlastního amyloidního prekurzorového proteinu (APP). Tento protein je za normálních podmínek proteolyticky štěpen α-sekretasou za vzniku solubilního fragmentu sAPP-α a C-terminálního fragmentu. Tyto fragmenty jsou fyziologické a pravděpodobně působí neuroprotektivně a podílí se na neuroplasticitě mozku. Toto enzymatické štěpení se označuje jako neamyloidogenní[3].

Jako amyloidogenní označujeme cestu, kdy je APP štěpen enzymem β-sekretasou za vzniku solubilních fragmentů sAPP-β a C-terminálního fragmentu, který je dále rozštěpen pomocí γ-sekretasy. Po tomto štěpení vznikají krátké peptidy označované jako Aβ, které nejsou solubilní. Nejčastěji dochází k tvorbě $Aβ_{40}$, někdy se ale vytváří mnohem toxičtější forma $Aβ_{42}$. Tyto fragmenty Aβ se ukládají extracelulárně a zde pak vytváří tzv. senilní plaky, které jsou zodpovědné za neurodegeneraci s odumíráním neuronů a tvorbu sterilního zánětu[17]. V oblasti plaků se vytváří zánětlivá reakce s uvolněním cytokinů, volných radikálů a dalších neurotoxických produktů[3].

Donedávna byly předmětem výzkumu inhibitory β-sekretasy. Jejich mechanismem účinku je snižování hladiny Aβ v mozku. Příkladem zkoumaných léčiv je verubecestat (MK-8031) nebo elenbecestat (E2609), u obou léčiv však bylo pozastaveno klinické hodnocení z důvodu nedosažení předpokládaných cílů a obav z možných nežádoucích účinků[17].

3.1.6.2 Tau hypotéza

Druhou významnou hypotézou v patogenezi AD je přítomnost intracelulárních neurofibrilárních klubek. Ta jsou tvořena párovými helikálními filamenty obsahující hyperfosforylovaný τ-protein. Fyziologickou funkcí τ-proteinu je schopnost vázat se na mikrotubuly, podporovat jejich shlukování a stabilizovat strukturu neurofilament v neuronech. Při nadměrné fosforylaci ale tuto schopnost ztrácejí. S hyperfosforylací τ-proteinu jsou spojeny zánětlivé kaskády, které mohou mít mnoho spouštěcích faktorů. Mezi tyto spouštěcí faktory, které mohou vést k patologické hyperfosforylaci, patří například oxidační stres, hyperglykemie, trauma hlavy, narušená regulace inzulinu a mnoho dalších[3,17].

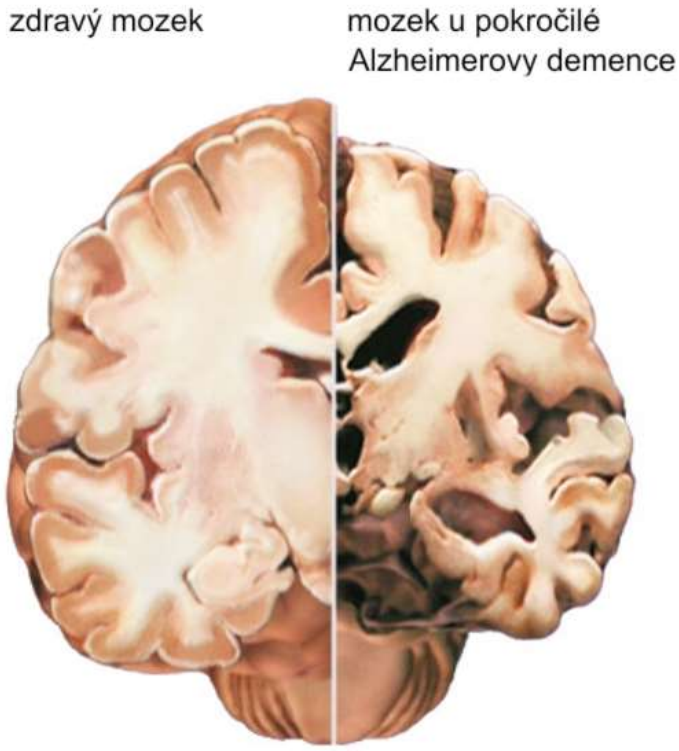
Za nejvýznamnější kinasu účastnící se hyperfosforylace τ-proteinu je považována GSK-3β (glykogensynthasa-kinasa 3β). Její aktivitu navíc významně zvyšuje Aβ. Z tohoto důvodu je výzkum zaměřen na vývoj inhibitorů GSK-3β s cílem potlačení hyperfosforylace τ-proteinu. Překážkou je ale velmi komplexní funkce GSK-3β v mnoha signálních drahách, a tak není zcela možné se vyhnout nežádoucím jevům spojeným s inhibicí tohoto enzymu. Příkladem léčiva je například memantin, který kromě jiných mechanismů inhibuje též GSK-3β[3,17].

3.1.6.3 Cholinergní hypotéza

Jednou z nejstarších teorií, pomocí které je vysvětlován vznik AD, je cholinergní hypotéza. Acetylcholin (ACh) zastává klíčovou roli v kognitivních funkcích člověka a slouží jako

přenašeč informací mezi jednotlivými buňkami, tedy neurony. Podle cholinergní hypotézy je za vznik AD zodpovědný deficit ACh a jeho snížení cholinergní transmise v nucleus basalis Meynerti. Deficit může být způsoben sníženou syntézou ACh z důvodu nižší aktivity enzymů cholinacetyltransferasy a pyruvátdehydrogenasy, které se účastní syntézy ACh. Dále může být postižen rozklad ACh pomocí cholinesteras a tím vzniká nedostatek cholinu pro novou syntézu, případně mohou být postiženy cholinergní muskarinové a nikotinové receptory, které informaci přenášenou ACh předávají dále[17,19].

ACh je rozkládán dvěma enzymy z rodiny esteras. Primárně je rozkládán acetylcholinesterasou (AChE), která je vysoce selektivní pro ACh a zajišťuje jeho hydrolýzu v synapsi na cholin a acetát. AChE se nalézá na synapsích CNS, neuromuskulárních spojení v periferním nervovém systému, ve svalech a také v membráně erytrocytů. U pacientů s AD je činnost tohoto enzymu mírně snížena. V terapii AD se využívají inhibitory AChE, které ale pacientům přinášejí pouze mírné symptomatické zlepšení a jsou určeny k léčbě mírných až středně závažných stádií AD. Druhým enzymem odbourávajícím ACh je butyrylcholinesterasa (BuChE), která je však méně specifická a je schopna metabolizovat více různých substrátů. Je nazývána také jako pseudocholinesterasa. BuChE je lokalizována hlavně v játrech. U pacientů s AD byla především v pozdějších stádiích demence pozorována zvýšená aktivita BuChE, proto by bylo vhodné hledat také inhibitory tohoto enzymu. Předpokládá se také to, že BuChE hraje určitou roli ve fosforylaci τ-proteinu a také se podílí na tvorbě Aβ a neurozánětu, které mají taktéž významný vliv v patogenezi AD. BuChE se též podílí na metabolismu tuků, sekreci inzulínu a je schopna hydrolýzy ghrelinu, což je peptidový hormon hrající důležitou roli v energetické homeostáze a metabolismu. Nicméně přesná funkce BuChE není dosud plně objasněna a tak by v případě samostatné inhibice tohoto enzymu bylo možné očekávat vedlejší účinky[17,20].



Obrázek 2: Řez zdravým mozkem (vlevo) a mozkem postiženým středně těžkou formou AD (vpravo)[3]

3.1.6.4 Glutamátergní hypotéza

Glutamát je hlavní excitační neurotransmiter v mozku, jež se za normálních podmínek podílí na synaptické plasticitě, učení a paměti. Jeho dostatečné množství je esenciální pro normální paměťové a kognitivní funkce. Váže se na glutamátové receptory, které se rozdělují do dvou tříd: metabotropní receptory, jejichž funkce je spojena s G proteiny a se systémem druhých poslů a dále ionotropní receptory, jejichž aktivací se otevírají iontové kanály. Ionotropní receptory zahrnují tři subtypy: NMDA, AMPA a kainátové receptory. Pro patogenezi AD jsou významné především NMDA a AMPA receptory. U lidí trpících AD je narušena glutamátergní neurotransmise, glutamát je uvolňován ve větším množství, působí jako silný neuronální excitotoxin, což vede k nadměrné aktivaci glutamátových receptorů. To má za následek zvýšený tok Ca^{2+} iontů do nervových buněk a zvýšenou aktivaci některých proteinkinas zodpovědných za transkripci proapoptických faktorů. Výsledkem této excitotoxicity je neuronální apoptóza[17].

3.1.6.5 Neurozánět

Dalším faktorem uplatňujícím se v roli AD je neurozánět. Zánětlivá tkáň se nachází především ve frontální a limbické části mozku, což jsou typické oblasti pro patologii AD. Hlavní roli v mechanismu neurozánětu má aktivace gliových buněk s uvolněním prozánětlivých mediátorů a volných radikálů, dále pak aktivace složek komplementu a též zvýšená aktivita cyklooxygenasy 2, což je enzym aktivující se při zánětlivém procesu[17].

Gliové buňky (mikroglie a astrocyty) se v CNS účastní fyziologických i patologických procesů. Při poškození mozkové tkáně přechází mikroglie z klidového stavu na stav aktivně-reaktivní, dostávají se na místo poškození a fungují jako imunokompetentní buňky. Uvolňují mediátory zánětu, kam patří prozánětlivé cytokiny jako interleukiny, interferony, tumor nekrotizující faktory, chemokiny, růstové faktory a další. Hlavní roli v patogenezi AD má interleukin 1 (IL-1), vytvářený aktivními mikrogliemi a dále cytokin S100β, syntetizovaný reaktivními astrocyty. IL-1 ovlivňuje cholinergní deficit, produkci Aβ i hyperfosforylaci τ-proteinu. Navíc IL-1 stimuluje též sekreci cytokinu S100β, který za patologických stavů vede k růstu dystrofických neuronů. Výše uvedené má ve finální fázi za následek buněčnou smrt a neurodegeneraci. Kromě uvolnění těchto mediátorů zánětu dochází též k aktivaci složek komplementu. V patogenezi AD je klíčovým faktorem složka C1q. Jednotlivé složky komplementu navíc způsobují aktivaci mikroglií, které přispívají k produkci Aβ. V neposlední řadě k neurozánětu přispívá enzym cyklooxygenasa 2, jejíž exprese je zvýšena při zánětlivém procesu. Klinické hodnocení dlouhodobého užívání nesteroidních antiflogistik v terapii neurozánětu, což jsou léčiva působící jako kompetitivní inhibitory cyklooxygenasy, prokazuje výrazné snížení rizika vzniku nemoci a též zabraňuje její progresi[14,17].

3.1.6.6 Hypotéza oxidačního stresu

Při narušení rovnováhy mezi tvorbou oxidačně aktivních molekul a antioxidačním systémem ve prospěch oxidantů dochází ke vzniku oxidačního stresu. Tento je považován za jeden z možných patogenetických faktorů uplatňujících se v rozvoji AD. Antioxidační systém se skládá ze dvou složek: z antioxidantů, což jsou sloučeniny, které chrání jiné biomolekuly před oxidací volnými radikály, a dále z enzymatického aparátu, který má schopnost reaktivovat antioxidanty. Pokud se naruší oxidačně redukční rovnováha, dojde k oxidativnímu poškození biologických molekul, přičemž mozková tkáň je k tomuto poškození obzvlášť citlivá, neboť v mozku je oproti jiným tkáním relativní nedostatek antioxidantů a s nimi spojených

enzymů. Hlavními oxidanty jsou reaktivní formy kyslíku a dusíku (RONS), především jejich volné radikály, které jsou produkty oxidační fosforylace v mitochondriích. Selhávání funkce mitochondrií hraje důležitou roli v patogenezi AD. Mitochondrie samy o sobě jsou velmi citlivé k oxidačnímu poškození, poškozené produkují méně ATP, ale více RONS. Výsledkem těchto dějů je pak pokles energetického metabolismu. Předpokladem je, že se v organismu postiženém oxidačním stresem AD rozvíjí léta, první klinické projevy se však dostaví až v pozdějším věku[17,21].

3.1.6.7 Aktivita prolyloligopeptidasy

Jedním z nových potenciálních terapeutických cílů pro léčbu AD je enzym prolyloligopeptidasa (POP). POP je enzym ze skupiny serinových proteas, který štěpí peptidy na karboxylovém konci prolinu. V mozku je tak zodpovědná za degradaci neuropeptidů, jako je například vasopresin, tyreoliberin, substance P, bradykinin a oxytocin. Některé z těchto neuropeptidů se podílí na kognitivních procesech učení a paměti. Bylo prokázáno, že u pacientů trpících AD byla aktivita POP abnormálně zvýšena. Prolyloligopeptidase je věnována pozornost v oblasti výzkumu, respektive její inhibici, neboť v provedených studiích po podání inhibitorů POP došlo k zablokování metabolismu výše zmíněných neuropeptidů a tím ke zlepšení kognice. Kromě toho některé studie uvádějí, že po podání POP inhibitorů došlo též k poklesu deposit Aβ. Nicméně mechanismus POP inhibitorů v procesu zlepšení učení a paměti není objasněn, stejně tak není zcela objasněna přesná fyziologická funkce prolyloligopeptidasy[17,22].

3.1.7 Terapie

V současné době nelze AD zcela vyléčit, neboť její etiologie není stále plně objasněna. Můžeme ale tlumit symptomy, které nemoc doprovázejí. Z farmakologického hlediska se používají dvě základní skupiny léčiv, a to inhibitory cholinesteras a inhibitory NMDA receptorů[17].

3.1.7.1 Inhibitory cholinesteras

První, a zároveň nejpoužívanější skupinou léčiv, jsou inhibitory cholinesteras. Jejich použití vychází z cholinergní teorie vzniku AD a jsou indikovány pro léčbu mírných až středně těžkých stádií AD. V současnosti jsou u nás registrována tři léčiva ze skupiny inhibitorů AChE, a to donepezil, rivastigmin a galantamin. Pro nežádoucí účinky, především hepatotoxicitu, byl z trhu stažen donedávna používaný takrin[17].

Donepezil je piperidinový derivát patřící do skupiny centrálně působících inhibitorů cholinesteras. Mechanismem účinku tohoto kognitiva je vysoce selektivní reverzibilní inhibice AChE, BuChE inhibuje s téměř tisíckrát menší afinitou[17,23].

Rivastigmin je karbamátový derivát, který je strukturálně podobný fysostigminu. Oproti donepezilu je rivastigmin neselektivní inhibitor AChE i BuChE. Je to tzv. pseudoireverzibilní inhibitor, tedy disociace komplexu enzym-rivastigmin je velmi pomalá. Jako jediný z používaných léčiv je rivastigmin kromě perorální formy k dostání též jako transdermální náplast. V současnosti probíhá testování také intranasální formy[17,23].

Galantamin je terciární fenantrenový alkaloid izolovaný z různých druhů rodu Amaryllidaceae, například *Galanthus nivalis* nebo *Galanthus woronovi*. Kromě izolace se však využívá i totální chemická syntéza, která je i levnější. Mechanismem účinku galantaminu je selektivní, kompetitivní a reverzibilní inhibice AChE. Kromě toho zesiluje vlastní účinek ACh na nikotinové receptory, pravděpodobně jeho vazbou na alosterické místo receptoru. Galantamin je selektivnější inhibitor AChE než BuChE. Funguje též jako modulátor nikotinového receptoru[17,23].

3.1.7.2 Inhibitory NMDA receptorů

Jediným registrovaným léčivem této skupiny je derivát amantadinu, **memantin**. Jedná se o nekompetitivního antagonistu na NMDA receptorech se středně silnou afinitou, která je závislá na napětí. Receptor NMDA zodpovídá za kontrolu synaptické plasticity a paměti. Memantin upravuje účinky excitační aminokyseliny glutamátu, která je u pacientů s AD patologicky zvýšena a může tak vést k dysfunkci neuronů. Kromě toho memantin působí také jako nekompetitivní antagonista 5-HT3 receptorů. Indikován je k léčbě středně těžkého až těžkého stádia AD. K dostání je ve formě tablet a též jako perorální roztok[17].

3.1.7.3 Huperzin A

Huperzin A byl poprvé izolován v roce 1980 z čínské rostliny *Huperzia serrata*. V tradiční čínské medicíně je *Huperzia serrata* využívána již po staletí k léčbě horečky, zánětů, pohmožděnin, otoků, schizofrenie, myastenia gravis a dalších. Používá se též při otravě organofosfáty[24,25]. Huperzin A je alkaloid chinolizidinového typu, který vykazuje účinky podobné donepezilu, rivastigminu a galantaminu. Funguje jako vysoce selektivní, reverzibilní inhibitor AChE[26]. Mezi další významné účinky huperzinu A patří schopnost chránit buňky

před působením oxidativního stresu, Aβ a glutamátu a s nimi spojenou cytotoxicitou a neuronální apoptózou, dále ochrana mitochondrií a regulace exprese apoptických proteinů. Jeho antagonistický vliv na NMDA receptorech je též dáván do souvislosti s jeho neuroprotektivními vlastnostmi[24]. V Číně je huperzin A oficiálně schválen a registrován jako léčivo používané v terapii AD[27].

3.1.7.4 Aducanumab

Zcela novou látkou na poli terapie AD se stal aducanumab, který v červnu roku 2021 schválila americká FDA jako léčivo pro terapii AD. Jedná se o plně humánní IgG1 monoklonální protilátku cílenou na Aβ, určenou pro pacienty s mírnou kognitivní poruchou nebo se středně závažnou formou demence. Je to úplně první schválený lék, který cílí přímo na mechanismy, které vedou ke vzniku onemocnění, netlumí tedy pouze symptomy nemoci. Na trh ho uvedla farmaceutická společnost Biogen pod názvem Aduhelm a podává se pouze jednou měsíčně infuzí. Nicméně jeho účinnost není prokázána zcela bez pochyb a tak bude muset lék ještě projít řadou klinických testů. FDA může povolení k nasazení aducanumabu v terapii AD během té doby zrušit[28,29,30].

3.1.7.5 Další možnosti v terapii AD

Vedle standardní terapie se využívá ještě léčba doplňková. Tato přídatná terapie ale nevychází z EBM, to znamená, že její účinnost nelze prokázat dostatečně validními důkazy[31].

Jako doplňkovou terapii můžeme označit **nootropika**, což jsou látky, které zlepšují mozkovou činnost. Působí příznivě na metabolismus neuronů, mají antihypoxický účinek, zlepšují reologické vlastnosti krve, jsou vasodilatační a eliminují volné reaktivní formy kyslíku. Mezi tuto skupinu látek řadíme standardizovaný extrakt ***Ginkgo biloba***, označovaný jako EGb 761. Tento vysoce čištěný extrakt má silné antioxidační účinky a má schopnost vychytávat reaktivní formy kyslíku. Hlavními obsahovými látkami extraktu jsou flavonoidy a terpeny (ginkgolidy a bilobalidy). Účinek tohoto preparátu byl již potvrzen studiemi, nicméně stále musí proběhnout mnoho klinických testů, aby mohl být zařazen do standardní terapie AD[31,32]. Další látkou ze skupiny nootropik je **piracetam**. Jedná se o cyklický derivát GABA, který příznivě ovlivňuje látkovou výměnu nervových buněk, zvyšuje využití glukosy a kyslíku a zlepšuje průtok krve mozkem. Dále sem patří **lecithin** nebo **pyritinol**[32].

Vitamin E je další látkou, která je dávána do souvislosti se snížením rizika vzniku AD. Jedná se o vitamin rozpustný v tucích, který má antioxidační vlastnosti a působí tak proti poškození buněk oxidativním stresem. Bylo provedeno několik studií, které dokazují souvislost mezi příjmem vysokých dávek vitaminu E a nižším rizikem rozvoje AD. Z dalších antioxidačně působících látek můžeme uvést také **selen**, **koenzym Q10**, **epigalokatechin-3-galát** nebo **vinpocetin**, které jsou v současnosti studovány[33,34].

Potenciálně využitelnou látkou je **cerebrolysin**. Jedná se o směs peptidů s neurotrofním mechanismem účinku. Klinické studie dokazují, že je cerebrolysin bezpečnou a účinnou látkou v terapii AD a mohl by zlepšit a prodloužit účinnost cholinergních léčiv[35].

Klinická hodnocení dokazují, že dlouhodobé užívání **nesteroidních antiflogistik (NSAIDS)** výrazně snižuje riziko vzniku AD a také zabraňuje její progresi[17]. NSAIDS je skupina látek, které působí analgeticky, antipyreticky a protizánětlivě. Jejich mechanismem účinku je inhibice cyklooxygenasy typu 1 a také typu 2, což je enzym účastnící se zánětlivé odpovědi. Vzhledem k tomu, že zánět je jedním z faktorů v patogenezi AD, mohly by se NSAIDS stát přínosem v terapii AD[36].

Jedním z rizikových faktorů pro vznik AD je ženské pohlaví. Incidence onemocnění u žen prudce stoupá především v postmenopauzálním věku, což nastiňuje myšlenku, že by substituční terapie **estrogeny** mohla být přínosem v prevenci AD u žen po menopauze. Nicméně tato domněnka nebyla prozatím potvrzena klinickými studiemi, navíc se předpokládá, že se AD vyvíjí dlouho před tím, než se objeví první klinické symptomy[37].

Některé studie uvádějí, že použití **statinů** snižuje riziko vzniku demence. Jejich mechanismem účinku je inhibice 3-hydroxy-3-methylglutarylkoenzym A reduktasy a tím snížení celkového cholesterolu v plazmě, snížení LDL cholesterolu a zvýšení HDL cholesterolu. Kromě toho mají statiny pleiotropní účinky, působí antioxidačně, protizánětlivě, neuroprotektivně a mají vliv na stabilizaci aterosklerotického plátu. Výsledkem toho je snížení kardiovaskulárního rizika a s tím spojených onemocnění a také snížení produkce Aβ, což může významně ovlivnit patogenezi AD[38].

Součástí terapie AD by měly být též nefarmakologické postupy. Ty zahrnují především fyzické cvičení a kognitivní trénink[23].

3.1.7.6 Imunoterapie

Imunologické přístupy je možno rozdělit na imunizaci aktivní a pasivní. Aktivní imunizace je charakterizována vpravením přímo antigenu do organismu a tělo si poté vytvoří vlastní protilátky. U pasivní imunizace je do organismu podána přímo protilátka, která interaguje s cílovou strukturou. Imunoterapie u pacientů s AD je zaměřena na snížení zátěže, která je způsobena neurotoxickými produkty, tedy Aβ a fosforylovaným τ-proteinem[17].

Při imunoterapii cílené na Aβ se kombinuje několik mechanismů, vždy se ale jedná o interakci mezi protilátkou a Aβ. Mezi tři hlavní mechanismy účinku patří rozklad Aβ, jeho následná clearance z periferie a z mozku a nakonec inhibice agregace Aβ. Na transportu Aβ se podílí neonatální Fc receptor. V současnosti probíhá klinické zkoušení několika aktivních vakcín, příkladem může být aktivní vakcína označená ACI-24, dále AFFITOPE AD01 nebo AFFITOPE AD02. Při pasivní imunizaci se podává do těla buď směs imunoglobulinů od lidských dárců, nebo monoklonální protilátky. Ze současně testovaných monoklonálních protilátek můžeme uvést například solanezumab, ponezumab, gantenerumab, nebo již výše zmíněný aducanumab, který již FDA uvedla jako schválené léčivo pro terapii AD. Ve všech zmíněných případech se jedná o humanizované monoklonální protilátky[17].

Druhým přístupem v imunoterapii AD je zacílení na τ-protein. V současnosti probíhá několik studií zaměřených na aktivní i pasivní imunizaci. Příkladem je látka označená jako AADvac1. Jedná se o aktivní imunizaci pomocí τ-peptidu, který cílí na strukturu špatně složeného τ-proteinu. Výsledky 2. fáze klinického testování prokázaly signifikantní snížení procesu neurodegenerace. Další látka, označená jako ACI-35, je aktivní lipozomální vakcína, která je v současnosti testována. Dle nejnovějších výsledků ze studií se zdá, že by imunoterapie zaměřená na τ-protein mohla mít lepší výsledky než imunoterapie cílená na Aβ. Stále je však nutnost rozsáhlého testování všech látek. Vývoj nových léčiv v terapii AD je ale nezbytný, vzhledem ke stále narůstajícímu počtu lidí trpících touto demencí[17].

3.2 *Peganum harmala* L. (Nitrariaceae)

Říše: Plantae (rostliny)

Oddělení: Magnoliophyta (krytosemenné rostliny)

Třída: Rosopsida (vyšší dvouděložné rostliny)

Řád: Sapindales (mýdelníkotvaré)

Čeleď: Nitrariaceae (šamanichovité)

Rod: *Peganum* L.

Druh: *Peganum harmala* L. - harmala stepní [39]

Obrázek 3: *Peganum harmala* L.[40] (foto prof. Lubomír Opletal)

3.2.1 Charakteristika čeledi Nitrariaceae, rod *Peganum*, *Peganum harmala*

Čeleď Nitrariaceae

Čeleď Nitrariaceae (šamanichovité) je malá čeleď náležící do řádu Sapindales (mýdelníkotvaré). Výskyt této čeledi je typický pro suché až polosuché oblasti. Tato malá rodina čítá tři rody, jmenovitě rod *Peganum*, rod *Nitraria* a rod *Tetradiclis*. Rod *Peganum* zahrnuje čtyři druhy, *Peganum nigellastrum*, *Peganum mexicanum*, *Peganum multisectum* a pro své léčebné vlastnosti dobře známou *Peganum harmala*. Bližší popis tohoto rodu bude trochu níže[41]. Dalším rodem, patřícím do čeledi Nitrariaceae, je rod *Nitraria*. Některé zdroje uvádějí třináct, některé jedenáct a některé pouze osm druhů náležících do tohoto rodu. Příkladem druhů jsou *Nitraria schoberi*, *N. sibirica*, *N. billardierei*, *N. retusa*, N. *senegalensis*,

N. komarovii, *N. roborowskii*, *N. tangutorum*, *N. sinensis* a další druhy. Všechny druhy rodu *Nitraria* jsou halofytické, to znamená, že jsou přizpůsobené životu ve solném prostředí. Tyto druhy jsou rozšířeny především v oblasti Střední Asie, jižní Evropy v oblasti Středozemí, a také na severu Afriky a Austrálie. Podobně jako u rodu *Peganum*, i u rodu *Nitraria* bylo studováno a popsáno mnoho farmakologických účinků. Extrakt z rostlin rodu *Nitraria* vykazuje antitumorové, antimutagenní, antiproliferativní, antioxidační, antimikrobiální, antivirové, hypotenzní, kardioprotektivní, hepatoprotektivní, hypoglykemické a lipidy snižující účinky. Extrakt působí i proti únavě. Z široké škály obsahových látek jsou v rostlinách rodu *Nitraria* nejvíce zastoupené alkaloidy a flavonoidy[41,42,43,44]. K rodu *Tetradiclis* patří jediná rostlina, a to *Tetradiclis tenella*, která je rozšířena především na Blízkém Východě[41].

Rod *Peganum*

Peganum L., patřící nově do rodiny Nitrariaceae, zahrnuje čtyři hlavní druhy (některé zdroje uvádí šest druhů), které jsou široce rozšířené od teplých oblastí po subtropické pásmo. Nejznámější a také nejstudovanější z těchto čtyř druhů je *Peganum harmala* L. Dalšími druhy, patřící do rodu *Peganum*, jsou *Peganum mexicanum, Peganum nigellastrum* a *Peganum multisectum*. Areál zasahuje od Středozemí přes Blízký Východ a Střední Asii až k Číně a Mongolsku, druhotně se rostliny vyskytují také na západě Severní Ameriky, v Mexiku a na jihovýchodě Austrálie[45,46].

Jedná se o vytrvalé, divoce rostoucí byliny nebo keře, které dorůstají až do výšky jednoho metru. Listy jsou dužnaté, střídavé, celokrajné nebo mnohočetné až dlanité, někdy jsou přítomny pseudopalisty. Květy jsou pětičetné (výjimečně čtyřčetné), oboupohlavné, okvětní lístky jsou bílé až nažloutlé, tyčinek bývá 8-15 s dlouhými nitkami, semeník je kulovitý, s 3-4 komůrkami, které obsahují velké množství vajíček. Plodem je tobolka s mnoha semeny. Rostou v polosuchých aridních oblastech, na kamenitých svazích, ve stepních areálech a písčitých půdách[46,47].

V tradiční čínské medicíně se rostliny rodu *Peganum* využívají například k léčbě kašle, hypertenze, diabetu, astma, žloutenky, koliky a mnoho dalších onemocnění. V některých oblastech Asie a severní Afriky lidé věří, že rostliny fungují jako amulet proti zlu. Taktéž se využívají silice, které mají vysoký obsah monoterpenů, seskviterpenů, eugenolu, a také alkaloidů. Nejvíce využívaným druhem je právě *Peganum harmala* L.[46,47].

Peganum harmala

Peganum harmala, nazývaná také jako harmala, Syrská růže nebo divoká růže, je vytrvalá bylina až keř, vysoká až jeden metr, s krátkými plazivými kořeny, s bohatě větvenou lodyhou a bílými květy. Plodem je tobolka obsahující velké množství semen. Typické pro její výskyt jsou polosuché oblasti, roste na kamenitých svazích, písčitých půdách a ve stepních oblastech[48]. Široce rozšířena je od Středozemí přes oblast Blízkého Východu, velmi dobře známá a využívaná je v Íránu, v oblasti Střední Asie až po Mongolsko a Čínu, také na severu Afriky. Druhotně byla rozšířena také do západní části Severní Ameriky, do Mexika a jihovýchodní Austrálie[45,48,49].

Obsahové látky v jednotlivých částech rostliny jsou velmi rozmanité. Za farmakologické účinky jsou zodpovědné především alkaloidy, které jsou nejvíce zastoupené převážně v semenech a kořenech harmaly. *Peganum harmala* obsahuje dvě řady alkaloidů. Prvním typem jsou β-karbolinové alkaloidy. Druhým typem alkaloidů jsou chinazolinové alkaloidy. Obě zmíněné řady alkaloidů budou podrobněji popsány níže [47,50]. Mezi další bioaktivní metabolity rostliny patří flavonoidy, příkladem jsou akacetin, kvercetin nebo kempferol. Dalšími obsahovými látkami jsou antrachinony, příkladem budiž peganon. Z dalších metabolitů můžeme jmenovat triterpenoidy, fenylpropanoidy, oleje, sacharidy jako je fruktosa či glukosa, dále široké spektrum aminokyselin, například aspartát, glutamát, serin, threonin, arginin, glycin, alanin, valin, lysin, methionin a mnoho dalších aminokyselin esenciálních i neesenciálních. Vyskytují se zde také mastné kyseliny, například kyselina olejová, kyselina palmitová, kyselina stearová, kyselina linolová a další. Dále steroly, příkladem je β-sitosterol nebo lanosterol, stopové prvky jako je železo, mangan, měď, zinek či vápník, dále vitamin C, proteiny, karoteny a velké množství dalších obsahových látek[47].

Peganum harmala má již dlouholeté místo v tradiční čínské medicíně. Pro své široké spektrum účinků je hojně využívána k léčbě nejrůznějších onemocnění. Používá se například v léčbě astma, koliky, lumbaga nebo žloutenky, také jako stimulační emenagogum. Plody jsou využívány v lidové medicíně pro své analgetické a antiseptické účinky. Kromě toho jsou plody používány také pro zisk červeného barviva. V západní části Asie lidé pálí semena, neboť věří, že kouř ze semen je ochrání před voodoo. Četné studie popisují účinky na CNS. Jsou zmiňovány účinky antidepresivní, anxiolytické, antikonvulsivní, sedativní a halucinogenní, popsány byly též účinky antiparkinsonické a účinky vztažené k AD. Velké spektrum farmakologických aktivit

zahrnuje účinky antivirové, antibakteriální a antifungální, antiprotozoální, insekticidní, antiseptické, analgetické, antinociceptivní, antioxidační a protizánětlivé, dále hepatoprotektivní, vasorelaxační a antihypertenzní, antispasmodické a antihistaminové. Taktéž se rostlina využívá k léčbě malárie a hojení ran. Hypoglykemický efekt je využíván v léčbě diabetes mellitus. Využívá se též imunomodulační a protinádorový potenciál, lidově je rostlina využívána k léčbě nádorového onemocnění trávicího traktu[47,50,51]. Je také považována za kontraceptivní a abortivní [52]. Některé farmakologické účinky budou popsány níže.

Navzdory širokému terapeutickému využití harmaly má rostlina i určitou toxicitu. Bylo popsáno několik případů intoxikace u lidí i zvířat vyvolané harmalou. Po požití extraktu nebo infuze ze semen se objevují různé toxické symptomy. Ty se mohou projevit jako neurosmyslové poruchy, vizuální halucinace, psychomotorická agitace, tremor, ataxie nebo zvracení. Mohou se objevit i kardiovaskulární poruchy jako například bradykardie nebo nízký tlak krve. Extrakt z *Peganum harmala* může vyvolat také paralýzu, křeče nebo poškození jater[53]. Bylo prokázáno, že za toxické účinky harmaly jsou zodpovědné alkaloidy[54].

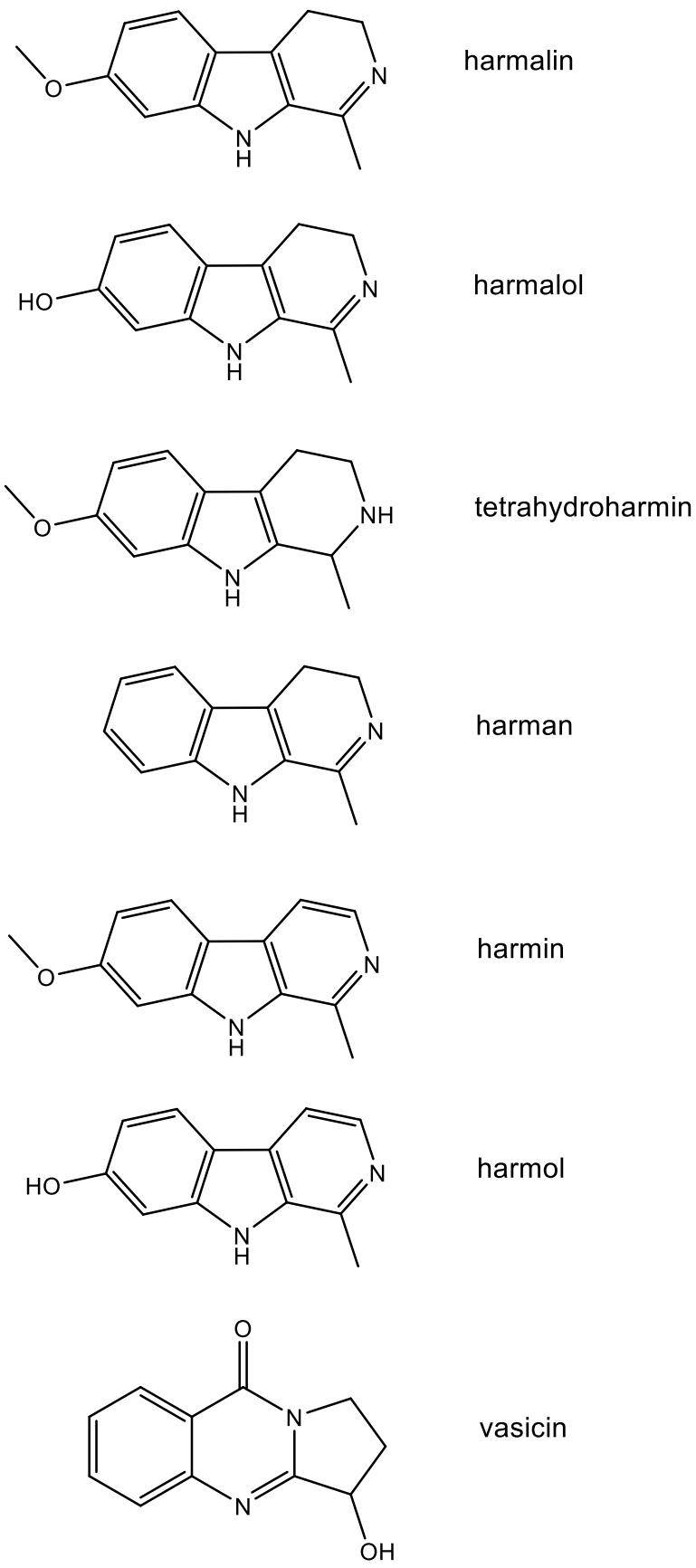
3.2.2 Harmalové alkaloidy

Alkaloidy obecně jsou velká skupina sekundárních metabolitů vyskytujících se v přírodě[54]. Jak již bylo popsáno výše, *Peganum harmala* obsahuje dva typy alkaloidů. Prvním typem jsou β-karbolinové alkaloidy, kam patří například harmin, harmalin, harmal, harmol, harmalol, tetrahydroharmin, isoharmin, dále peganin, isopeganin, dipeganin, deoxypeganin a mnoho dalších. Druhým typem alkaloidů jsou chinazolinové alkaloidy, mezi něž se řadí například vasicin, deoxyvasicin, vasicinon, deoxyvasicinon a další[47]. Struktury hlavních alkaloidů harmaly jsou uvedeny na obrázku 4.

β-karbolinové alkaloidy jsou tricyklické indolové alkaloidy připomínající tryptaminy. Za farmakologické, ale též toxikologické účinky harmaly jsou zodpovědné právě alkaloidy[4]. Harmalové alkaloidy vykazují velmi široké spektrum farmakologických aktivit. Mají vliv na kardiovaskulární systém, na centrální i periferní nervový systém, na gastrointestinální a endokrinní systém, projevují též širokou antimikrobiální aktivitu. Alkaloidy vykazují také antineoplastický efekt. Tyto sloučeniny jsou známé i pro svůj psychoaktivní potenciál - mohou vyvolat halucinace, excitaci. β-karbolinové alkaloidy mají schopnost se vázat na opioidní, dopaminové, GABA, serotoninové, benzodiazepinové a imidazolinové receptory v CNS a právě tímto způsobem jsou zodpovědné za mnoho farmakologických účinků. Alkaloidy působí

neuroprotektivně a vykazují i silný inhibiční efekt vůči monoaminooxidasam, což z nich činí potenciální léčiva pro terapii některých onemocnění, jako je například deprese, Parkinsonova nemoc nebo AD[48]. Tetrahydroharmin se chová jako slabý inhibitor zpětného vychytávání serotoninu[55]. Harmin a harmalin ovlivňují také cytochrom P450. Oba alkaloidy zvyšují expresi izoforem CYP1A2, CYP2C19 a snižují expresi CYP2B6 a CYP2E1, působí také jako selektivní inhibitory CYP3A4 a CYP2D6, což může ovlivnit metabolismus látek, které jsou substráty zmíněných izoforem enzymu[48,56]. β-karbolinové alkaloidy působí také jako „scavengery" reaktivních forem kyslíku (ROS)[57].

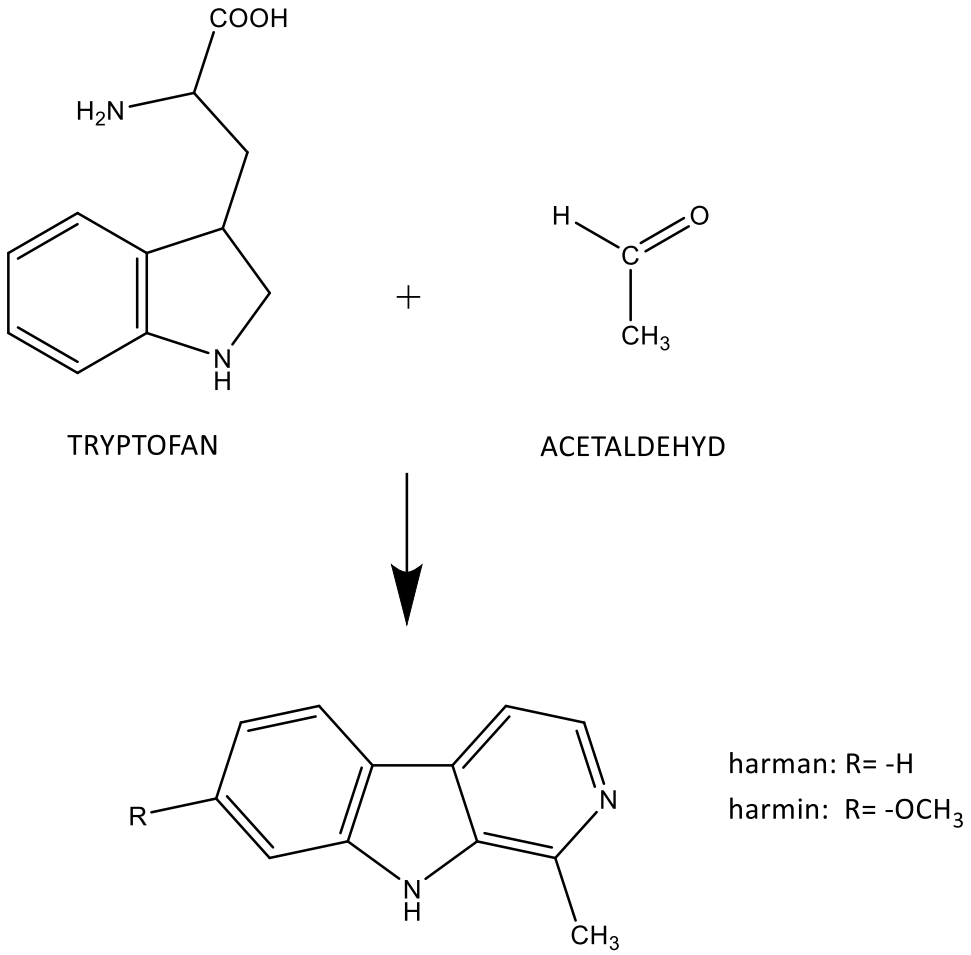
Harmalové alkaloidy nenajdeme pouze v druhu *Peganum harmala,* ale též v ostatních druzích rodu *Peganum*, tedy *Peganum nigellastrum*, *Peganum mexicanum* a *Peganum multisectum*. Dále byly harmalové alkaloidy identifikovány také v rostlině *Banisteriopsis caapi* (Malphighiaceae), která je známá pod názvem ayahuasca[58]. Ayahuasca je psychoaktivní nápoj vyrobený z kůry *Banisteriopsis caapi*, která je bohatá na β-karbolinové harmalové alkaloidy, a z listů keře *Psychotria viridis*, obsahující *N,N*-dimethyltriptamin[55]. Harmin a harmalin byly též nalezeny v menším množství v rostlinách tabáku, mučenky a také v křídlech několika nymfalických motýlů[58]. Některé z alkaloidů, například harmin, harmalin a norharman, mohou být přítomny v těle jako endogenní složky. Jejich vysoká plazmatická koncentrace byla zaznamenána u alkoholiků, kuřáků, drogově závislých jedinců a u pacientů s Parkinsonovou chorobou, předpokládá se tedy určitá souvislost mezi těmito alkaloidy a výskytem různých problémů v CNS[48].



Obrázek 4: Struktury hlavních alkaloidů z *Peganum harmala*[48]

3.2.2.1 Biosyntéza harmalových alkaloidů

Biosyntéza harmalových alkaloidů vychází z aminokyseliny tryptofanu a jeho dekarboxylačního produktu tryptaminu. Jejich základní strukturu tvoří indol[59]. V lidském těle se mohou tvořit z tryptaminu nebo serotoninu kondenzací s aldehydy či *R*-ketokyselinami. Tyto indolové alkaloidy se vyznačují tricyklickým kruhovým systémem ve svém skeletu označovaným jako β-karbolinový kruh[60,61].



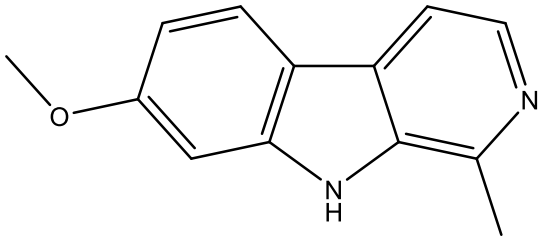
Obrázek 5: Zjednodušené schéma syntézy β-karbolinových alkaloidů[59]

3.2.2.2 Obecná fakta o harminu

Harmin, dříve nazýván také banisterin, telepathin nebo yagein, je přirozeně se vyskytující β-karbolinový alkaloid[58]. Poprvé byl izolován v roce 1847 ze semen *Peganum harmala*, později byl nalezen také v rostlině *Banisteriopsis caapi*. Jeho struktura však byla popsána až o mnoho let později, v letech 1900-1920[62]. Chemicky se jedná o 7-methoxy-1-methyl-9H-pyrido(3,4-b)indol. Harmin je široce rozšířen v přírodě, v různých rostlinách,

hmyzu, mořských živočiších. Byl také objeven jako přirozený metabolit v potravinách rostlinného původu a v lidských tkáních[54].

Harmin se podílí na většině farmakologických účinků harmaly. Účinkuje různými mechanismy. Za aktivitu v CNS zodpovídá především methoxy skupina v poloze C^7 harminu. Je popsán jeho silný inhibiční reverzibilní vliv vůči monoaminooxidase typu A. Významně také zvyšuje uvolňování dopaminu ze striatálních buněk. Dále alkaloid funguje jako specifický inhibitor tyrosin-fosforylací regulované kinasy 1A (DYRK1A), která se dává do souvislosti se vznikem Downova syndromu. Vykazuje afinitu k imidazolinovým I_2 receptorům a k 5-HT_{2A} receptorům, reguluje expresi PPAR-γ, upreguluje glutamátový transportér GLT-1 a chová se jako inverzní agonista na benzodiazepinovém vazebném místě GABA-A receptoru[48,54,55]. Dostupné studie poukazují i na antagonistické působení alkaloidu na NMDA receptorech[58]. Popsán je také jeho inhibiční vliv vůči AChE[63]. Harmin i jeho deriváty vykazují také jistý protinádorový potenciál[64].



Obrázek 6: Harmin

3.2.2.3 Biologická aktivita harminu ve vztahu k Alzheimerově chorobě

Inhibice cholinesteras je jedním z hlavních terapeutických cílů v léčbě AD. V současnosti se používají inhibitory AChE k terapii mírné až středně závažné formy AD[17]. Harmin je označován za inhibitor AChE. Provedené studie *in vitro* a *in vivo* prezentují, že harmin je schopen procházet přes hematoencefalickou bariéru a interagovat a inhibovat AChE. Toto zjištění naznačuje, že by harmin mohl být potenciálním vhodným lékovým kandidátem pro terapii AD[63]. Cholinergní hypotéza však poukazuje na významný vliv také BuChE, především v pozdějších stádiích onemocnění, kdy její aktivita stoupá a nahrazuje roli AChE. Z tohoto hlediska by bylo ideální nalézt látku s duálním inhibičním účinkem vůči AChE i BuChE[7].

Harmin je silným reverzibilním inhibitorem monoaminooxidasy (MAO), konkrétně typu A. Existují dvě izoformy MAO, typ A a typ B, které se od sebe liší na základě substrátové a inhibitorové specifity a také tkáňové distribuce. MAO je flavoenzym, který katalyzuje oxidativní deaminaci některých neurotransmiterů, především katecholaminů, například noradrenalinu, adrenalinu, serotoninu, dopaminu a dalších. V důsledku zvýšené hladiny MAO ale během této biochemické reakce vznikají vedlejší toxické produkty, jako jsou peroxid vodíku, aldehydy nebo amoniak. Tyto neurotoxické produkty mohou následně vést ke zvýšení množství reaktivních forem kyslíku a k oxidačnímu stresu, což je jeden z hlavních patogenetických faktorů hrající roli v rozvoji AD i jiných neurodegenerativních onemocnění. Kromě toho, aktivovaná MAO přispívá k agregaci Aβ a podílí se také na agregaci neurofibrilárních klubek a kognitivní destrukci prostřednictvím cholinergního poškození neuronů a poruchy cholinergního systému. Kombinace těchto mechanismů pak přispívá k rozvoji AD[5,54]. Bylo prokázáno, že monoaminový neurotransmiterový systém hraje významnou roli v kognitivních funkcích, obzvlášť v procesech paměti, pozornosti, orientace, chování i emocích. MAO je prezentována jako jeden ze základních lékových cílů pro léčbu AD a její inhibice by tak mohla přinést zlepšení jmenovaných kognitivních funkcí a tím přispět k redukci symptomů AD[5]. Extrakt ze semen a kořenů *Peganum harmala* prokázal signifikantní inhibiční efekt vůči MAO-A a tento inhibiční efekt je přisuzován právě harminu, u extraktu ze semen též harmalinu. Inhibiční efekt harminu byl charakterizován jako kompetitivní a především reverzibilní, což činí harmin potenciálním léčivem pro terapii neurodegenerativních onemocnění[48]. Přestože je inhibiční efekt harminu selektivní vůči MAO-A, pozornost je věnována také přípravě harminových derivátů, které by vykazovaly inhibiční potenciál i vůči MAO-B, neboť MAO-B je, podle dostupných studií, nadměrně exprimována v mozku pacientů s AD a je spojena s poškozením kognitivních funkcí. Navíc, se zvyšujícím se věkem stoupá koncentrace MAO-B a tím i její aktivita. Proto je také MAO-B od nedávna považována za možný terapeutický cíl pro léčbu AD[5,54].

β-karbolinové alkaloidy mají schopnost vychytávat reaktivní formy kyslíku (ROS). Studie provedené na zvířecích modelech ukazují, že harmin zvyšuje aktivitu superoxiddismutasy a katalasy, což jsou enzymy podílející se na metabolické degradaci ROS. ROS mají schopnost poškodit různé molekuly, včetně lipidů, proteinů, sacharidů i DNA. Mozek je obzvlášť citlivý k poškození způsobené těmito radikály, neboť má pouze omezenou

antioxidační kapacitu. Oxidační stres je považován za jeden ze základních mechanismů vzniku AD, proto může být antioxidační působení harminu na tomto poli zajímavým cílem pro další studie[17,57,65].

Harmin působí jako silný ATP-kompetitivní inhibitor enzymu DYRK1A. Nadměrná exprese DYRK1A se podílí na defektním neurálním vývoji u Downova syndromu, ale také na amyloidní patologii a fosforylaci τ-proteinu jak u Downova syndromu, tak u AD[55]. Inhibice této kinasy by mohla poskytnout příležitost terapeuticky zasáhnout při nástupu nebo progresi τ-patologie u AD[66].

Jednou z teorií vzniku AD je glutamátergní hypotéza. U lidí trpících AD je narušena glutamátergní neurotransmise, jejíž výsledkem je neuronální smrt. V praxi je využíváno pouze jedno léčivo, nekompetitivní antagonista na NMDA receptorech, memantin[17]. Existují studie o tom, že harmin působí taktéž jako antagonista NMDA receptorů. Na zvířecích modelech byly provedeny testy kombinující memantin a harmin, které se zaměřily na farmakokinetické i farmakodynamické interakce mezi dvěma uvedenými sloučeninami. Na základě výsledků se předpokládá, že by tyto dvě látky v kombinaci mohly rozšířit terapeutické působení na AD, nicméně je stále potřeba rozsáhlého testování k potvrzení této teorie[2].

3.2.2.4 Další biologické aktivity harminu

Kromě již výše zmíněných má harmin velké spektrum dalších farmakologických účinků, pro které je *P. harmala* hojně využívána. Jedná se o účinky antibakteriální a antifungální, insekticidní, antivirové, antidiabetické, vasorelaxační, antioxidační a protizánětlivé. Vykazuje též účinky protinádorové a hepatoprotektivní[67]. Některé účinky jsou podrobněji popsány níže.

Antibakteriální aktivita byla popsána v různých částech rostliny *P. harmala,* nejsilnější účinek je však v extraktu ze semen a kořenů. Extrakt vykazuje antibakteriální účinky proti gram pozitivním bakteriálním druhům, například *Bacillus anthracis*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* nebo *Streptococcus pyogenes.* Z gram negativních bakteriálních druhů působí například proti *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis* a *Proteus vulgaris*, *Escherichia coli* nebo *Klebsiella pneumonie*[48,50]*.* Mechanismus antibakteriálního účinku spočívá v interkalaci do DNA mikroorganismů[50].

P. harmala vykazuje též výraznou **antivirovou** aktivitu. Šestnáct různých extraktů bylo testováno v účinnosti proti lidskému herpes simplex viru typu 2 (HSV-2), který způsobuje

genitální onemocnění, jenž mohou být chronické a perzistující. Nejvyšší virucidní účinnost vykazoval methanolický extrakt ze semen rostliny. Jako aktivní molekula extraktu byl prokázán právě harmin, který kompletně inhibuje replikaci HSV-2 a též zabraňuje adsorpci a penetraci viru do hostitelské buňky. V provedených studiích byl methanolový extrakt *P. harmala* testován taktéž spolu s acyklovirem, antivirovým lékem používaným v terapii HSV-2 infekcí, kde harmin prokazoval synergistické působení s acyklovirem. Tato kombinace by mohla být novým potenciálním přístupem v terapii genitálních herpes infekcí[68].

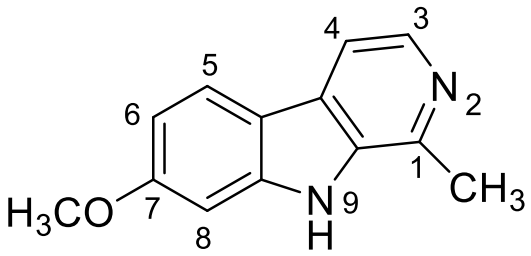
Pro svůj **vasorelaxační** efekt je rostlina využívána k léčbě hypertenze a srdečních onemocnění. Vasorelaxační efekt je popsán především u harminu, harmalinu, harmanu a harmalolu, z nichž nejsilnější efekt vykazuje právě harmin. Mechanismus tohoto účinku je dán interakcí s α1-adrenergními receptory v cévním hladkém svalu, a kromě toho má harmin též vliv na uvolňování oxidu dusnatého z endoteliálních buněk[48].

Pro své **antioxidační** a **protizánětlivé** působení je *P. harmala* taktéž hojně využívána v lidové medicíně. Na základě provedených studií se zdá být antioxidačně nejúčinnější methanolový extrakt z listů rostliny, kde je tento účinek podpořen ještě přítomností fenolických sloučenin, jako jsou flavonoidy a taniny[50,69].

Na základě provedených studií je možno usoudit, že harmin vykazuje určitý **hepatoprotektivní** efekt. V jedné z provedených studií byl sledován účinek harminu na TCDD zprostředkovanou indukci karcinogen-aktivujícího enzymu CYP1A1 v játrech a plicích myší. TCDD je široce rozšířený enviromentální chemický polutant, který vzniká například ve spalovnách odpadu, ve výrobnách herbicidů nebo při produkci kovů. Je prokázáno, že TCDD indukuje expresi CYP1A1, vysoká hladina tohoto enzymu pak vede ke zvýšené metabolizaci endogenních i exogenních chemikálií, vytváří reaktivní formy kyslíku a oxidativní stres. Výsledkem těchto dějů je poškození DNA. Provedená studie dokazuje, že harmin signifikantně snižuje TCDD zprostředkovanou indukci karcinogen-aktivujícího enzymu CYP1A1[70].

Již od starověku je *Peganum harmala* tradičně využívána pro svůj **protinádorový** efekt k léčbě rakoviny a nádorů v různých částech světa. Například v Maroku je používán prášek ze semínek harmaly k léčbě kožních nádorů[48]. V Íránu je pak využívána směs semen *P. harmala* a listů *Dracocephalum kotschyi Boiss*, označována jako Spinal-Z, k léčbě různých typů nádorových onemocnění, například k terapii gastroezofageálního tumoru[50,71]. V posledních

letech se věnuje čím dál větší pozornost tomuto farmakologickému účinku. Vědecký zájem stoupá nejen o samotný harmin, ale též o jeho strukturně modifikované deriváty. Zkoumá se vztah mezi strukturou a farmakologickým účinkem (SAR) a také mechanismus účinku těchto potenciálních antitumorových látek. Na základě SAR bylo odhaleno, že zavedením různých substituentů do určitých pozic zvyšuje cytotoxický účinek a zároveň snižuje neurotoxicitu harmaly. Zavedením alkoxy substituentu do polohy 7 harminu zlepšuje cytotoxické působení, délka alkoxy řetězce má pak vliv na cytotoxicitu i substrátovou specifitu. *N*^{9}-alkylované deriváty harminu vykazují silnou cytotoxickou aktivitu, *N*^{2}-alkylované deriváty mají specifickou cytotoxickou aktivitu. Nejvyšší cytotoxický potenciál byl pozorován u N^{9}-substituovaných derivátů harminu. Hlavní mechanismus protinádorového účinku harminu a jeho derivátů je interkalace do DNA a inhibice topoisomerasy I, což způsobí významné strukturální změny v DNA a dojde tak k narušení její syntézy. Mezi další antitumorové mechanismy harminu a jeho derivátů patří inhibice cyklin-dependentních kinas a zablokování iniciace buněčného cyklu v G_1 fázi. Harmin také inhibuje buněčnou proliferaci a angiogenezi a indukuje buněčnou apoptózu aktivací p53 signalizační kaskády. Kromě toho má harmin schopnost upregulace exprese Fas receptoru smrti[48,72,73,74,75].



Obrázek 7: Struktura harminu

4. Experimentální část

4.1. Chemikálie, materiály a metody

4.1.1 Rozpouštědla, chemikálie

- amoniak 25% vodný roztok, p. a. (Ing. Švec Penta s.r.o., Praha) (NH_3)
- acetonitril (Ing. Švec Penta s.r.o., Praha) (ACN)
- cyklohexan, p. a. (Penta a.s., Praha, ing. Švec) (C_6H_{12})
- destilovaná voda (H_2O)
- dichlormethan, p.a. (Ing. Švec Penta s.r.o., Praha) (CH_2Cl_2)
- dimethylformamid, p. a. (Ing. Švec Penta s.r.o., Praha) (DMF)
- dusičnan bismutitý zásaditý p.a. (Lachema, Brno) ($Bi(O)NO_3$)
- ethanol 96 %, p. a. (Lihovar Chrudim, Chrudim) (EtOH)
- ethyl-acetát, p. a. (Ing. Švec Penta s.r.o., Praha) (EtOAc)
- hydrid sodný, p. a. (Ing. Švec Penta s.r.o., Praha) (NaH)
- chlorid rtuťnatý p. a. (Fisher Scientific, Pardubice) ($HgCl_2$)
- chloroform, p. a. (Ing. Švec Penta s.r.o., Praha) ($CHCl_3$)
- jodid draselný č. (Lach-Ner, Neratovice) (KI)
- kyselina mravenčí p. a. (Balex, Pardubice) (HCOOH)
- kyselina vinná p. a. (Balex, Pardubice) ($C_4H_6O_6$)
- lékařský benzin lékopisné kvality ČL 2009 (Ing. Švec Penta s.r.o., Praha) (LB)
- methanol, p. a. (Ing. Švec Penta s.r.o., Praha) (MeOH)
- tetrahydrofuran, p. a. (Ing. Švec Penta s.r.o., Praha) (THF)
- benzylbromid, ≥ 99% (Sigma Aldrich, Praha)
- 2-bromobenzylbromid, ≥ 99% (Sigma Aldrich, Praha)
- 3-bromobenzylbromid, ≥ 99% (Sigma Aldrich, Praha)
- 4-bromobenzylbromid, ≥ 99% (Sigma Aldrich, Praha)
- 3,4-dichlorbenzylbromid, ≥ 99% (Sigma Aldrich, Praha)
- 3,5-dimethoxybenzylbromid, ≥ 99% (Sigma Aldrich, Praha)
- 2,4-dimethylbenzylbromid, ≥ 99% (Sigma Aldrich, Praha)
- 3,5-dimethylbenzylbromid, ≥ 99% (Sigma Aldrich, Praha)
- 2-fluorobenzylbromid, ≥ 99% (Sigma Aldrich, Praha)
- 3-fluorobenzylbromid, ≥ 99% (Sigma Aldrich, Praha)

• 2-chlorobenzylbromid, ≥ 99% (Sigma Aldrich, Praha)

• 3-chlorobenzylbromid, ≥ 99% (Sigma Aldrich, Praha)

• 4-chlorobenzylbromid, ≥ 99% (Sigma Aldrich, Praha)

• 4-isopropylbenzylbromid, ≥ 99% (Sigma Aldrich, Praha)

• 3-methoxybenzylbromid, ≥ 99% (Sigma Aldrich, Praha)

• 4-methylbenzylbromid, ≥ 99% (Sigma Aldrich, Praha)

• 3-methylbenzylbromid, ≥ 99% (Sigma Aldrich, Praha)

4.1.2 Detekční činidla

• D_1 – Dragendorffovo činidlo podle Muniera

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

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

Zásobní roztok se připraví smícháním roztoku A a roztoku B v poměru 1:1 (v/v). Detekční roztok se připraví rozpuštěním 10 g kyseliny vinné v 50 ml destilované vody a přidáním 5 ml zásobního roztoku. Zásobní i detekční roztok se uchovávají v lednici. Pokud testovaný vzorek obsahuje alkaloidy, po nastříkání detekčního činidla se skvrny zbarví oranžově[76].

• D_2 – Mayerovo činidlo

Bylo rozpuštěno 5 g jodidu draselného v 30 ml vody, do vzniklého roztoku bylo následně přidáno 1,35 g práškovaného chloridu rtuťnatého a vzniklá sraženina byla míchána do rozpuštění. Roztok je bezbarvý nebo světle žlutý a je uchováván v chladničce při 4 °C.

4.1.3 Materiál pro preparativní a analytickou tenkovrstvou chromatografii

• hliníková deska s vrstvou silikagelu pro TLC Silica gel 60 GF_{254} (Merck), velikost 20 × 20 cm, s hloubkou vrstvy 0,2 mm

• příprava litých vrstev: Silica gel 60 GF_{254} (Merck), na desku o velikosti 15 × 15 cm bylo použito 6,5 g adsorbentu a 22,4 ml vody (28,89 mg/cm^2)

4.1.4 Mobilní fáze pro preparativní a analytickou tenkovrstvou chromatografii

• S_1 – CH_2Cl_2:MeOH:NH_3 (60:30:0,2)

• S_2 – CH_X:EtOAc:NH_3 (60:30:0,2)

• S_3 – EtOAc:MeOH:NH_3 (100:4:1,5)

4.1.5 Izolace harminu

Příprava celkového alkaloidního extraktu a izolace harminu pomocí flash chromatografie nebyla náplní mé diplomové práce. Alkaloidní extrakt připravil doc. PharmDr. Jakub Chlebek, Ph.D. a separaci pomocí flash chromatografie provedla PharmDr. Eliška Kohelová, Ph.D.

Na Katedře farmaceutické botaniky bylo 300 g semen z rostliny *Peganum harmala* rozemleto v mlýnku. Takto rozdrobněný rostlinný materiál byl nejprve odtučněn LB v Soxhletovém extraktoru (1 l) po dobu 2 hodin. Takto odtučněný materiál byl 2 × extrahován dvojnásobným množstvím 95% EtOH za varu pod zpětným chladičem po dobu 30 minut. Spojené extrakty byly následně zfiltrovány a odpařeny za vzniku odparku ve formě hnědého sirupu. Tento sumární ethanolický extrakt byl postupně rozpuštěn ve 2 litrech 5% HCl a naředěn destilovanou vodou na 4 l roztoku o pH ~ 2. Kyselý roztok byl zfiltrován přes vliselín a posléze přes vrstvu křemeliny Celite 535. Vrstva křemeliny byla ještě před filtrací promyta destilovanou vodou. Kyselý vodný roztok byl alkalizován 10% vodným roztokem Na_2CO_3 na pH 9–10 a vytřepán 4 × 2 litry $CHCl_3$ za průběžné kontroly vodné fáze Mayerovým činidlem. Organická fáze byla odpařena za zisku sumárního alkaloidního extraktu konzistence hnědého sirupu. Takto připravený primární alkaloidní extrakt byl dále přečišťován vytřepáváním. Odparek byl rozpuštěn v 3 litrech 2% HCl a výsledný roztok byl zfiltrován přes vrstvu křemeliny Celite 535, jež byla následně promyta 1 litru destilované vody. Vodná fáze byla zbavena rezidua tuku 2 × 2 l Et_2O, alkalizována Na_2CO_3 na pH 9–10 a vytřepána 4 × 1,5 litry $CHCl_3$. Kvantitativní extrakce alkaloidů byla průběžně kontrolována pomocí Mayerova činidla. Chloroformový výtřepek byl vysušen pomocí bezvodého Na_2SO_4. Bylo získáno 18 g alkaloidního výtřepku, ve kterém se nacházela směs β-karbolinových i chinazolinových alkaloidů. Tento alkaloidní extrakt byl následně podroben separaci flash chromatografii.

4.1.5.1 Flash chromatografie

Extrakt o hmotnosti 18 g byl naadsorbován na neutrální oxid hlinitý, byla připravena triturace o hmotnosti 72 g. Pro separaci alkaloidu byla použita skleněná kolona (49 × 460 mm) naplněná oxidem hlinitým (hmotnost adsorbentu 900 g, velikost částic 32–63 μm). Před vlastní separací byla kolona kondicionována 30 min při průtoku 120 ml/min a složení mobilní fáze

CH_2Cl_2:NH_3 (100:0,2). Jako mobilní fáze byly použity CH_2Cl_2:NH_3 (100:0,2 %) jako MF A, MeOH:NH_3 (100:0,2 %) jako MF B. Průtok mobilní fáze (MF) byl po celou dobu analýzy 120 ml/min, celková doba analýzy byla 60 min. Eluční program byl naprogramován skokově podle následujícího schématu (v/v): 0–10 min (0 % MF B), 10–20 min (1 % MF B), 20–30 min (2 % MF B), 30–40 min (3 % MF B), 40–50 min (5 % MF B) a 50–60 min (10 % MF B). Objem frakce činil 250 ml. Průběh chromatografie byl detekován UV zářením při čtyřech vlnových délkách (λ1 = 259 nm, λ2 = 274 nm, λ3 = 321 nm, λ4 = 376 nm) a pomocí kontrolní TLC s použitím mobilní fáze CH_2Cl_2:MeOH:NH_3 (60:30:0,2). Na základě kontrolní TLC bylo 87 najímaných frakcí spojeno do 4 podfrakcí.

Tabulka 1: Rozdělení frakcí pomocí flash chromatografie

Označení	**Spojené frakce**	**Množství**	**Popis**	**Obsah**
A	5 - 31	29,9 mg	Hnědá amorfní hmota	Nealkaloidní látky
B	32 - 34	112 mg	Bílý krystalizující	Deoxyvasicinon
C	35 - 76	15,1 g	Nažloutlý krystalizující	Směs 5 alkaloidů
D	77 - 78	284 mg	Bílá amorfní hmota	Vasikol

Největší spojená frakce 35-76 označená jako frakce C byla opětovně podrobena flash chromatografii. Frakce C (15,1 g) byla adsorbována na oxid hlinitý, byla připravená triturace o hmotnosti 60 g. Pro separaci byla použita skleněná kolona (49 x 460 mm) naplněná oxidem hlinitým (hmotnost adsorbentu 900 g, velikost částic 32–63 µm). Před vlastní separací byla kolona kondicionována 50 min při průtoku 60 ml/min a složení mobilní fáze CH_2Cl_2:NH_3 (100:0,2 %). Jako mobilní fáze byly použity CH_2Cl_2:NH_3 (100:0,2 %) jako MF A, MeOH:NH_3 (100:0,2 % jako MF B. Po celou dobu analýzy byl průtok MF 50 ml/min, celková doba separace byla 3h 30 min. Eluční gradient byl naprogramován následovně (v/v): 0–30 min (0 % MF B), 30–180 min (0-100 % MF B) a 180–210 min (100 % MF B). Průběh chromatografie byl detekován UV zářením při čtyřech vlnových délkách (λ1 = 259 nm, λ2 = 274 nm, λ3 = 321 nm, λ4 = 376 nm) a pomocí kontrolní TLC s použitím mobilní fáze CH_2Cl_2:MeOH:NH_3 (60:30:0,2). Na základě kontrolní TLC bylo 87 najímaných frakcí spojeno do 5 podfrakcí.

Tabulka 2: Rozdělení frakce C z flash chromatografie

Označení	Spojené frakce	Množství	Popis	Obsah
F1	31 - 35	982 mg	Bílý krystalizující	Převážně harmin
F2	36 - 37	1,88 g	Bílý krystalizující	Harmin a nečistoty nealkaloidní povahy
F3	38 - 66	9,27 g	Nažloutlý krystalizující	Směs harmin, harmalin
F4	67 - 95	987 mg	Jasně žlutý krystalizující	Harmalin
F5	96 - 115	532 mg	Žlutý,krystalizující	Harmalin, tetrahydroharmin

Pro účely mé diplomové práce byla použita podfrakce PH-F1 (982 mg). Tato frakce byla přečištěna pomocí preparativní tenkovrstvé chromatografie za využití mobilní fáze CH_2Cl_2:MeOH:NH_3 (60:30:0,2, vyvinuto 2x). K detekci alkaloidů bylo využito Dragendorffovo činidlo. Celkem bylo izolováno 900 mg harminu, což bylo dostatečné množství pro přípravu syntetických derivátů. Syntetické deriváty byly připraveny inkorporací různých substituentů do polohy N^9 harminu.

4.1.6 Obecné postupy

4.1.6.1 Příprava a uchovávání rozpouštědel

Veškerá použitá rozpouštědla byla standardně destilována. Prvních 5 % objemu destilovaného rozpouštědla bylo odstraněno a zbývajících cca 90 % bylo vydestilováno. Předestilovaná rozpouštědla byla následně uchovávána v hnědých lahvích, které poskytují ochranu před světlem.

4.1.6.2 Odpařování extraktů a frakcí

Rozpouštědla jednotlivých alkaloidních frakcí a extraktů, které jsme získali při preparativní chromatografii, byla odpařena při 40 °C za sníženého tlaku na vakuové odparce.

4.1.6.3 Sušení a skladování frakcí a chemicky čistých látek

Odpařené frakce i připravené chemicky čisté látky byly sušeny v exsikátoru nad sušícími perlami silikagelu po dobu 24 hodin a takto vysušené byly následně skladovány v chladničce při teplotě 2-8 °C.

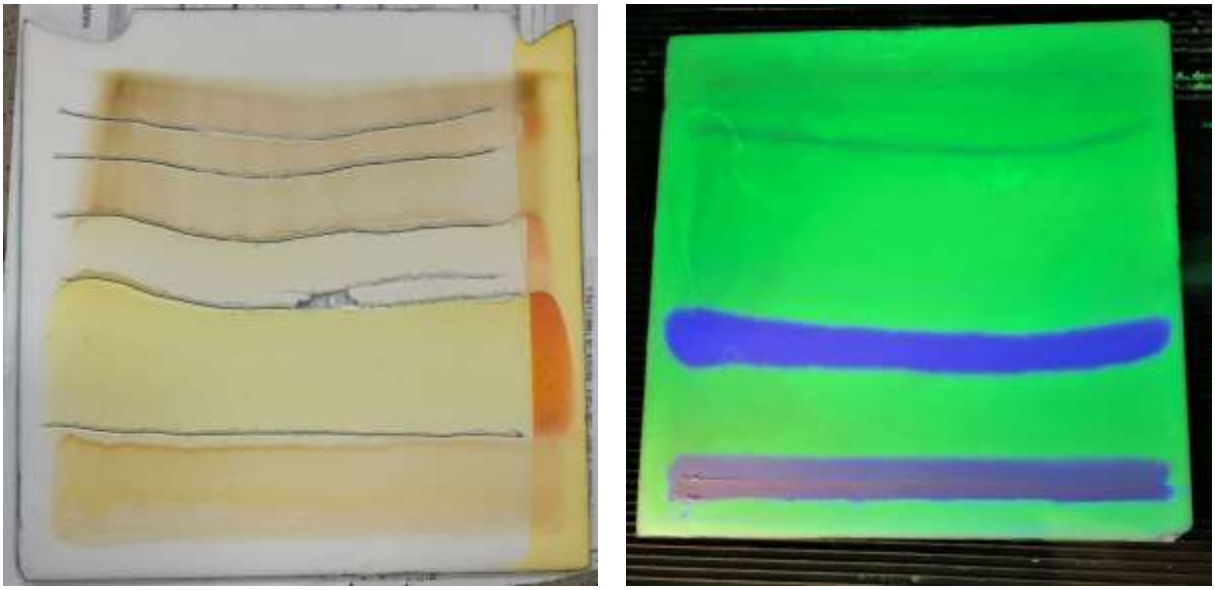
4.1.6.4 Příprava litých desek pro preparativní tenkovrstvou chromatografii

Skleněné desky o rozměru 15 × 15 cm byly EtOH očištěny od nečistot, následně na ně byla nanesena připravená suspenze silikagelu (6,5 g) a destilované vody (22 ml). Takto

připravené desky byly sušeny při pokojové teplotě po dobu minimálně 24 hodin, než byly připraveny k použití.

4.1.6.7 Tenkovrstvá chromatografie

Na komerční nebo připravené lité desky byl nanesen alkaloidní vzorek rozpuštěný v EtOH a $CHCl_3$ (1:1), deska byla umístěna do komory nasycené parami mobilní fáze a nechala se vyvíjet. Po vyvinutí se desky vyjmuly z komory, nechaly se chvíli sušit v digestoři při pokojové teplotě a následně byly vloženy pod UV lampu. Pod UV lampou byly pozorovány při vlnových délkách λ = 254 nm a λ = 366 nm. Po detekci se někdy nechaly znovu vyvinout. Oddělené zóny alkaloidního vzorku byly z desky separovány, separovaný adsorbent z desek byl smíchán s křemelinou Celite 535 a následně promyt ve směsi EtOH:$CHCl_3$ (1:1). Pomocí Dragendorffova činidla byla detekována přítomnost alkaloidů. Promytá směs byla odpařena na rotační vakuové odparce.



Obrázek 8: Průběh reakce - detekce Dragendorffovým činidlem (vlevo), detekce pod UV lampou při λ = 254 nm (vpravo)

4.2 Strukturní analýza připravených derivátů

Harmin i všechny jeho připravené deriváty byly analyzovány a verifikovány několika níže popsanými metodami. Po ověření struktury a identifikace derivátů mohla být testována jejich biologická aktivita.

4.2.1 LC-MS analýza

Ke stanovení molekulové hmotnosti nově připravených derivátů harminu byla využita LC-MS analýza. Měřilo se na kapalinovém chromatografu ve spojení s hmotnostním spektrometrem Waters Autopurification™ HPLC-MS systém (Milford, USA). Jednotlivé vzorky připravených derivátů (0,2 – 0,3 mg) se rozpustily v 1 ml MeOH čistoty LC-MS a následně byly analyzovány. Na separaci se použila kolona s reverzní fází XSelect® CSH™ C18 OBD™ (100 mm × 4.6 mm i.d.,5 µm) (Milford, USA). Jako MF A byla použita H_2O s 0,1% HCOOH), MF B obsahovala MeOH s 0,1% HCOOH). Průtok mobilní fáze byl 1 ml/min. Měření probíhalo za laboratorní teploty. Program gradientové eluce byl naprogramován následovně (v/v): 0 min 5% B, 5 min 100% B, 8,5 min 5% B, poté 1,5 minuty v počátečních podmínkách pro ekvilibraci. Optimální hodnoty parametrů ESI-MS byly: kapilární napětí (0,8 kV), teplota próby (600 °C); kuželové napětí (15 V). LC/MS hmotnostní spektra byla zaznamenána v rozmezí od 200–800 m/z. Měření probíhalo v pozitivním iontovém režimu. Eluce látek probíhala v pořadí od více polárních k méně polárním, s narůstající eluční sílou mobilní fáze. Koncentrace HCOOH byla v průběhu chromatografické analýzy konstantní.

4.2.2 GC-MS analýza

Pro identifikaci alkaloidů v extraktu byla použita GC-MS analýza. Tato analýza probíhala za pomoci plynového chromatografu Agilent 7890A GC s hmotnostním detektorem Agilent 5975. Kolonou byla DP-5 MS (30 m × 0,25 mm × 0,25 µ) od výrobce Agilent Technologies Santa Clara, Kalifornie, USA. Teplotní program byl následující: nejprve se nastavila teplota 100 °C po dobu 1 minuty, která se postupně zvyšovala o 15 °C za minutu, dokud nebyla dosažena teplota 180 °C, tato teplota se udržovala 1 minutu. Pak se rychlost zvyšování teploty zpomalila na 10 °C za minutu do dosažení teploty 300 °C, tato teplota se udržovala 12 minut. Jako nosný plyn bylo použito Helium 5.0 s rychlostí průtoku 1 ml za minutu. Nástřik byl proveden při teplotě injektoru 270 °C a splitu v poměru 1:10. Objem vzorku (MeOH roztoku alkaloidního extraktu) byl 1 µl s koncentrací 0,2 mg/ml. Detekční rozmezí bylo m/z 50-500 (hmotnost iontu lomeno jeho náboj) při teplotě detektoru 305 °C a elektronové ionizaci 70 eV. Analýza struktur alkaloidů se porovnala s dostupnými spektry v komerční knihovně spekter NIST11 (National Institute of Standards and Technology Library, USA) a s daty v literatuře. Pomocí GC-MS analýzy byla zjišťována i molekulová hmotnost vzorků, která je důležitá pro další objasnění struktury izolovaných látek. K analýze byl použit plynový

chromatograf s hmotnostní detekcí (GC-MS) Agilent (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Systém obsahuje chromatograf Agilent 7890 A s hmotnostním detektorem Agilent 5975 C MSD pracujícím v režimu elektronové ionizace při 70 eV (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA).

4.2.3 Hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením (ESI-HRMS analýza)

Hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením se využívá v případě nových látek, které dosud nebyly popsány v literatuře. Metoda byla použita pro určení přesné hodnoty nově připravených derivátů. Hmotnostní spektra byla měřena na spektrometru s vysokým hmotnostním rozlišením UHPLC Waters Acquity I-Class s ionizací elektrosprejem v kladném módu a kombinovaným analyzátorem – kvadrupól s analyzátorem doby letu Waters Synapt G7-Si. Vzorky nově připravených látek byly naředěné v EtOH a měřeny v ACN. Následně byla porovnána u každého připraveného derivátu harminu jeho zjištěná přesná hmota (m/z) s teoretickou vypočtenou přesnou hmotou.

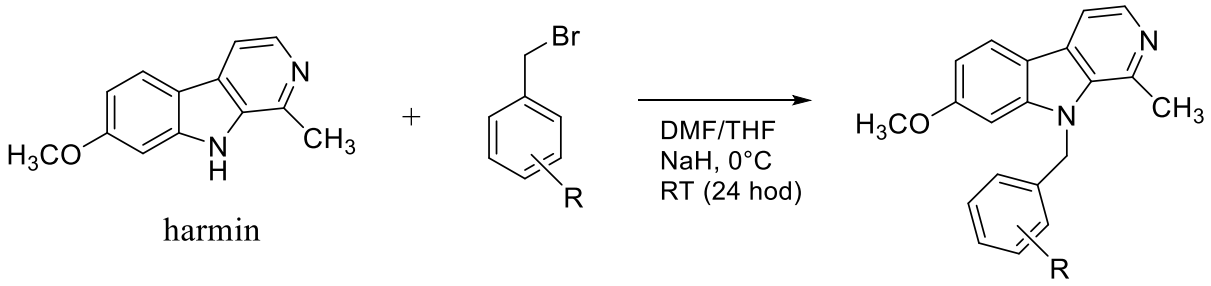
4.2.4 NMR analýza

Pro verifikaci připravených derivátů harminu byla na Katedře organické a bioorganické chemie provedena NMR strukturní analýza jednotlivých vzorků. NMR spektra byla měřena v roztocích deuterovaného chloroformu ($CDCL_3$) při teplotě 25 °C. Měření probíhalo na přístroji Varian Inova 500, který pro ^{1}H jádra pracuje při frekvenci 499,87 MHz a pro ^{13}C jádra při frekvenci 125,70 MHz. K ozařování a detekci signálu byla použita širokopásmová dvoukanálová gradientová One NMR sonda s regulací teploty. Chemické posuny byly změřeny jako hodnoty δ pars per milion (ppm) a pomocí zbytkového signálu rozpouštědla byly nepřímo vztaženy k TMS jako standardu. Hodnoty chemického posunu pro $CDCL_3$ jsou pro atomy ^{1}H δ = 7,26 ppm a pro atomy ^{13}C δ = 77,0 ppm. Získaná data jsou prezentována v následujícím pořadí: chemický posun (δ), integrovaná intenzita ^{1}H NMR spekter, multiplicita (s: singlet, d: dublet, t: triplet, q: kvartet, dd: dublet dubletů, m: multiplet, bs: široký singlet) a integrační konstanta (Hz).

4.3 Přípravy syntetických derivátů harminu a jejich strukturní identifikace

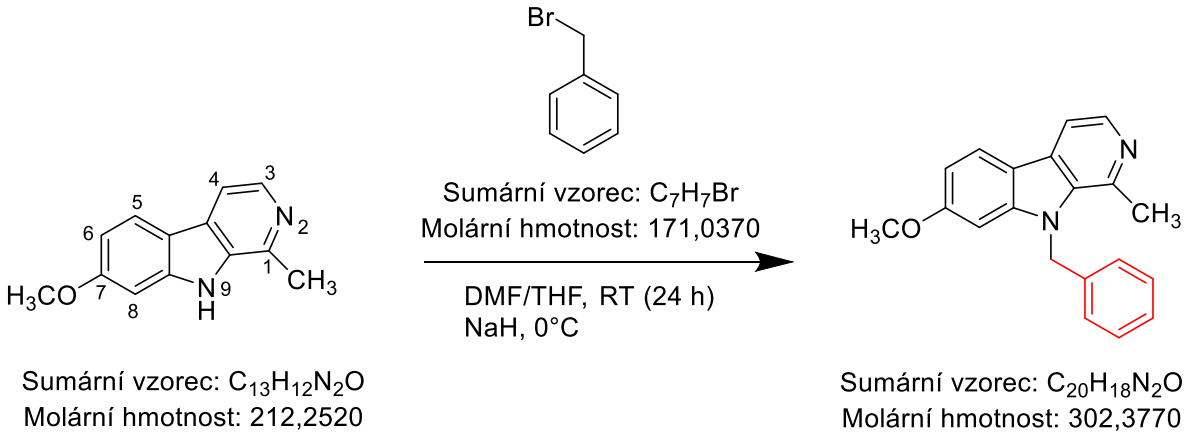
Jako výchozí látka pro chemickou reakci bylo použito 40 mg harminu. Toto množství bylo rozpuštěno ve 2 ml směsi suchého DMF a THF (1:1). Do směsi bylo přidáno 4,52 mg NaH. Reakce probíhala 10 minut pod působením argonu v uzavřené baňce při 0°C v ledové lázni.

Dále bylo přidáno příslušné alkylační činidlo specifické pro každý derivát. Následně reakce probíhala za stálého míchání po dobu 24 hodin při pokojové teplotě. Poté byla směs odpařena do sucha. Odparek byl rozpuštěn ve směsi $CHCl_3$:EtOH (1:1) v ultrazvukové lázni a nanesen na chromatografické desky určené k preparativní tenkovrstvé chromatografii. Byla použita mobilní fáze S_3, u několika derivátů S_2. Při použití mobilní fáze S_2 se reakce nechala vyvinout dvakrát, u S_3 pouze jednou. Vzniklá zóna s produktem byla separována ze všech desek, spolu s křemelinou promyta směsí $CHCl_3$:EtOH (1:1) a odpařena na rotační vakuové odparce.



Obrázek 9: Obecné schéma přípravy derivátů harminu

4.3.1 Příprava 9-*N*-benzylharminu



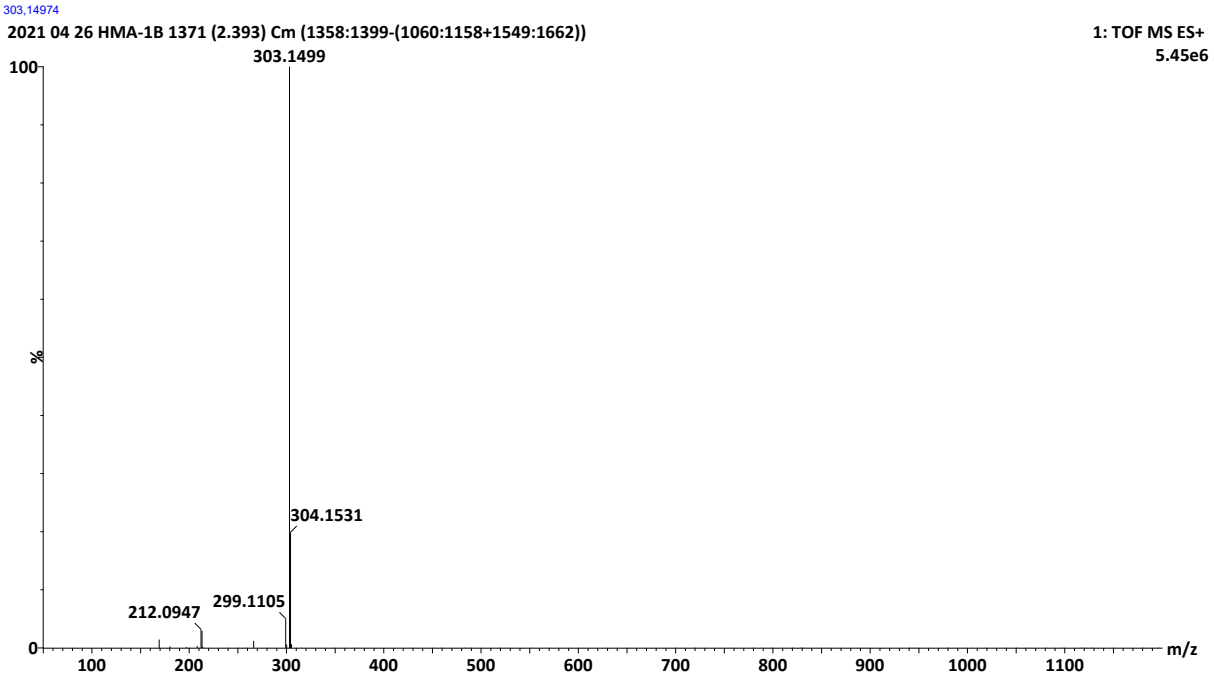
Obrázek 10: Schéma syntézy 9-*N*-benzylharminu

K 40 mg harminu byl přidán DMF a THF, ke směsi byl přidán NaH a dále bylo přidáno 27,98 µl benzylbromidu ve funkci alkylačního činidla. Reakce probíhala za stálého míchání po dobu 24 hodin. Výtěžnost reakce byla 95 %.

MS analýza

ESI-MS *m/z* $[M+H]^+$ 303,1

ESI-HRMS *m/z* $[M+H]^+$ teoretická 303, 1497, experimentální 303,1499



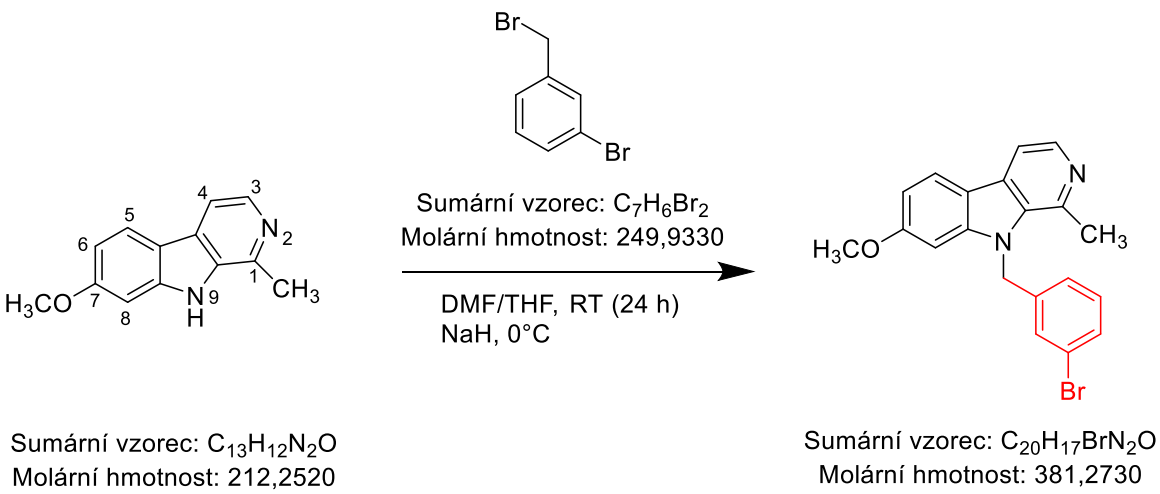
Obrázek 11: ESI-HRMS analýza HMA-1

NMR analýza

^{1}H NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ 8.30 (d, *J* = 5.2 Hz, 1H), 8.00 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 7.77 (d, *J* = 5.2 Hz, 1H), 7.32 – 7.24 (m, 2H), 7.26 – 7.19 (m, 1H), 7.04 – 6.95 (m, 2H), 6.90 (dd, *J* = 8.6 Hz, *J* = 2.2 Hz, 1H), 6.75 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 5.71 (s, 2H), 3.84 (s, 3H), 2.83 (s, 3H).

^{13}C NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ 161.07, 143.53, 140.97, 138.63, 137.85, 135.71, 129.42, 128.99, 127.49, 125.43, 122.38, 115.15, 112.27, 109.23, 93.33, 55.59, 48.21, 22.97.

4.3.2 Příprava 9-*N*-(3-bromobenzyl)harminu



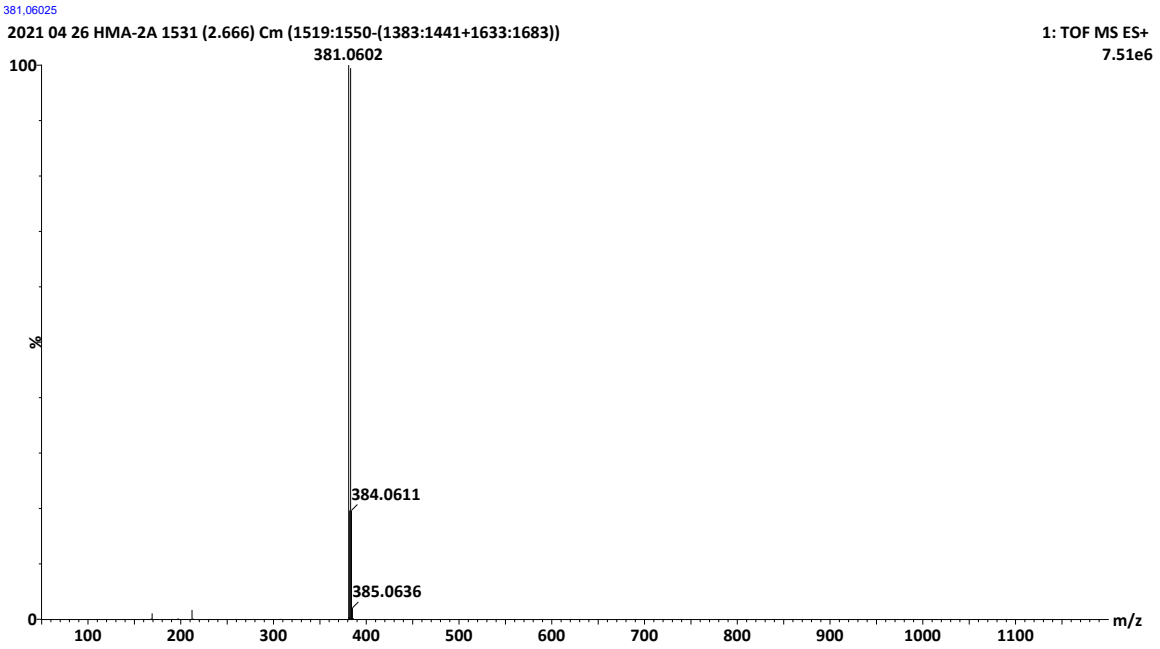
Obrázek 12: Schéma syntézy 9-*N*-(3-bromobenzyl)harminu

Ke 40 mg harminu byl přidán DMF a THF, poté bylo přidán NaH. Jako alkylační činidlo bylo přidáno 37,74 µl 3-bromobenzylbromidu. Výtěžnost reakce byla 92 %.

MS analýza

ESI-MS *m/z* $[M+H]^+$ 381,1

ESI-HRMS *m/z* $[M+H]^+$ teoretická 381,0603, experimentální 381,0602



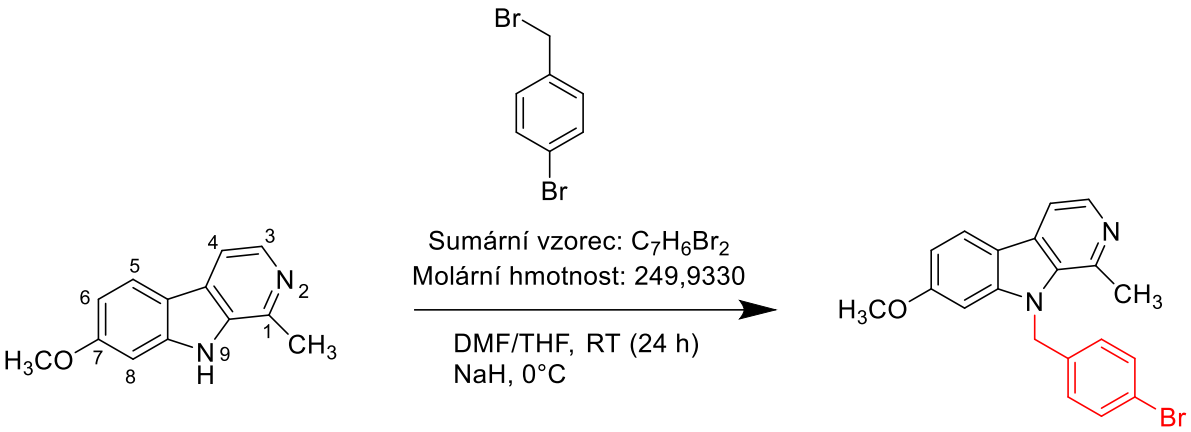
Obrázek 13: ESI-HRMS analýza HMA-2

NMR analýza

^{1}H NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ 8.31 (d, *J* = 5.2 Hz, 1H), 8.01 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 7.77 (d, *J* = 5.2 Hz, 1H), 7.43 – 7.33 (m, 1H), 7.27 – 7.19 (m, 1H), 7.12 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H), 6.91 (dd, *J* = 8.6 Hz, *J* = 2.2 Hz, 1H), 6.90 – 6.81 (m, 1H), 6.70 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 5.67 (s, 2H), 3.85 (s, 3H), 2.82 (s, 3H).

^{13}C NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ 161.16, 143.34, 140.82, 140.27, 138.96, 135.62, 130.80, 130.66, 129.55, 128.54, 124.08, 123.24, 122.53, 115.28, 112.37, 109.29, 93.31, 55.66, 47.71, 23.03.

4.3.3 Příprava 9-*N*-(4-bromobenzyl)harminu



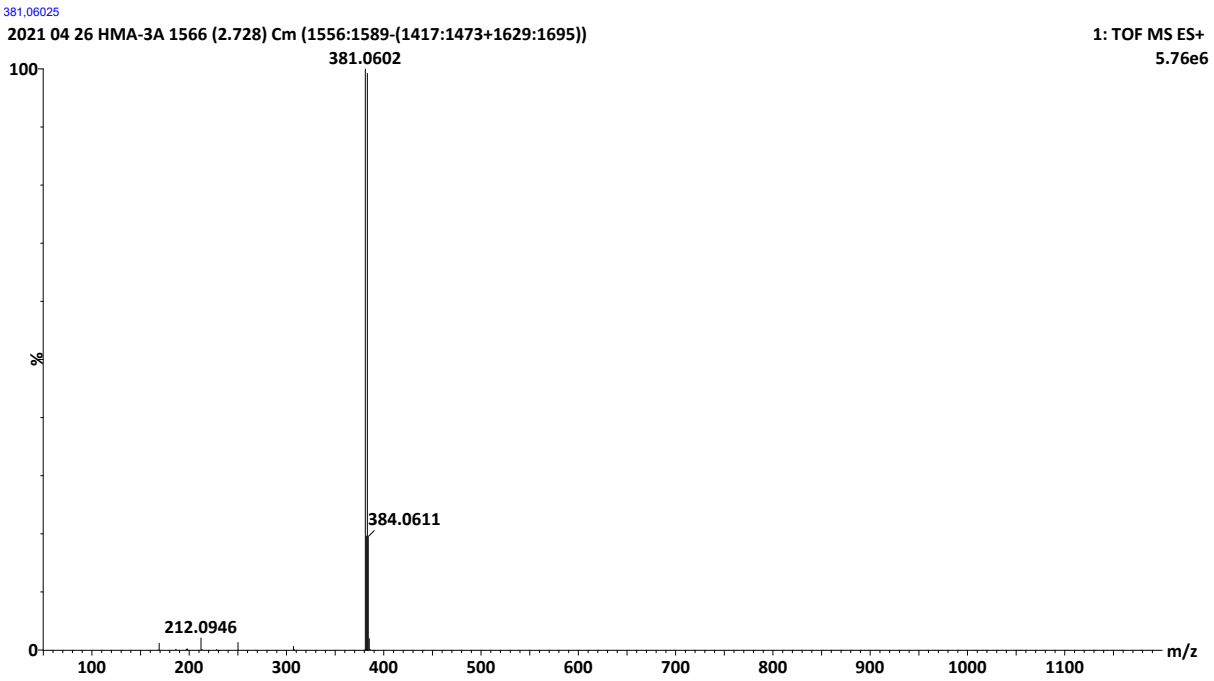
Obrázek 14: Schéma syntézy 9-*N*-(4-bromobenzyl)harminu

40 mg harminu bylo rozpuštěno ve směsi DMF a THF, poté bylo přidáno 4,52 mg NaH. K reakci bylo přidáno 47,10 mg 4-bromobenzylbromidu. Výtěžnost reakce byla 95 %.

MS analýza

ESI-MS *m/z* $[M+H]^+$ 381,1

ESI-HRMS *m/z* $[M+H]^+$ teoretická 381,0603, experimentální 381,0602



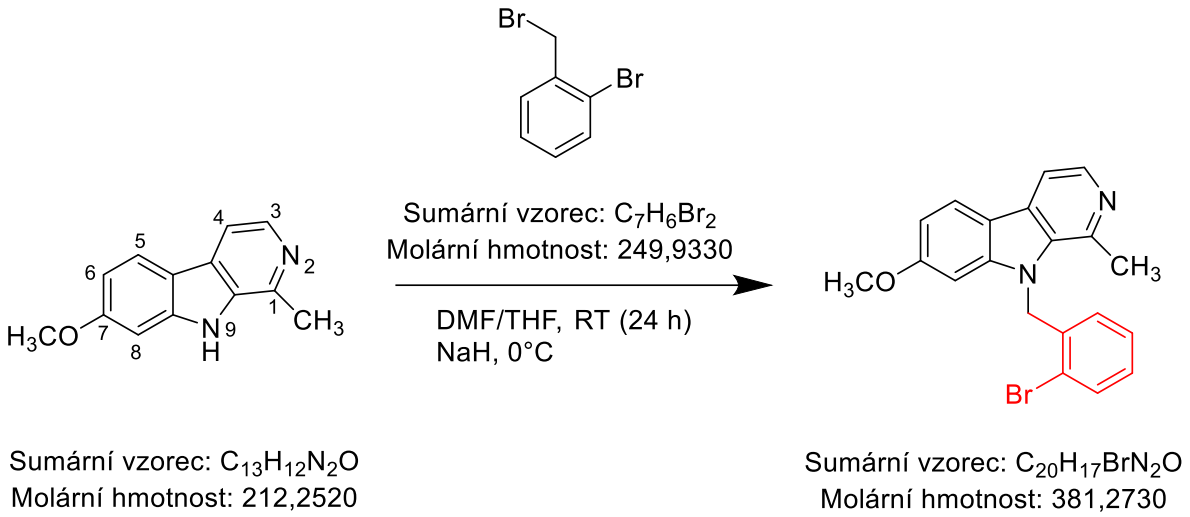
Obrázek 15: ESI-HRMS analýza HMA-3

NMR analýza

^{1}H NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ 8.31 (d, *J* = 5.2 Hz, 1H), 8.00 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 7.76 (d, *J* = 5.2 Hz, 1H), 7.44 – 7.35 (m, AA´, BB´ 2H), 6.90 (dd, *J* = 8.6 Hz, *J* = 2.1 Hz, 1H), 6.88 – 6.84 (m, AA´, BB´, 2H), 6.70 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H), 5.65 (s, 2H), 3.84 (s, 3H), 2.81 (s, 3H).

^{13}C NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ 161.15, 143.34, 140.82, 138.92, 136.90, 135.61, 132.17, 129.53, 127.21, 122.52, 121.43, 115.26, 112.35, 109.27, 93.32, 55.64, 47.76, 23.00.

4.3.4 Příprava 9-*N*-(2-bromobenzyl)harminu



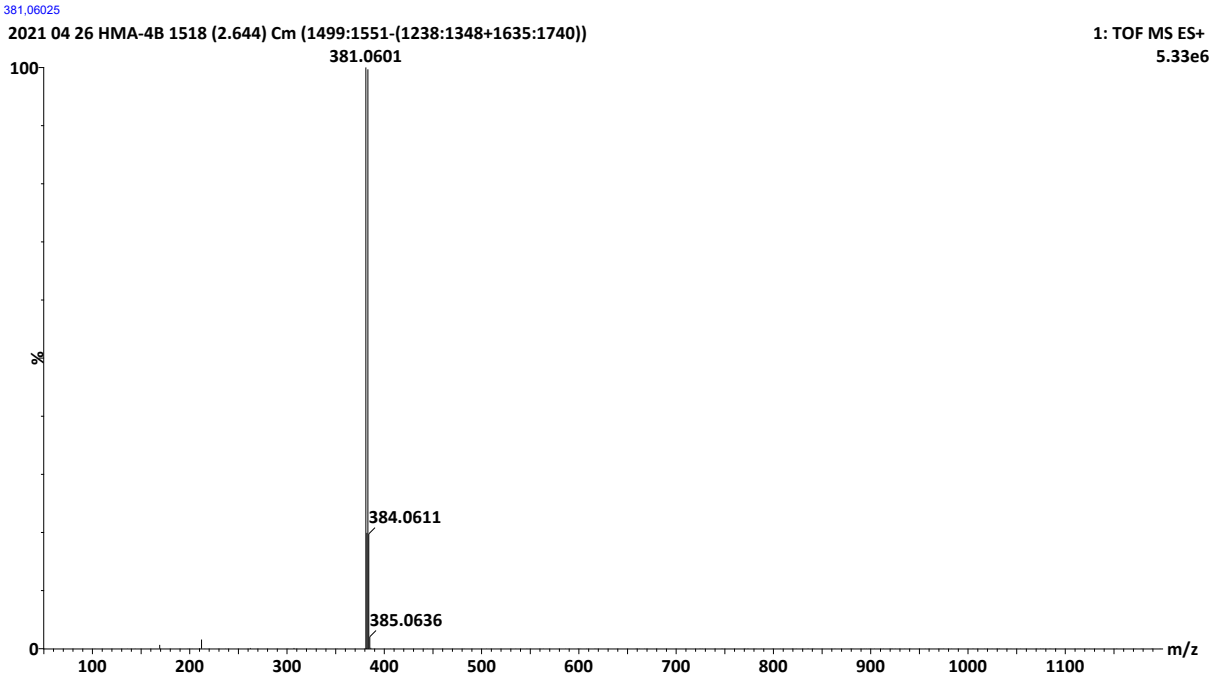
Obrázek 16: Schéma syntézy 9-*N*-(2-bromobenzyl)harminu

K 40 mg harminu byl přidán DMF a THF, po rozpuštění ještě 4,52 mg NaH, dále bylo přidáno 47,10 mg 2-bromobenzylbromidu ve funkci alkylačního činidla. Výtěžnost reakce byla 85 %.

MS analýza

ESI-MS *m/z* $[M+H]^+$ 381,1

ESI-HRMS *m/z* $[M+H]^+$ teoretická 381,0603, experimentální 381,0601



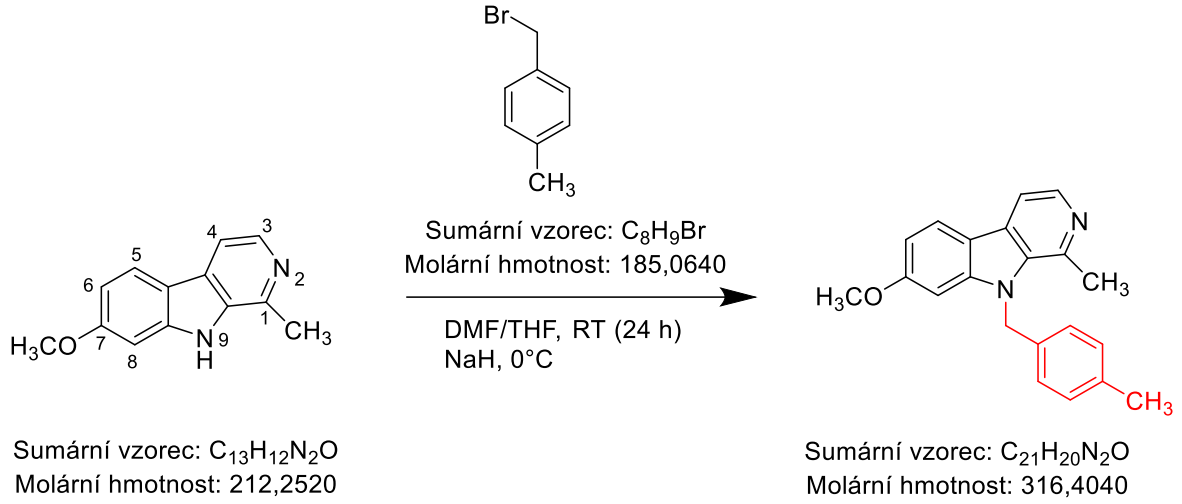
Obrázek 17: ESI-HRMS analýza HMA-4

NMR analýza

^{1}H NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ 8.31 (d, *J* = 5.3 Hz, 1H), 8.01 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.77 (d, *J* = 5.3 Hz, 1H), 7.64 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.12 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.05 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H), 6.91 (dd, *J* = 8.7 Hz, *J* = 2.2 Hz, 1H), 6.70 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 6.38 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 5.67 (s, 2H), 3.85 (s, 3H), 2.74 (s, 3H).

^{13}C NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ 161.21, 143.30, 141.09, 138.95, 136.67, 135.51, 132.91, 129.51, 129.10, 128.11, 126.98, 122.50, 121.25, 115.16, 112.33, 109.47, 93.07, 55.68, 48.82, 22.53.

4.3.5 Příprava 9-*N*-(4-methylbenzyl)harminu



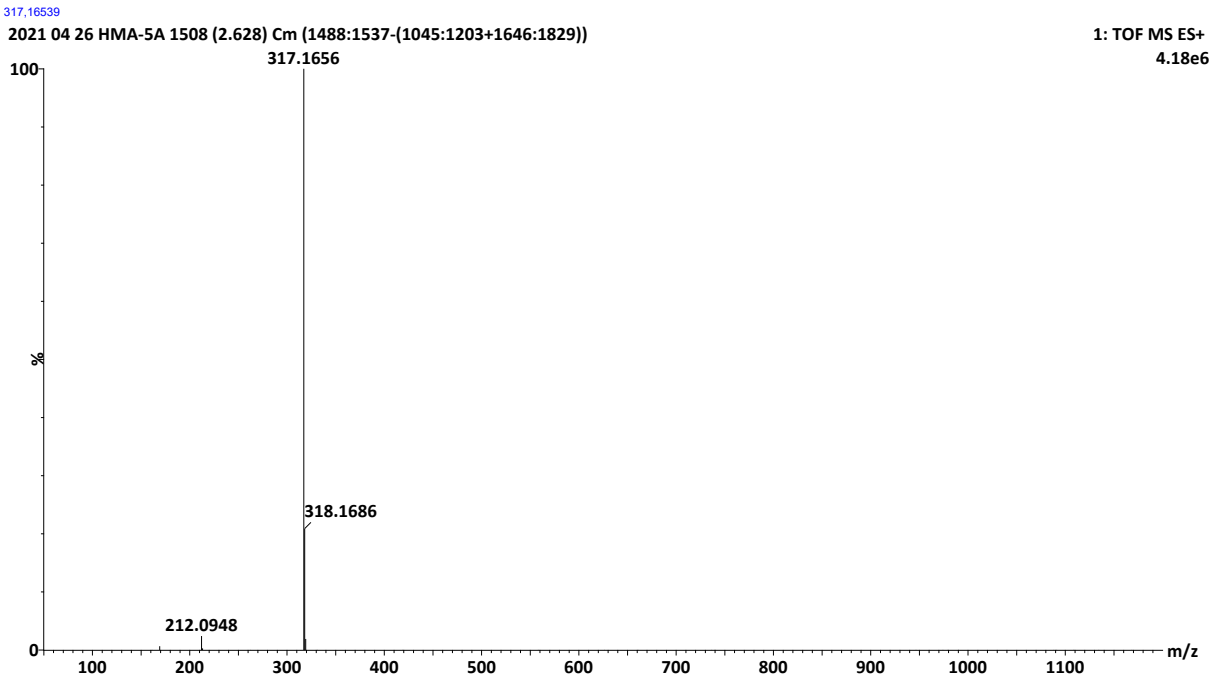
Obrázek 18: Schéma syntézy 9-*N*-(4-methylbenzyl)harminu

40 mg harminu bylo rozpuštěno ve směsi DMF a THF, ke směsi bylo dále přidáno 4,52 mg NaH a 34,88 mg 4-methylbenzylbromidu jako alkylační činidlo. Výtěžnost reakce byla 93 %.

MS analýza

ESI-MS *m/z* $[M+H]^+$ 317,2

ESI-HRMS *m/z* $[M+H]^+$ teoretická 317,1654, experimentální 317,1656



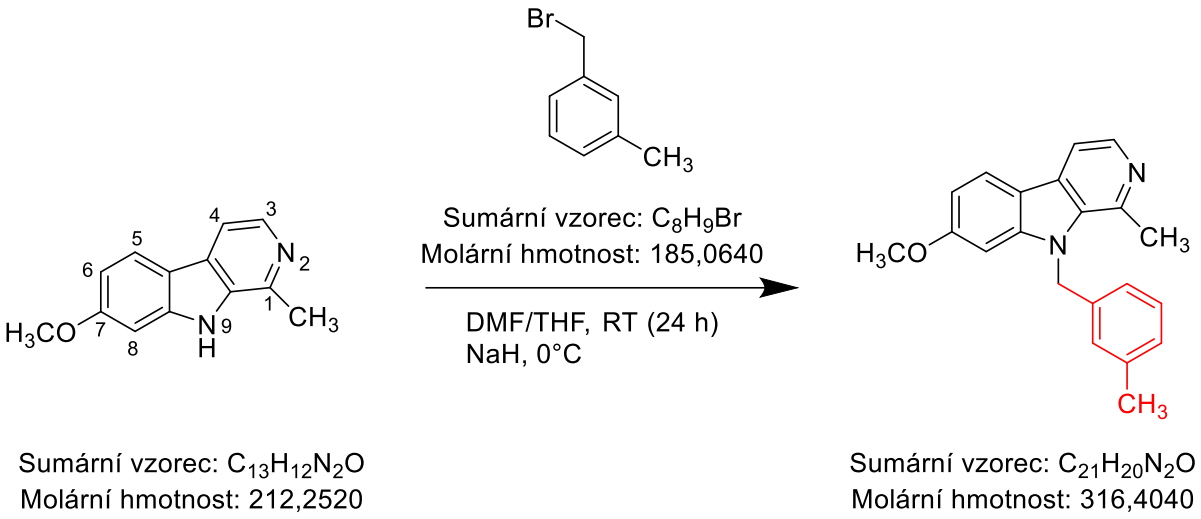
Obrázek 19: ESI-HRMS analýza HMA-5

NMR analýza

^{1}H NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ 8.30 (d, *J* = 5.2 Hz, 1H), 8.00 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 7.76 (d, *J* = 5.2 Hz, 1H), 7.10-7.04 (m, AA´, BB´, 2H), 6.92-6.85 (m, 3H), 6.75 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H), 5.67 (s, 2H), 3.84 (s, 3H), 2.84 (s, 3H), 2.29 (s, 3H).

^{13}C NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ 161.03, 143.54, 141.04, 138.72, 137.17, 135.76, 134.86, 129.71, 129.36, 125.42, 122.34, 115.16, 112.27, 109.16, 93.34, 55.62, 48.03, 23.08, 23.00.

4.3.6 Příprava 9-*N*-(3-methylbenzyl)harminu



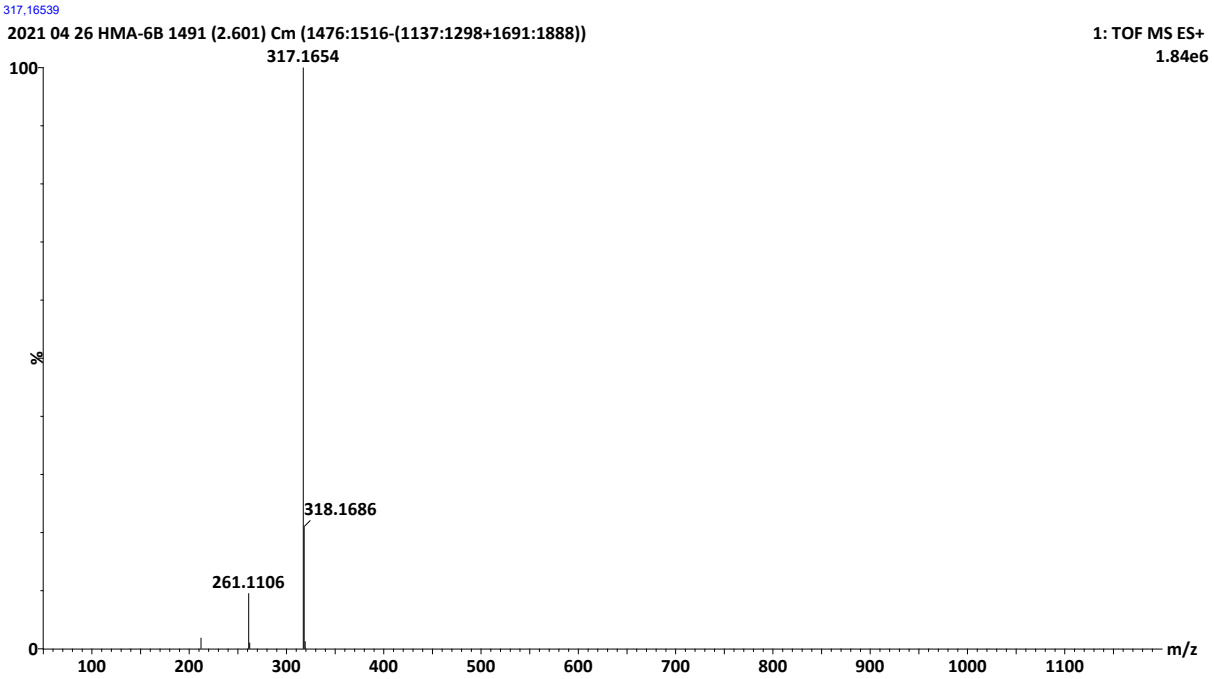
Obrázek 20: Schéma syntézy 9-*N*-(3-methylbenzyl)harminu

40 mg harminu bylo rozpuštěno ve směsi DMF a THF, k tomu bylo přidáno 4,52 mg NaH a jako alkylační činidlo bylo přidáno 34,88 mg 3-methylbenzylbromidu. Výtěžnost reakce byla 90 %.

MS analýza

ESI-MS *m/z* $[M+H]^+$ 317,2

ESI-HRMS *m/z* $[M+H]^+$ teoretická 317,1654, experimentální 317,1654



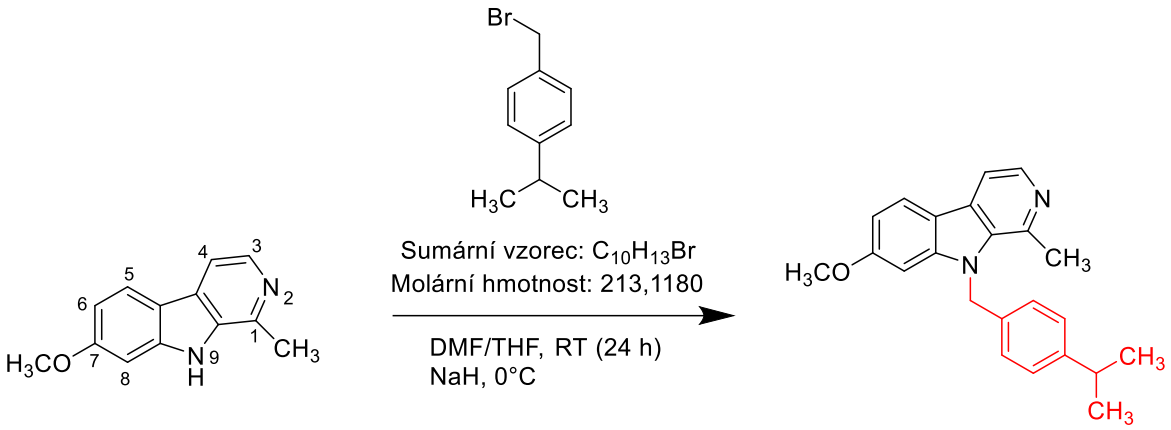
Obrázek 21: ESI-HRMS analýza HMA-6

NMR analýza

^{1}H NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ 8.30 (d, *J* = 5.2 Hz, 1H), 8.00 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 7.77 (d, *J* = 5.2 Hz, 1H), 7.15 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.05 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 6.89 (dd, *J* = 8.6 Hz, *J* = 2.1 Hz, 1H), 6.85 (s, 1H), 6.77 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 6.75 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H), 5.67 (s, 2H), 3.84 (s, 3H), 2.84 (s, 3H), 2.25 (s, 3H).

^{13}C NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ 161.04, 143.58, 141.06, 138.78, 138.66, 137.89, 135.81, 129.36, 128.90, 128.28, 126.04, 122.54, 122.36, 115.17, 112.26, 109.17, 93.38, 55.61, 48.24, 23.07, 21.42.

4.3.7 Příprava 9-*N*-(4-isopropylbenzyl)harminu



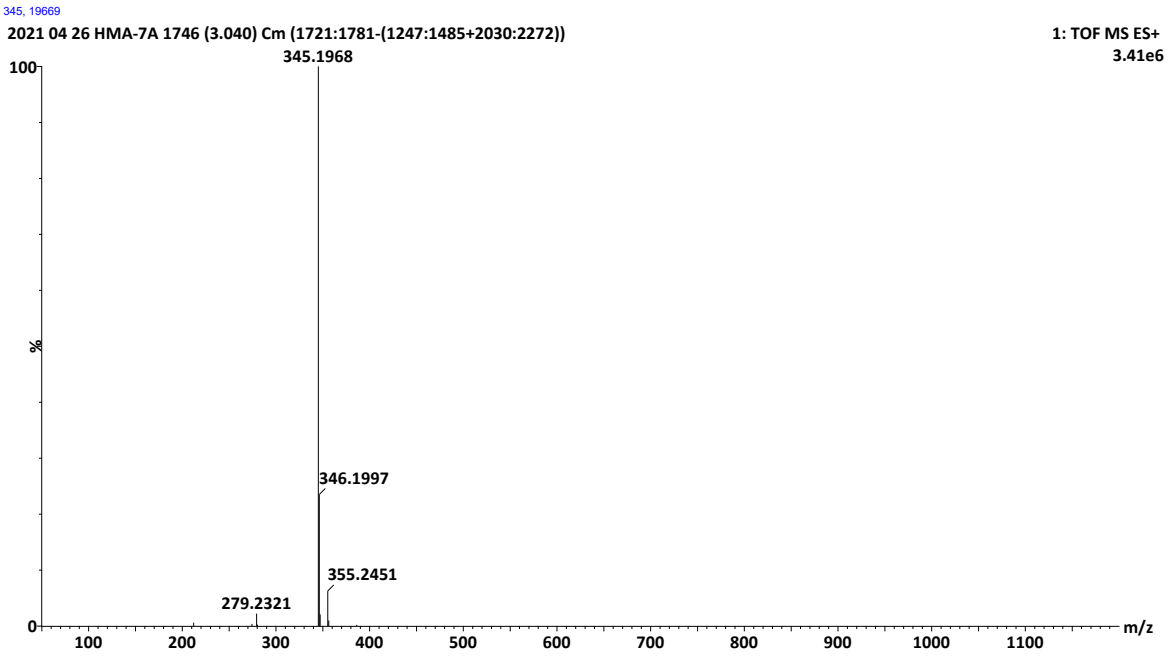
Obrázek 22: Schéma syntézy 9-*N*-(4-isopropylbenzyl)harminu

40 mg harminu se rozpustilo ve směsi DMF a THF, ke směsi byl přidán NaH a za předepsaných podmínek bylo přidáno alkylační činidlo. Výtěžnost reakce byla 88 %.

MS analýza

ESI-MS *m/z* $[M+H]^+$ 345,2

ESI-HRMS *m/z* $[M+H]^+$ teoretická 345,1967, experimentální 345,1968



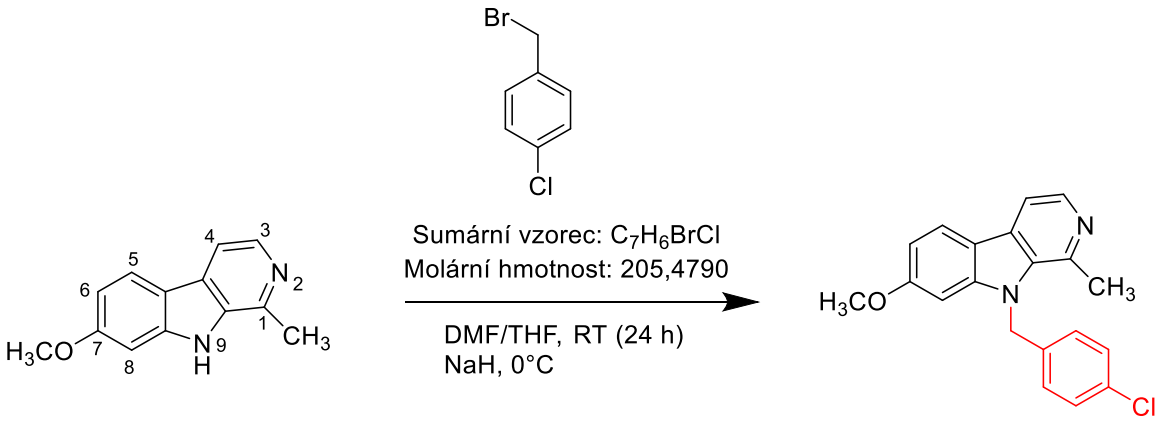
Obrázek 23: ESI-HRMS analýza HMA-7

NMR analýza

^{1}H NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ 8.29 (d, *J* = 5.2 Hz, 1H), 8.00 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 7.76 (d, *J* = 5.2 Hz, 1H), 7.14 – 7.09 (m, AA´, BB´, 2H), 6.94 – 6.87 (m, 3H), 6.78 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H), 5.68 (s, 2H), 3.85 (s, 3H), 2.89 – 2.79 (m, 1H), 2.85 (s, 3H), 1.19 (d, *J* = 6.9 Hz, 6H).

^{13}C NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ 161.04, 148.19, 143.60, 141.10, 138.62, 135.77, 135.23, 129.38, 127.04, 125.47, 122.36, 115.17, 112.26, 109.17, 93.42, 55.63, 48.05, 33.69, 23.89, 23.11.

4.3.8 Příprava 9-*N*-(4-chlorobenzyl)harminu



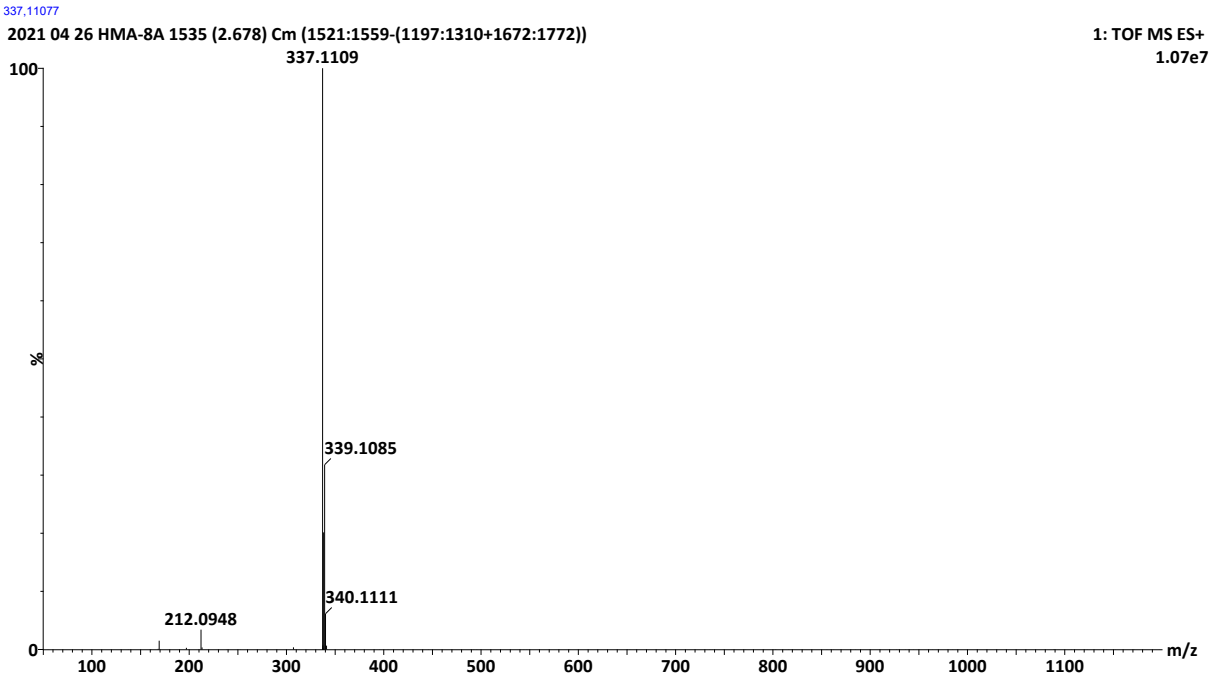
Obrázek 24: Schéma syntézy 9-*N*-(4-chlorobenzyl)harminu

Ke 40 mg harminu byl přidán DMF a THF, dále NaH a příslušné alkylační činidlo. Výtěžnost reakce byla 94 %.

MS analýza

ESI-MS *m/z* $[M+H]^+$ 337,1

ESI-HRMS *m/z* $[M+H]^+$ teoretická 337,1108, experimentální 337,1109



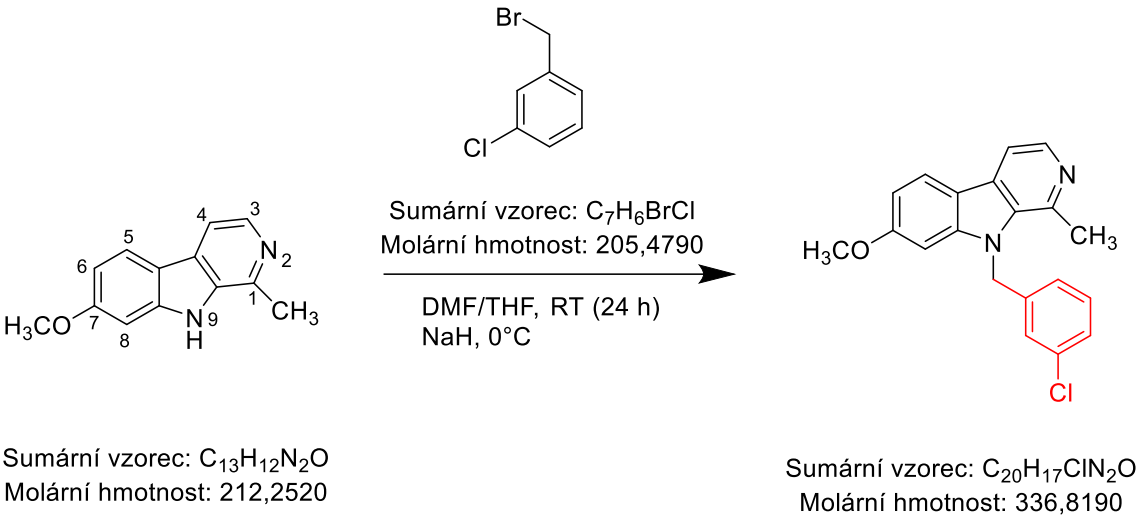
Obrázek 25: ESI-HRMS analýza HMA-8

NMR analýza

^{1}H NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ 8.31 (d, *J* = 5.2 Hz, 2H), 8.01 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.77 (d, *J* = 5.2 Hz, 2H), 7.26 – 7.22 (m, AA´, BB´, 2H), 6.94 – 6.92 (m,AA´, BB´, 2H), 6.90 (dd, *J* = 8.6 Hz, *J* = 2.1 Hz, 1H), 6.71 (d, *J* = 2.1 Hz, 2H), 5.67 (s, 2H), 3.84 (s, 3H), 2.82 (s, 3H).

^{13}C NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ 161.16, 143.36, 140.80, 138.86, 136.34, 135.60, 133.40, 129.55, 129.22, 126.85, 122.52, 115.25, 112.35, 109.28, 93.32, 55.63, 47.70, 22.97.

4.3.9 Příprava 9-*N*-(3-chlorobenzyl)harminu



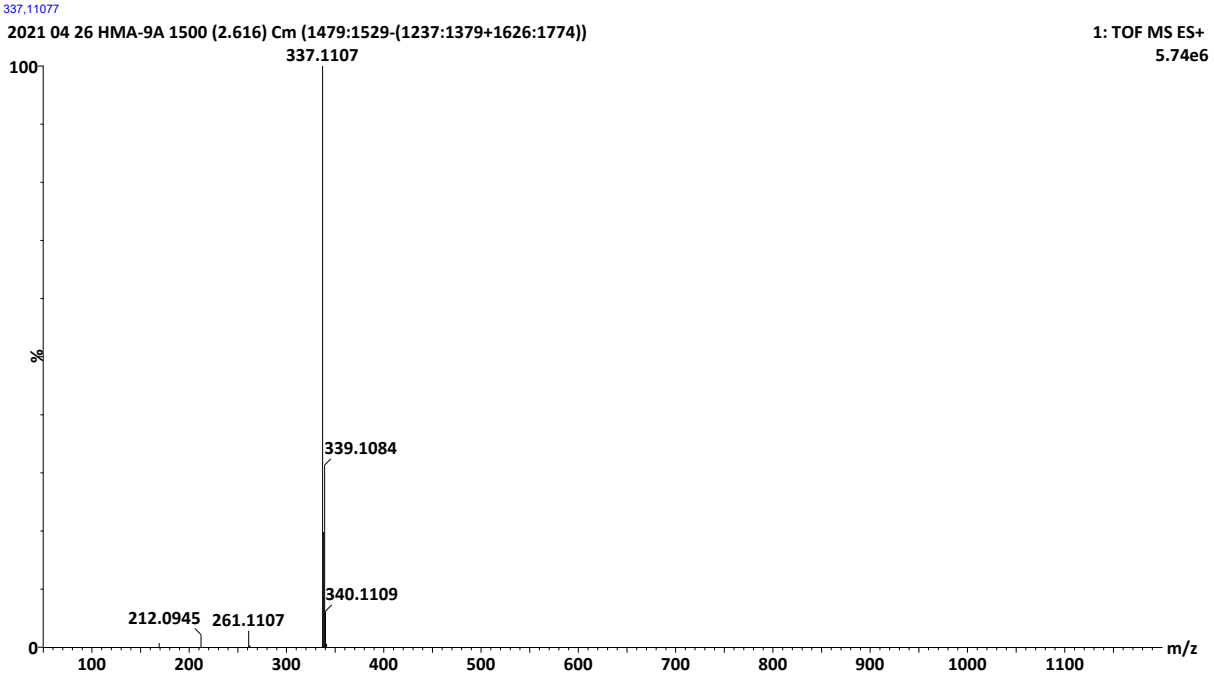
Obrázek 26: Schéma syntézy 9-*N*-(3-chlorobenzyl)harminu

40 mg harminu se nechalo zreagovat za předepsaných podmínek s alkylačním činidlem. Výtěžnost reakce byla 90 %.

MS analýza

ESI-MS *m/z* $[M+H]^+$ 337,1

ESI-HRMS *m/z* $[M+H]^+$ teoretická 337,1108, experimentální 337,1107



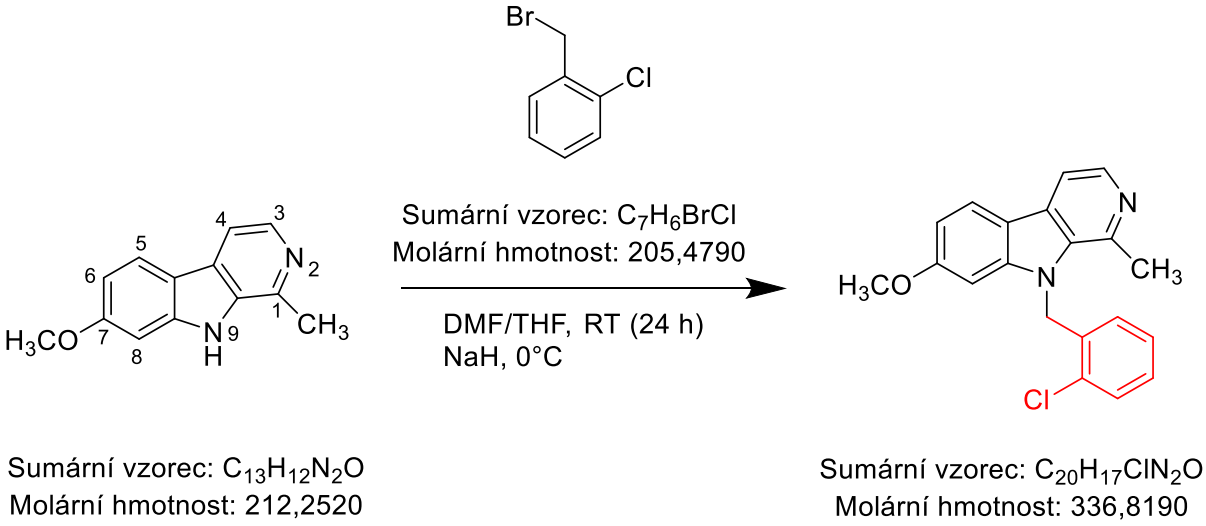
Obrázek 27: ESI-HRMS analýza HMA-9

NMR analýza

^{1}H NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ 8.31 (d, *J* = 5.2 Hz, 1H), 8.01 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 7.77 (d, *J* = 5.2 Hz, 1H), 7.23 – 7.16 (m, 2H), 7.04 (s, 1H), 6.91 (dd, *J* = 8.6 Hz, *J* = 2.2 Hz, 1H), 6.83 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 6.71 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 5.68 (s, 2H), 3.85 (s, 3H), 2.82 (s, 3H).

^{13}C NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ 161.15, 143.34, 140.84, 140.03, 138.98, 135.63, 135.08, 130.37, 129.54, 127.85, 125.63, 123.62, 122.53, 115.28, 112.37, 109.27, 93.32, 55.65, 47.78, 23.04.

4.3.10 Příprava 9-*N*-(2-chlorobenzyl)harminu



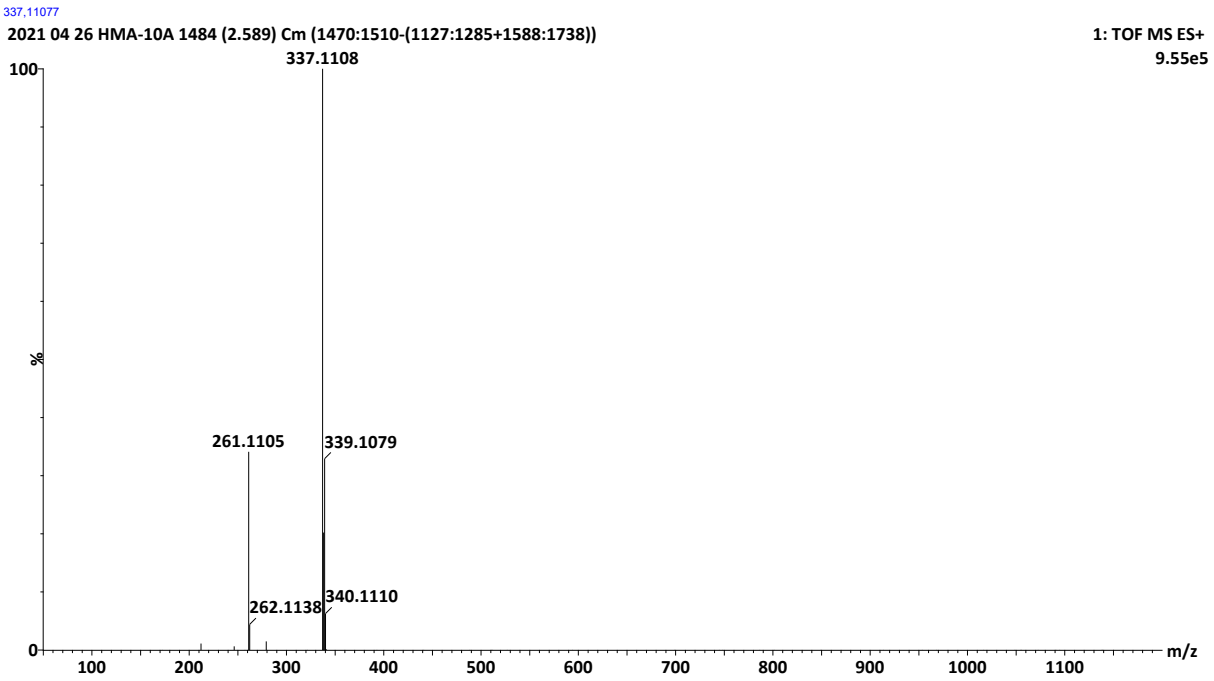
Obrázek 28: Schéma syntézy 9-*N*-(2-chlorobenzyl)harminu

Ke 40 mg harminu byl přidán DMF a THF, dále NaH a příslušné alkylační činidlo, reakce se nechala probíhat za předepsaných podmínek 24 hodin. Výtěžnost reakce byla 89 %.

MS analýza

ESI-MS *m/z* $[M+H]^+$ 337,1

ESI-HRMS *m/z* $[M+H]^+$ teoretická 337,1108, experimentální 337,1108



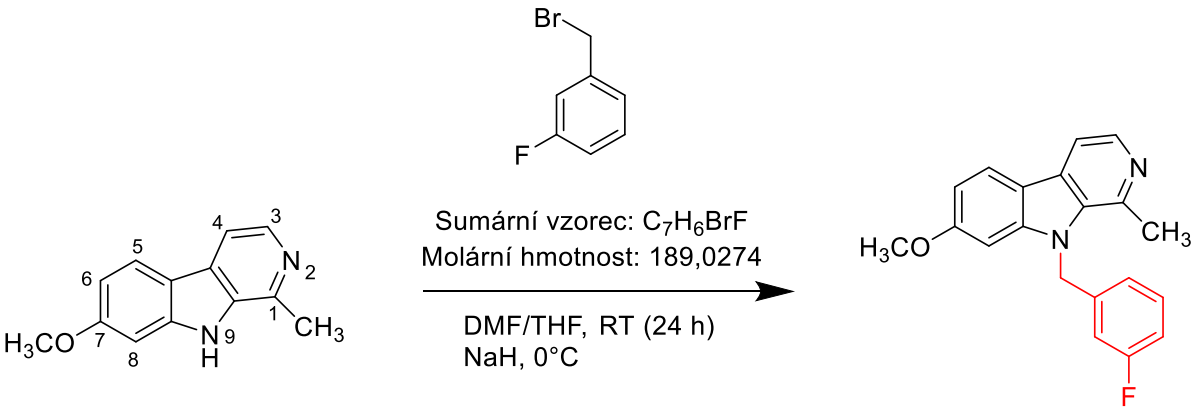
Obrázek 29: ESI-HRMS analýza HMA-10

NMR analýza

^{1}H NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ 8.31 (d, *J* = 5.2 Hz, 1H), 8.01 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 7.77 (d, *J* = 5.2 Hz, 1H), 7.46 (d, *J* =7.8 Hz, 1H), 7.20 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.00 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H), 6.91 (dd, *J* = 8.6, *J* = 2.2 Hz, 1H), 6.70 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 6.40 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 5.73 (s, 2H), 3.85 (s, 3H), 2.75 (s, 3H).

^{13}C NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ 161.20, 143.33, 141.08, 138.92, 135.55, 135.20, 131.46, 129.63, 129.52, 128.79, 127.50, 126.76, 122.50, 115.17, 112.32, 109.45, 93.05, 55.66, 46.25, 22.55.

4.3.11 Příprava 9-*N*-(3-fluorobenzyl)harminu



Sumární vzorec: $C_{13}H_{12}N_2O$
Molární hmotnost: 212,2520

Sumární vzorec: $C_{20}H_{17}FN_2O$
Molární hmotnost: 320,3674

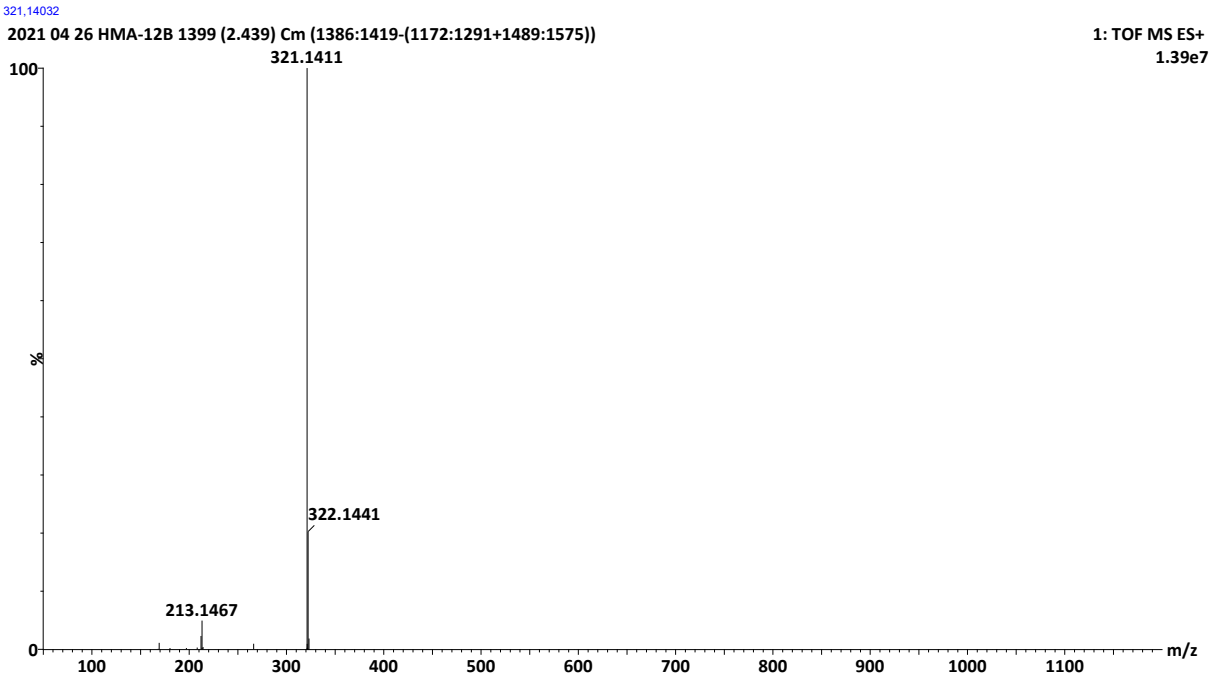
Obrázek 30: Schéma syntézy 9-*N*-(3-fluorobenzyl)harminu

Ke 40 mg harminu bylo za předepsaných podmínek přidáno příslušné alkylační činidlo, reakce probíhala 24 hodin. Výtěžnost reakce byla 88 %.

MS analýza

ESI-MS *m/z* $[M+H]^+$ 321,1

ESI-HRMS *m/z* $[M+H]^+$ teoretická 321,1403, experimentální 321,1411



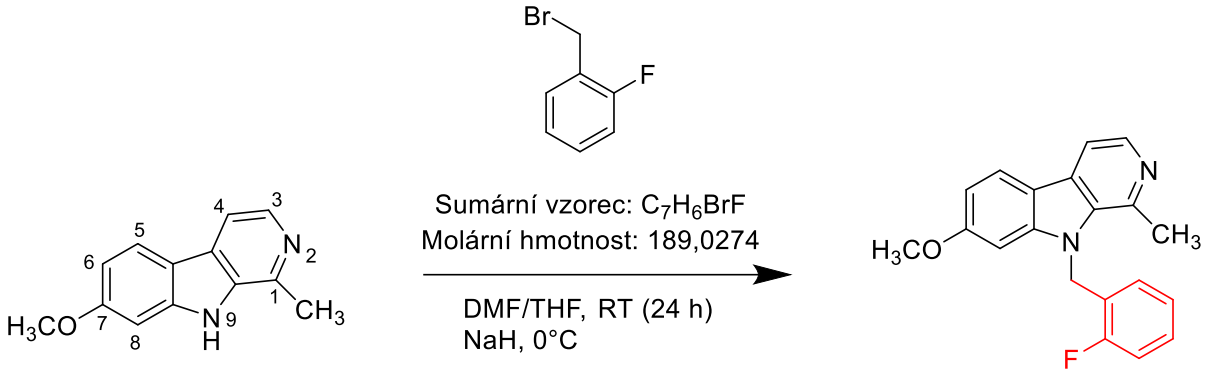
Obrázek 31: ESI-HRMS analýza HMA-12

NMR analýza

^{1}H NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ 8.31 (d, *J* = 5.3 Hz, 1H), 8.01 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 7.77 (d, *J* = 5.3, 1H), 7.25 (td, *J* = 7.9, *J*=5.8 Hz, 1H), 6.96 – 6.91 (m, 1H), 6.91 (dd, *J* = 8.6 Hz, *J* = 2.1 Hz, 1H), 6.81-6.78 (m, 1H), 6.72 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H), 6.70-6.67 m, 1H), 5.70 (s, 2H), 3.85 (s, 3H), 2.82 (s, 3H).

^{13}C NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ 163.33 (d, *J*=248.6 Hz), 161.19, 143.41, 140.81, 140.57 (d, *J*=7.2 Hz), 138.83, 135.60, 130.70 (d, *J*=7.2 Hz), 129.59, 122.54, 121.04 (d, *J*=3.0 Hz), 115.24, 114.57 (d, *J*=20.2 Hz), 112.59 (d, *J*=21.7 Hz), 112.37, 109.31, 93.31, 55.64, 47.82, 22.92.

4.3.12 Příprava 9-*N*-(2-fluorobenzyl)harminu



Sumární vzorec: $C_{13}H_{12}N_2O$
Molární hmotnost: 212,2520

Sumární vzorec: $C_{20}H_{17}FN_2O$
Molární hmotnost: 320,3674

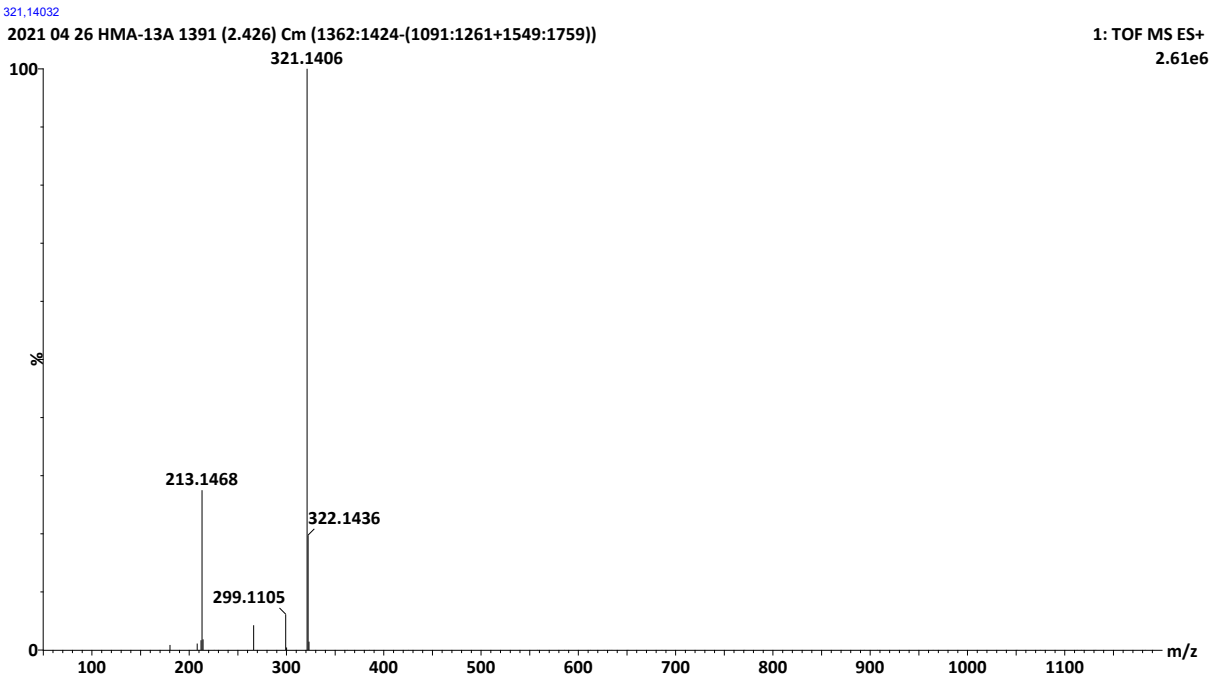
Obrázek 32: Schéma syntézy 9-*N*-(2-fluorobenzyl)harminu

Ke 40 mg harminu byl přidán DMF a THF, dále 4,52 mg NaH a 23,48 µl 2-fluorobenzylbromidu ve funkci alkylačního činidla. Reakce se nechala probíhat za předepsaných podmínek po dobu 24 hodin. Výtěžnost reakce byla 85 %.

MS analýza

ESI-MS *m/z* $[M+H]^+$ 321,1

ESI-HRMS *m/z* $[M+H]^+$ teoretická 321,1403, experimentální 321,1406



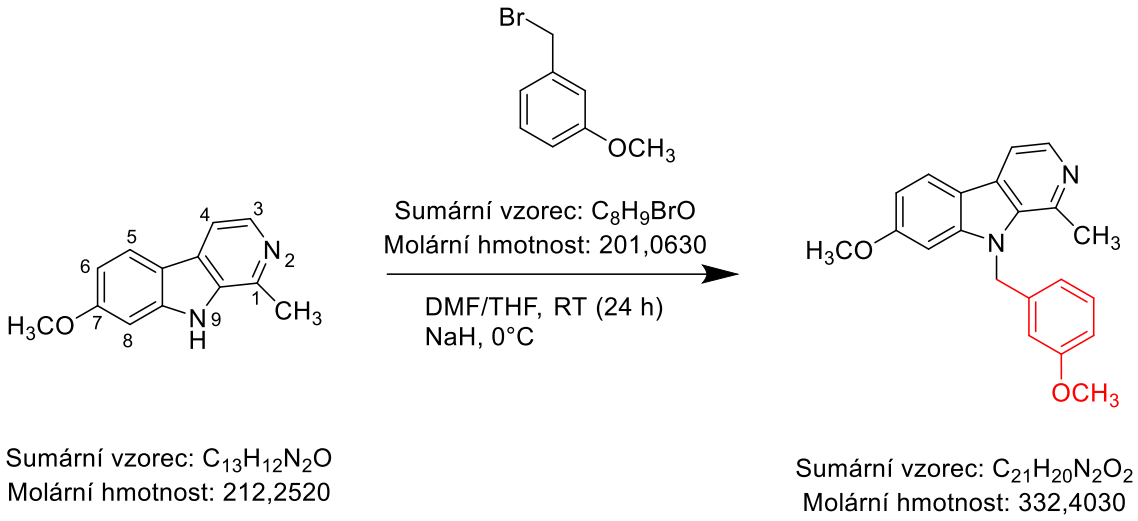
Obrázek 33: ESI-HRMS analýza HMA-13

NMR analýza

^{1}H NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ 8.31 (d, *J* = 5.2 Hz, 1H), 8.01 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 7.77 (d, *J* = 5.2 Hz, 1H), 7.26 – 7.20 (m, 1H), 7.16-7.12 (m, 1H), 6.93 – 6.87 (m, 2H), 6.76 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H), 6.49 (td, *J* = 7.7 Hz, *J*=1.6 Hz, 1H), 5.77 (s, 2H), 3.86 (s, 3H), 2.82 (s, 3H).

^{13}C NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ 161.19, 159.48 (d, *J*=244.2 Hz), 143.42, 141.05, 138.91, 135.68, 129.55, 129.18 (d, *J*=7.2 Hz), 127.09 (d, *J*=4.4 Hz), 125.01 (d, *J*=14.5 Hz), 124.74 (d, *J*=4.4 Hz), 122.50, 115.38 (d, *J*=20.2 Hz), 115.25, 112.35, 109.42, 93.13, 55.66, 42.34 (d, *J*=5.7 Hz), 22.80.

4.3.13 Příprava 9-*N*-(3-methoxybenzyl)harminu



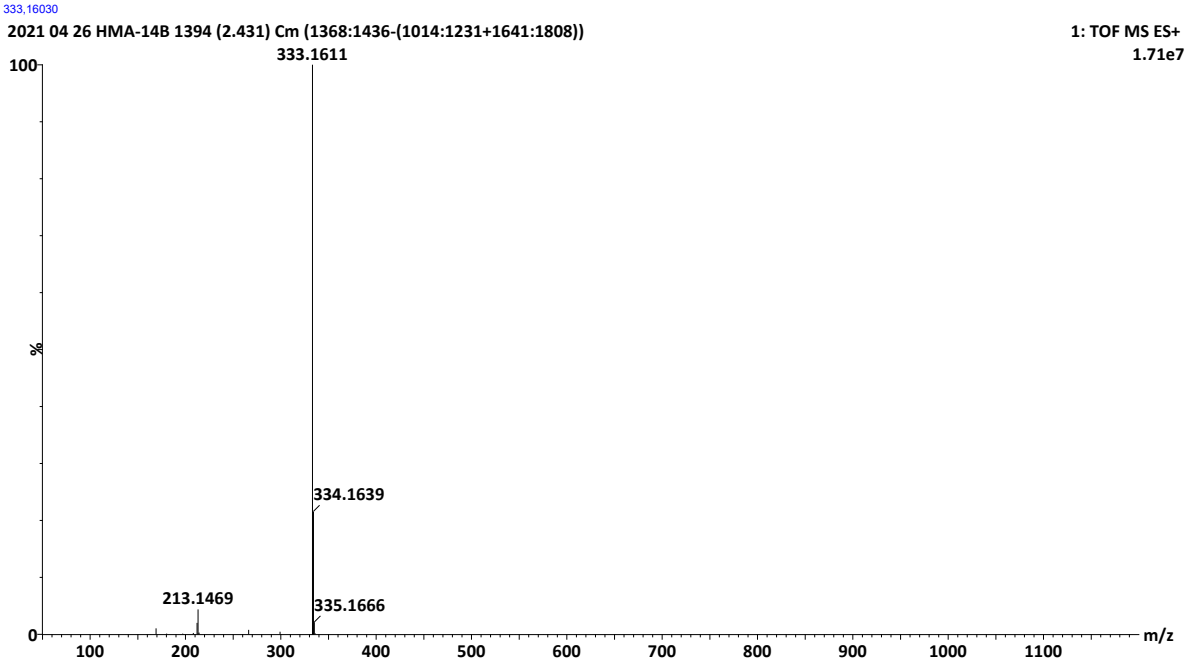
Obrázek 34: Schéma syntézy 9-*N*-(3-methoxybenzyl)harminu

Ke 40 mg harminu byl přidán DMF a THF, dále 4,52 mg NaH a 26,67 µl 3-methoxybenzylbromidu ve funkci alkylačního činidla. Výtěžnost reakce byla 91 %.

MS analýza

ESI-MS *m/z* $[M+H]^+$ 333,2

ESI-HRMS *m/z* $[M+H]^+$ teoretická 333,1606, experimentální 333,1611



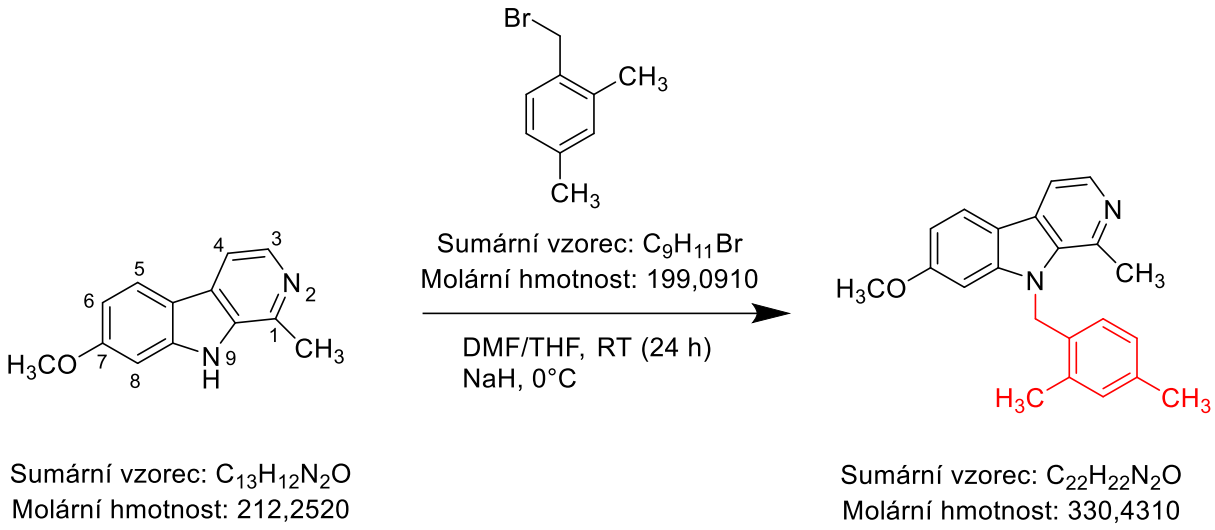
Obrázek 35: ESI-HRMS analýza HMA-14

NMR analýza

^{1}H NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ 8.29 (d, *J* = 5.3 Hz, 1H), 7.99 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 7.75 (d, *J* = 5.3 Hz, 1H), 7.19 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H), 6.89 (dd, *J* = 8.6 Hz, *J* = 2.1 Hz, 1H), 6.79 – 6.73 (m, 2H), 6.58 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 6.54 (s, 1H), 5.67 (s, 2H), 3.84 (s, 3H), 3.68 (s, 3H), 2.83 (s, 3H).

^{13}C NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ 161.07, 160.18, 143.55, 141.03, 139.63, 138.71, 135.76, 130.12, 129.40, 122.38, 117.71, 115.18, 112.30, 112.26, 111.61, 109.23, 93.34, 55.61, 55.12, 48.15, 23.02.

4.3.14 Příprava 9-*N*-(2,4-dimethylbenzyl)harminu



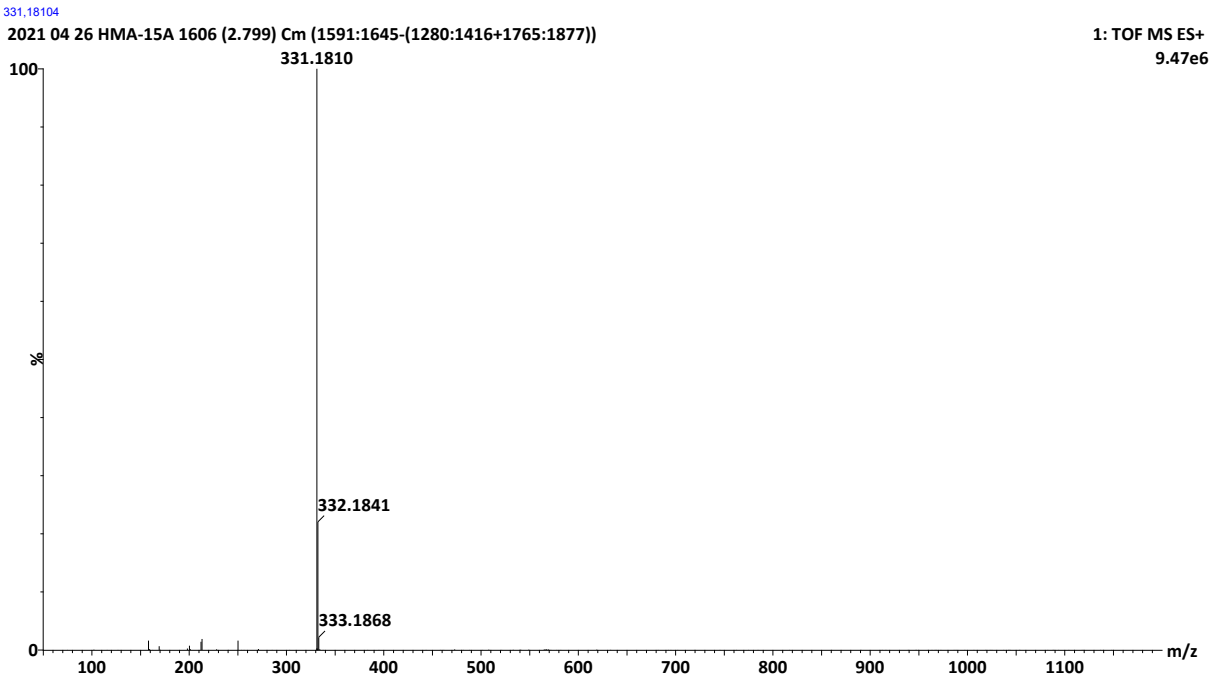
Obrázek 36: Schéma syntézy 9-*N*-(2,4-dimethylbenzyl)harminu

Ke 40 mg harminu byl přidán DMF, THF, NaH a příslušné alkylační činidlo. Výtěžnost reakce byla 84 %.

MS analýza

ESI-MS *m/z* $[M+H]^+$ 331,2

ESI-HRMS *m/z* $[M+H]^+$ teoretická 331,1810, experimentální 331,1810



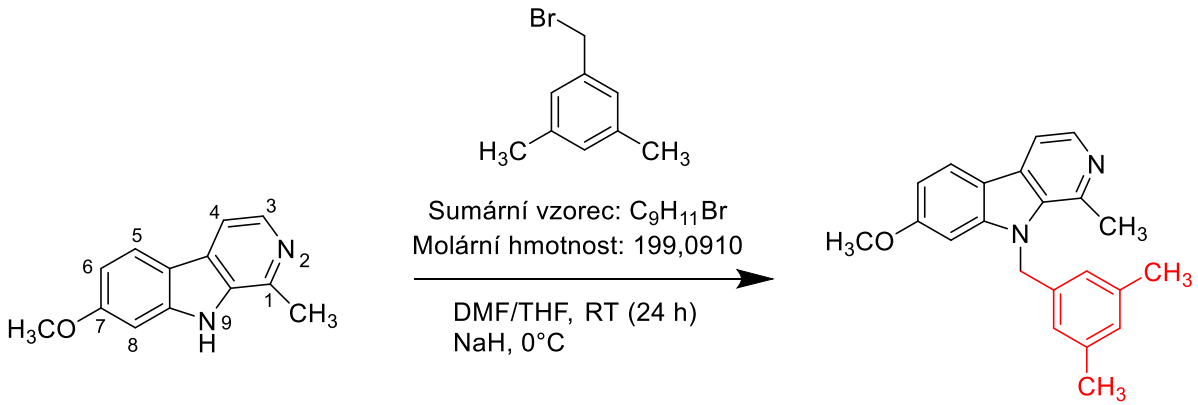
Obrázek 37: ESI-HRMS analýza HMA-15

NMR analýza

^{1}H NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ 8.30 (d, *J* = 5.3 Hz, 1H), 8.01 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 7.77 (d, *J* = 5.3 Hz, 1H), 7.07 (s, 1H), 6.90 (dd, *J* = 8.6 Hz, *J* = 2.2 Hz, 1H), 6.74 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 6.66 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 6.22 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 5.51 (s, 2H), 3.83 (s, 3H), 2.72 (s, 3H), 2.44 (s, 3H), 2.25 (s, 3H).

^{13}C NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ 161.09, 143.56, 141.09, 138.55, 136.89, 135.74, 133.54, 132.61, 131.24, 129.34, 127.24, 124.75, 122.36, 115.05, 112.22, 109.22, 93.08, 55.59, 46.14, 22.38, 20.84, 19.00.

4.3.15 Příprava 9-*N*-(3,5-dimethylbenzyl)harminu



Sumární vzorec: $C_{13}H_{12}N_2O$
Molární hmotnost: 212,2520

Sumární vzorec: $C_{22}H_{22}N_2O$
Molární hmotnost: 330,4310

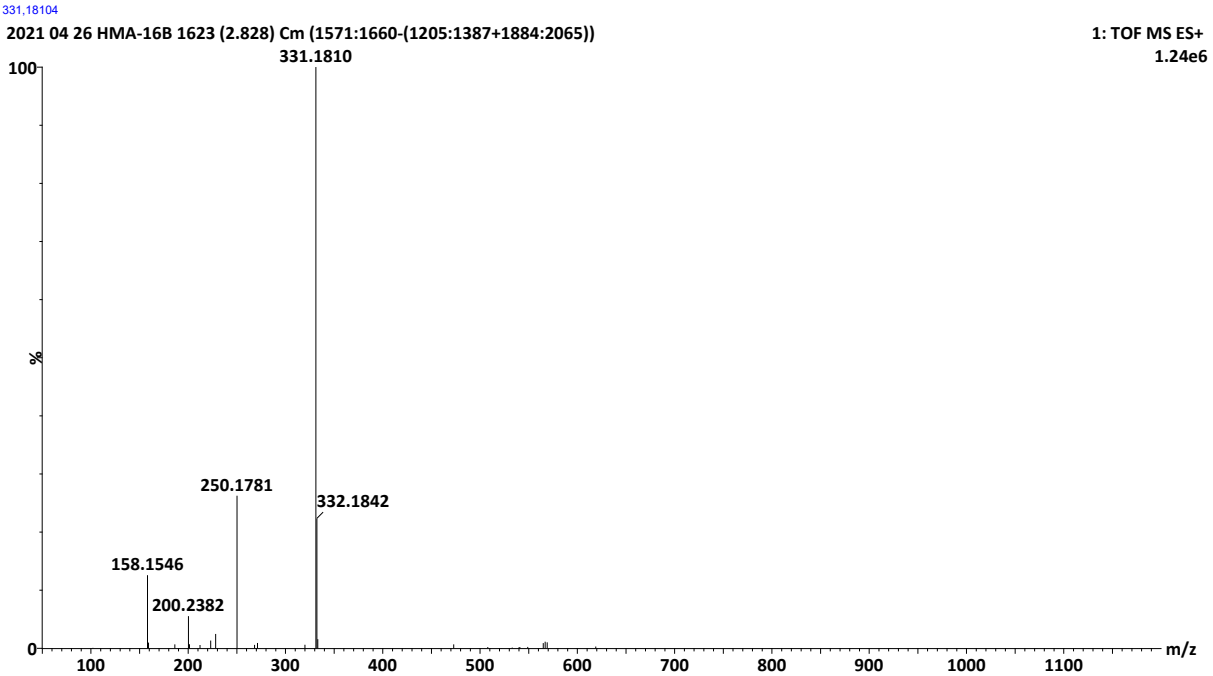
Obrázek 38: Schéma syntézy 9-*N*-(3,5-dimethylbenzyl)harminu

Ke 40 mg harminu byl přidán DMF a THF, NaH a dále příslušné alkylační činidlo. Reakce probíhala za předepsaných podmínek po dobu 24 hodin. Výtěžnost reakce byla 85 %.

MS analýza

ESI-MS *m/z* $[M+H]^+$ 331,2

ESI-HRMS *m/z* $[M+H]^+$ teoretická 331,1810, experimentální 331,1810



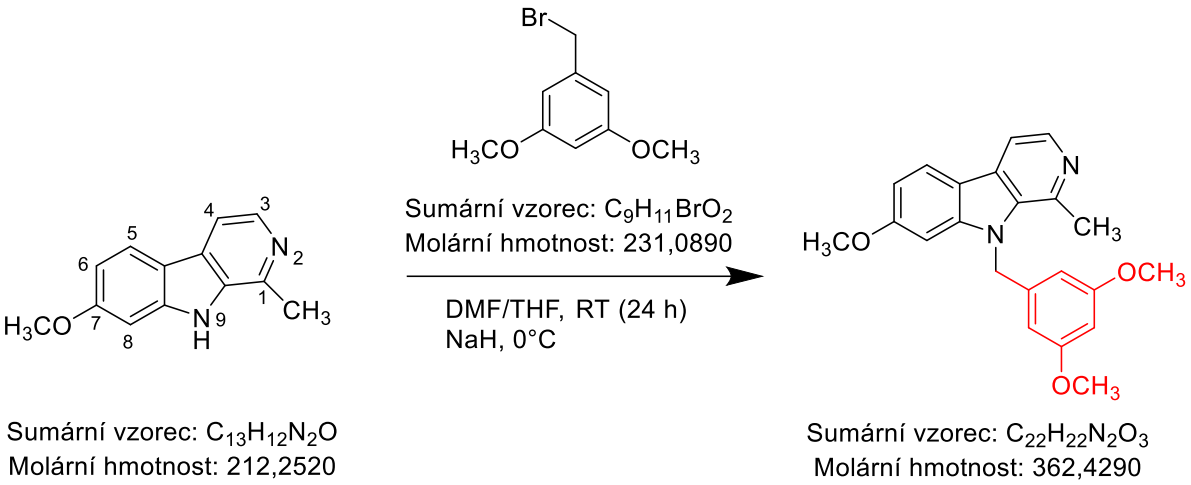
Obrázek 39: ESI-HRMS analýza HMA-16

NMR analýza

^{1}H NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ 8.30 (d, *J* = 5.2 Hz, 1H), 8.01 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 7.77 (d, *J* = 5.2 Hz, 1H), 6.90 (dd, *J* = 8.6 Hz, *J* = 2.2 Hz, 1H), 6.87 (s, 1H), 6.75 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 6.63 (s, 2H), 5.63 (s, 2H), 3.85 (s, 3H), 2.84 (s, 3H), 2.20 (s, 6H).

^{13}C NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ 161.03, 143.63, 141.11, 138.66, 138.60, 137.92, 135.87, 129.33, 129.19, 123.17, 122.33, 115.15, 112.26, 109.13, 93.41, 55.62, 48.24, 23.09, 21.29.

4.3.16 Příprava 9-*N*-(3,5-dimethoxybenzyl)harminu



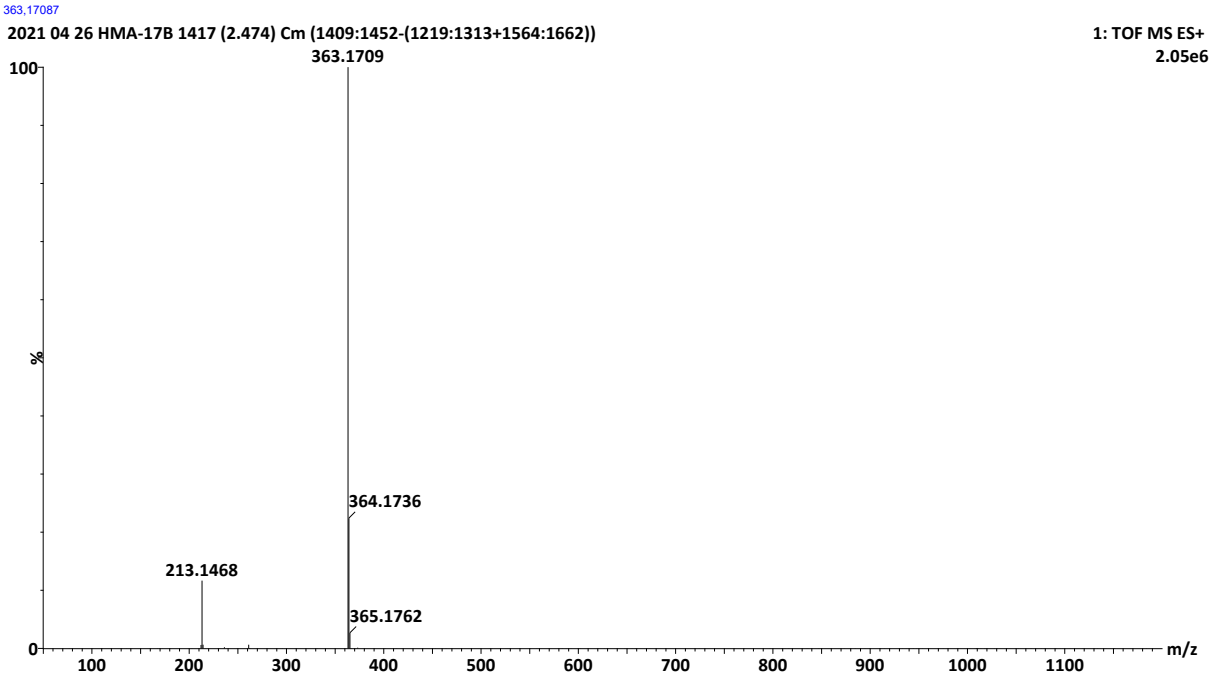
Obrázek 40: Schéma syntézy 9-*N*-(3,5-dimethoxybenzyl)harminu

40 mg harminu bylo rozpuštěno ve směsi DMF a THF, dále byl přidán NaH a 3,5-dimethoxybenzylbromid jako alkylační činidlo. Výtěžnost reakce byla 82 %.

MS analýza

ESI-MS *m/z* $[M+H]^+$ 363,2

ESI-HRMS *m/z* $[M+H]^+$ teoretická 363,1709, experimentální 363,1709



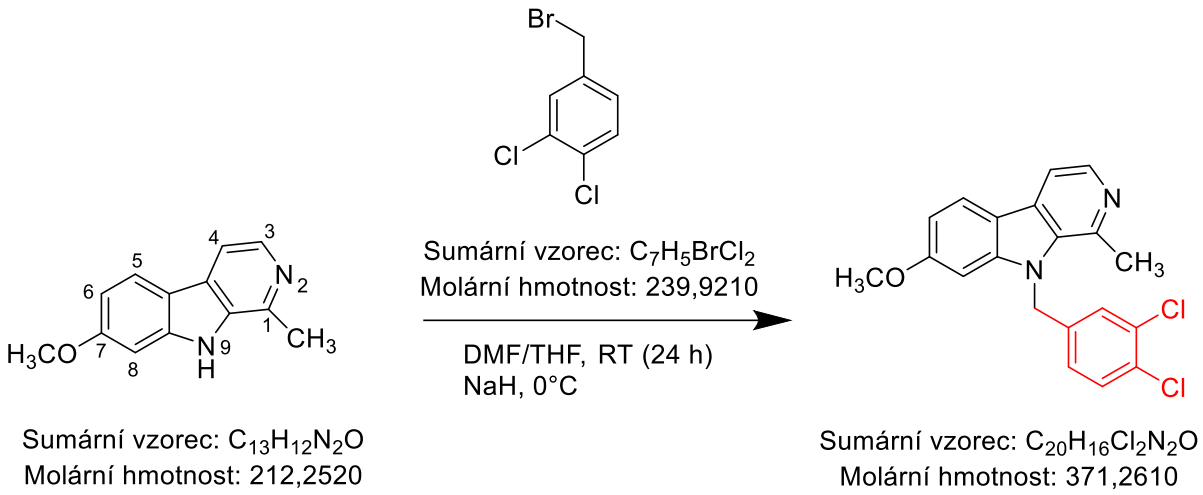
Obrázek 41: ESI-HRMS analýza HMA-17

NMR analýza

^{1}H NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ 8.29 (d, *J* = 5.3 Hz, 1H), 7.99 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 7.75 (d, *J* = 5.3, Hz, 1H), 6.89 (dd, *J* = 8.6 Hz, *J*=2.2 Hz, 1H), 6.75 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 6.32 (t, *J* = 2.2 Hz, 1H), 6.15 (d, *J* = 2.2 Hz, 2H), 5.63 (s, 2H), 3.85 (s, 3H), 3.67 (s, 6H), 2.85 (s, 3H).

^{13}C NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ 161.43, 161.08, 143.61, 141.07, 140.54, 138.76, 135.82, 129.42, 122.39, 115.20, 112.27, 109.23, 103.71, 98.70, 93.37, 55.64, 55.25, 48.31, 23.04.

4.3.17 Příprava 9-*N*-(3,4-dichlorobenzyl)harmin



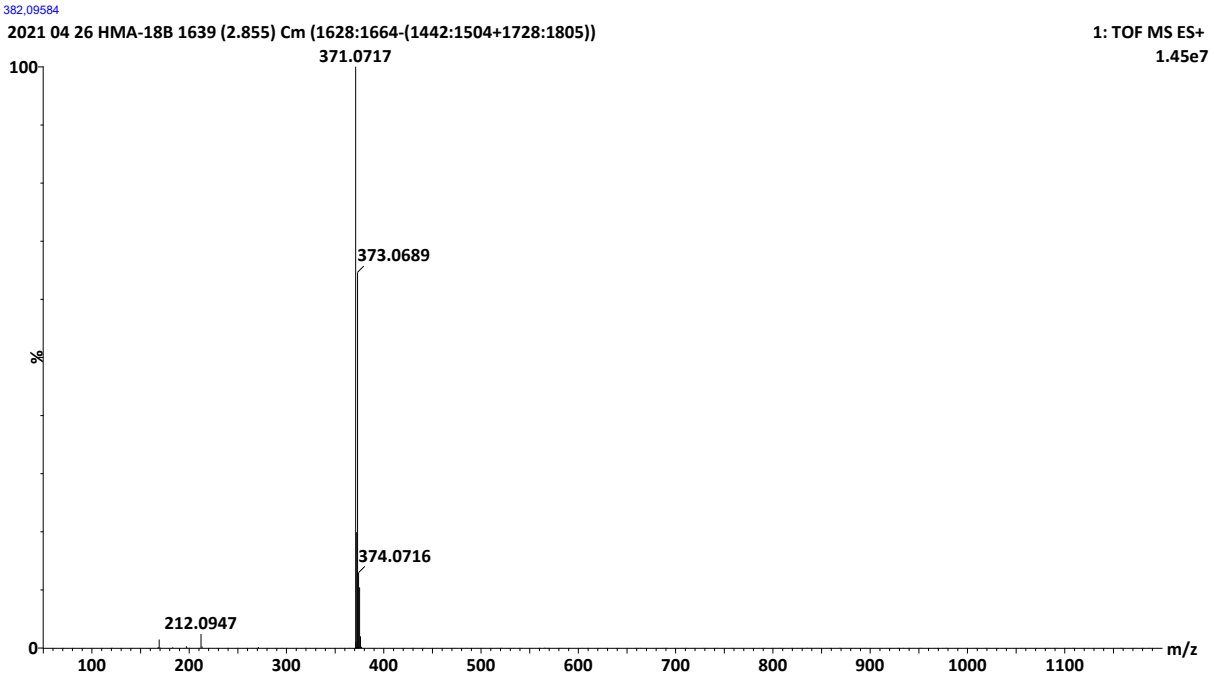
Obrázek 42: Schéma syntézy 9-*N*-(3,4-dichlorobenzyl)harminu

Ke 40 mg harminu byl přidán DMF a THF, NaH a 3,4-dichlorobenzylbromid jako alkylační činidlo. Reakce probíhala za předepsaných podmínek. Výtěžnost reakce byla 88 %.

MS analýza

ESI-MS *m/z* $[M+H]^+$ 371,1

ESI-HRMS *m/z* $[M+H]^+$ teoretická 371,0718, experimentální 371,0717



Obrázek 43: ESI-HRMS analýza HMA-18

NMR analýza

^{1}H NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ 8.32 (d, *J* = 5.3 Hz, 1H), 8.01 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 7.77 (d, *J* = 5.3 Hz, 1H), 7.33 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 7.15 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H), 6.92 (dd, *J* = 8.6, 2.1 Hz, 1H), 6.79 (dd, *J* = 8.3 Hz, *J* = 2.1 Hz, 1H), 6.68 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H), 5.65 (s, 2H), 3.86 (s, 3H), 2.82 (s, 3H).

^{13}C NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ 161.23, 143.21, 140.70, 139.14, 138.18, 135.53, 133.36, 131.78, 131.09, 129.64, 127.49, 124.84, 122.62, 115.35, 112.42, 109.33, 93.30, 55.68, 47.33, 23.02.

4.4 Metody pro screening biologických aktivit připravených sloučenin

4.4.1 Stanovení inhibiční aktivity derivátů proti AChE a BuChE

Stanovení inhibiční cholinesterasové aktivity vůči rekombinantní humánní AChE a sérové BuChE probíhalo na Katedře farmaceutické botaniky, Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy. Měření prováděla PharmDr. Daniela Hulcová, Ph.D. Nejprve byl proveden screening inhibiční aktivity derivátů při koncentraci 10 µm, následně byla stanovena hodnota IC_{50} u těch látek, které vykazovaly % inhibici při 10 µm > 50 %. Pro stanovení byla použita Ellmanova spektrofotometrická metoda. Podrobný popis této metody je uveden v literatuře[77].

4.4.2 Stanovení cytotoxické aktivity

U všech připravených derivátů byla měřena cytotoxická aktivita proti vybraným nádorovým liniím. Látky byly testovány na širokém spektru leukemických a nádorových linií:

Jurkat (akutní leukémie T-lymfocytů), MOLT-4 (akutní lymfoblastická leukémie), A549 (adenokarcinom plic), HT-29 (kolorektální adenokarcinom), PANC-1 (epiteliální karcinom slinivky), A2780 (karcinom vaječníku), HeLa (adenokarcinom děložního čípku), MCF-7 (adenokarcinom prsu), SAOS-2 (osteosarkom) a MRC-5 (zdravé plicní fibroblasty). Byla testována viabilita buněk 48 hodin po ovlivnění látkou při koncentraci 10 μM. Screening cytotoxické aktivity byl proveden ve spolupráci s Ústavem lékařské biochemie, Lékařské fakulty v Hradci Králové, Univerzity Karlovy, za využití kolorimetrické metody WST-1. Podrobnější popis této metody lze nalézt v uvedené literatuře[78]. Testování viability prováděl RNDr. Radim Havelek, Ph.D.

4.4.3 Stanovení inhibiční aktivity proti GSK-3β

U vybraných několika derivátů byla měřena inhibiční aktivita vůči enzymu GSK-3β. Studie byly provedeny s využitím reagenční soupravy Kinase-Glo získaného od společnosti Promega (Promega Biotech Iberica, S.L., Madrid, Španělsko) a s lidskou rekombinantní GSK-3β (Merck Millipore, Německo). Aktivita a inhibice GSK-3β byly studovány podle luminiscenční metody Baki. Studie byly provedeny za použití bílých 96-jamkových destiček. Přesný popis stanovení je popsán v uvedené literatuře[79]. Studie proběhly ve spolupráci s Univerzitou v Bologni v Itálii.

5. Výsledky

5.1 Příprava syntetických derivátů

Následující tabulka uvádí názvy připravených syntetických derivátů harminu, jejich označení a výtěžnosti jednotlivých syntéz v procentech.

Tabulka 3: Příprava syntetických derivátů

OZNAČENÍ	NÁZEV	VÝTĚŽNOST (%)
HMA-1	9-*N*-benzylharmin	95
HMA-2	9-*N*-(3-bromobenzyl)harmin	92
HMA-3	9-*N*-(4-bromobenzyl)harmin	95
HMA-4	9-*N*-(2-bromobenzyl)harmin	85
HMA-5	9-*N*-(4-methylbenzyl)harmin	93
HMA-6	*9*-*N*-(3-methylbenzyl)harmin	90
HMA-7	9-*N*-(4-isopropylbenzyl)harmin	88
HMA-8	9-*N*-(4-chlorobenzyl)harmin	94
HMA-9	9-*N*-(3-chlorobenzyl)harmin	90
HMA-10	9-*N*-(2-chlorobenzyl)harmin	89
HMA-12	9-*N*-(3-fluorobenzyl)harmin	88
HMA-13	9-*N*-(2-fluorobenzyl)harmin	85
HMA-14	9-*N*-(3-methoxybenzyl)harmin	91
HMA-15	9-*N*-(2,4-dimethylbenzyl)harmin	84
HMA-16	9-*N*-(3,5-dimethylbenzyl)harmin	85
HMA-17	9-*N*-(3,5-dimethoxybenzyl)harmin	82
HMA-18	9-*N*-(3,4-dichlorobenzyl)harmin	88

5.2 Screening biologických aktivit

5.2.1 Inhibiční aktivita derivátů proti AChE a BuChE

V následující tabulce je souhrn měření inhibičních aktivit připravených derivátů vůči lidské AChE a BuChE. Nejprve byla měřena inhibiční aktivita derivátů při koncentraci 10 µM, následně byla měřena hodnota IC_{50} nejaktivnějších derivátů.

Tabulka 4: Inhibiční aktivita derivátů proti AChE a BuChE

OZNAČENÍ	INHIBICE AChE PŘI 10 µM (%)	INHIBICE BuChE PŘI 10 µM (%)	IC_{50} AChE (µM)	IC_{50} BuChE (µM)
LITERATURA[80,81]	-	-	9,05 ± 1,08	75,07 ± 1,29
HMA	-	-	> 100	26,09 ± 1,05
HMA-1	17,51 ± 2,26	36,99 ± 2,12	> 10	> 10
HMA-2	27,58 ± 2,12	50,64 ± 1,19	> 10	11,43 ± 0,68
HMA-3	26,74 ± 0,7	51,13 ± 2,11	> 10	15,85 ± 1,29
HMA-4	11,92 ± 1,55	12,54 ± 1,21	> 10	> 10
HMA-5	20,31 ± 1,24	50,54 ± 1,31	> 10	44,14 ± 12,46
HMA-6	10,79 ± 1,93	39,65 ± 1,28	> 10	> 10
HMA-7	0	76,87 ± 0,50	> 10	2,50 ± 0,78
HMA-8	8,99 ± 1,42	33,17 ± 1,62	> 10	> 10
HMA-9	13,50 ± 1,32	69,42 ± 10,87	> 10	12,96 ± 1,47
HMA-10	8,04 ± 2,14	44,60 ± 1,72	> 10	> 10
HMA-12	11,77 ± 2,82	39,61 ± 1,93	> 10	> 10
HMA-13	m	m	m	m
HMA-14	11,43 ± 0,81	16,02 ± 1,25	> 10	> 10
HMA-15	29,60 ± 0,96	30,58 ± 2,07	> 10	> 10
HMA-16	25,05 ± 2,08	49,94 ± 1,34	> 10	> 10
HMA-17	20,94 ± 3,45	22,41 ± 1,95	> 10	> 10
HMA-18	30,57 ± 0,19	36,00 ± 1,31	> 10	> 10
GALANTHAMIN	-	-	1,71 ± 0,07	42,3 ± 1,3
ESERIN	-	-	0,063 ± 0,001	0,130 ± 0,004

m = měří se

5.2.2 Predikce průchodu látek přes hematoencefalickou bariéru

Tabulka 5: Predikce průchodu látek přes HEB pasivní difúzí

OZNAČENÍ	LogBB[1]
HMA	-0,141
HMA-2	0,472
HMA-3	0,472
HMA-5	0,440
HMA-7	0,473
HMA-9	-0,222
HMA-16	0,330

[1] Vypočteno přes http://www.way2drug.com/geb/

5.2.3 Inhibiční aktivita derivátů proti GSK-3β

Tabulka 6: Inhibiční aktivita derivátů proti GSK-3β

OZNAČENÍ	INHIBICE GSK-3β PŘI 10 μM (%)
HMA	7,79 ± 0,90
HMA-2	40,42±5,43
HMA-3	36,16±3,27
HMA-7	12,35±1,28
HMA-9	35,57±1,82
HMA-16	14,84±1,48

5.2.4 Cytotoxická aktivita

Tabulka 7: Cytotoxická aktivita

LÁTKA[1]	JURKAT	MOLT-4	A549	HT-29	PANC-1	A2780	HeLa	MCF-7	SAOS-2	MRC-5
HMA-1	60	81	84	90	92	69	77	89	90	88
smodch	4	5	9	1	4	2	6	6	9	10
HMA-2	81	72	104	128	119	150	82	112	111	122
smodch	10	10	12	12	13	29	11	10	1	16
HMA-3	58	77	79	80	90	79	63	89	94	79
smodch	8	25	18	13	8	15	5	7	13	8
HMA-4	63	72	73	85	95	66	60	93	92	66
smodch	4	14	10	5	10	5	8	9	4	14
HMA-5	63	86	84	80	89	70	73	89	95	83
smodch	3	7	14	5	13	5	7	3	8	15
HMA-6	40	77	93	104	94	65	79	93	98	98
smodch	1	4	2	1	7	1	7	2	5	16
HMA-8	74	77	86	96	105	72	64	100	101	75
smodch	4	17	5	3	1	3	7	2	6	10
HMA-9	119	88	115	140	112	157	88	117	115	122
smodch	14	6	2	4	15	31	1	2	2	10
HMA-10	36	84	86	88	94	76	72	91	91	95
smodch	3	7	4	2	2	9	2	10	3	9
HMA-12	117	83	96	122	115	143	85	112	108	114
smodch	2	6	5	4	6	16	2	7	2	9
HMA-14	47	74	96	104	89	71	82	96	97	100
smodch	1	6	2	7	4	5	3	3	4	11
HMA-15	56	78	91	84	90	69	76	94	95	93
smodch	2	8	3	2	3	4	2	2	3	9
HMA-16	5	20	78	81	77	40	38	71	59	111
smodch	1	7	11	9	5	2	11	6	12	13
HMA-17	8	44	95	92	87	45	58	78	80	107
smodch	4	14	9	6	4	3	8	6	6	10
HMA-18	84	78	85	112	109	78	66	106	106	107
smodch	10	14	2	11	12	3	0	8	8	9
DOX[2]	2	1	12	36	60	10	8	31	13	43
smodch	0	1	4	2	11	9	6	3	1	13

[1]c = 10 µmol/l; [2]Doxorubicin = standard smodch = směrodatná odchylka měření

6. Diskuse a závěr

Peganum harmala L., tradiční rostlina čínské medicíny, je známá pro své široké spektrum farmakologických aktivit. Díky svým léčebným účinkům je tato rostlina hojně využívána v asijských oblastech, především v Íránu. Hlavní léčivou částí rostliny jsou semena, která obsahují β-karbolinové a chinazolinové alkaloidy[82]. Pro svůj potenciál se rostlina stala předmětem studií také na Katedře farmakognozie a farmaceutické botaniky.

Z 300 g semen harmaly byl pomocí extrakce připraven alkaloidní extrakt, který obsahoval směs β-karbolinových a chinazolinových alkaloidů a dalších látek nealkaloidní povahy. Tento extrakt byl následně pomocí flash chromatografie rozdělen do několika frakcí. Pro účely této diplomové práce byla použita podfrakce označená jako PH-F1, obsahující 982 mg harminu, který byl následně ještě přečištěn pomocí preparativní TLC. Z takto chemicky čistého harminu byly inkorporací různých substituentů do polohy N^9 harminu připraveny chemickou reakcí jeho semisyntetické deriváty. Všechny deriváty byly přečištěny pomocí preparativní TLC a dále verifikovány pomocí LS-MS, ESI-HRMS a NMR analýzy. Bylo připraveno 17 syntetických derivátů alkaloidu harminu. Průměrná výtěžnost syntéz se pohybovala okolo 90 %. Po potvrzení identity a čistoty derivátů byla studována jejich biologická aktivita. Byla testována inhibiční aktivita látek proti lidské AChE a BuChE. Harmin sám o sobě je považován za inhibitor AChE. Dostupná literatura uvádí, že je harmin schopen procházet přes hematoencefalickou bariéru a inhibovat AChE. V literatuře však byly dosud měřeny inhibiční aktivity harminu na AChE z elektrického úhoře a BuChE z koňského séra[63,80,81]. Pro účely této práce byl harmin i jeho deriváty testovány s použitím lidských enzymů AChE a BuChE. Inhibiční aktivita samotného harminu byla na oba zmíněné enzymy minimální (IC_{50} AChE > 100 μM, IC_{50} BuChE 26,09 ± 1,05 μM), nicméně některé harminové deriváty vykazovaly zajímavý inhibiční efekt vůči lidské BuChE (inhibice BuChE při 10 μM > 50 %). Ze 17 připravených derivátů jich 6 vykázalo vysoký inhibiční potenciál proti BuChE. Konkrétně se jedná o 9-*N*-(3-bromobenzyl)harmin označený jako HMA-2, 9-*N*-(4-bromobenzyl)harmin označený jako HMA-3, 9-*N*-(4-methylbenzyl)harmin označený jako HMA-5, 9-*N*-(4-isopropylbenzyl)harmin (HMA-7), 9-*N*-(3-chlorobenzyl)harmin (HMA-9) a 9-*N*-(3,5-dimethylbenzyl)harmin označený jako HMA-16. Nejaktivnější derivát 9-*N*-(4-isopropylbenzyl)harmin vyšel ze studií s hodnotou IC_{50} BuChE 2,50 ± 0,78 μM. Na základě těchto výsledků bychom mohli předpokládat vyšší inhibiční efekt látek, které mají substituované benzenové jádro v poloze 3 nebo 4, ačkoliv tato

domněnka se nepotvrdila ve všech případech. Proti lidské AChE však žádná z připravených látek nepůsobila významnějším inhibičním vlivem. Oba zmíněné enzymy, AChE i BuChE, hrají významnou roli v patogenezi AD. Cholinergní teorie je jedna z nejstarších hypotéz vzniku AD. Aktivita AChE je u pacientů s AD snížena a tím pádem vzniká nedostatek cholinu pro syntézu acetylcholinu de novo. V minulosti byl hlavní význam přikládán pouze AChE, nicméně v posledních letech se do popředí dostává též druhý esterasový enzym, BuChE. Její aktivita je, především v pozdějších stádiích demence, u pacientů s AD zvýšena. Především v oblasti hipokampu je koncentrace BuChE výrazně zvýšena, což je tkáň vysoce související s kognitivními funkcemi. Kromě toho je BuChE dávána do souvislosti s fosforylací τ-proteinu a se vznikem Aβ a neurozánětem, což jsou další významné faktory v patogenezi AD. Duální inhibitor obou enzymů by byl tedy ideálním řešením pro zvýšení koncentrace acetylcholinu, jehož deficit je podstatou cholinergní hypotézy[17,83]. Nicméně patofyziologie AD je mnohem komplexnější. Další významnou teorií vzniku AD je hyperfosforylace τ-proteinu, na níž se mimo jiné podílí i enzym GSK-3β[3,17]. V rámci této diplomové práce byla testována též inhibiční aktivita harminu a některých jeho derivátů proti enzymu GSK-3β ve spolupráci s Univerzitou v Bologni v Itálii. Z derivátů byly testovány ty, které v předchozích studiích inhibičního vlivu vůči cholinesterasam vykázaly významnější inhibiční efekt. Nicméně žádný z těchto derivátů ani samotný harmin neprojevily výraznou inhibiční aktivitu na GSK-3β (% inhibice při 10 μM byla < 50 %).

Pro to, aby mohly látky působit v CNS, musejí být schopny přechodu přes hematoencefalickou bariéru. Pro predikci průchodu připravených derivátů přes HEB byla vypočítána hodnota logBB. LogBB je hodnota, která vyjadřuje predikci průchodu látek přes HEB pasivní difúzí a je definována jako logaritmický poměr mezi koncentrací sloučeniny v mozku a krvi. Látky, které nabývají hodnot logBB > 0,3 přestupují přes HEB velmi snadno, látky s hodnotami 0,3 > logBB > -1 mohou stále přestupovat přes HEB. Pokud však sloučeniny nabývají hodnot logBB < -1,0, jejich prostup je značně omezený[84]. Všechny deriváty vykázaly potenciál pro přechod přes HEB, většina derivátů vyšla ze studií s lepší hodnotou než samotný harmin, můžeme tedy teoreticky předpokládat schopnost sloučenin procházet přes HEB a působit tak v CNS. Navíc je známo, že harmin prochází přes HEB do mozku a inhibuje v mozku MAO a při vyšších koncentracích vyvolává halucinogenní účinky[48]. Pro ověření a potvrzení této

teorie přechodu připravených derivátů přes HEB by však bylo nutné experimentální testování látek.

Peganum harmala je také využívána k terapii nádorových onemocnění v různých částech světa, nejvíce v Asii. Protinádorový efekt je přisuzován především harminu. Hlavní mechanismus tohoto účinku je interkalace do DNA a inhibice topoisomerasy I, což vede k narušení syntézy DNA. Na základě studií mezi strukturou látek a účinkem bylo zjištěno, že zavedením substituentů do určitých pozic harminu zvyšuje cytotoxické působení. Osvědčila se substituce v poloze N^9 harminu, kterou také následovaly deriváty připravené v rámci této diplomové práce[72,73,74]. Screening viability připravených derivátů byl proveden na širokém spektru nádorových a leukemických linií ve spolupráci s Lékařskou fakultou v Hradci Králové Univerzity Karlovy. Látky byly testovány na liniích Jurkat (akutní leukémie T-lymfocytů), MOLT-4 (akutní lymfoblastická leukémie), A549 (adenokarcinom plic), HT-29 (kolorektální adenokarcinom), PANC-1 (epiteliální karcinom slinivky), A2780 (karcinom vaječníku), HeLa (adenokarcinom děložního čípku), MCF-7 (adenokarcinom prsu), SAOS-2 (osteosarkom) a MRC-5 (zdravé plicní fibroblasty). Jako standard pro testování látek byl použit doxorubicin. Většina testovaných derivátů vykázala určitý cytotoxický potenciál vůči nádorovým liniím Jurkat, A2780 a HeLa. Mezi nejvíce aktivní deriváty patřily 9-*N*-(3-methylbenzyl)harmin označený jako HMA-6 (viabilita buněk po 48 hodinách po ovlivnění látkou při koncentraci 10 µM 40 %), 9-*N*-(2-chlorobenzyl)harmin označený jako HMA-10 (36 %) a 9-*N*-(3-methoxybenzyl)harmin označený jako HMA-14 (47 %). Jejich cytotoxické působení bylo nejvyšší na nádorové linie Jurkat, tedy akutní leukémie T-lymfocytů. Nejaktivnějšími deriváty byly HMA-16 (9-*N*-(3,5-dimethylbenzyl)harmin) a HMA-17 (9-*N*-(3,5-dimethoxybenzyl)harmin). Oba zmíněné deriváty projevily vysoký cytotoxický potenciál na nádorové linie Jurkat (viabilita buněk po 48 hodinách po ovlivnění látkou při koncentraci 10 µM HMA-16 5 %, HMA-17 8 %) a MOLT-4 (HMA-16 20 %, HMA-17 44 %), HMA-16 byl aktivní též na linii HeLa (38 %). Obě dvě látky byly substituovány v polohách 3 a 5 benzenového jádra, můžeme tedy předpokládat určitou souvislost mezi disubstitucí v těchto polohách a cytotoxickým působením, nicméně k potvrzení této domněnky by musely být připraveny a provedeny další rozsáhlé studie.

Na základě provedených biologických studií a jejích výsledků můžeme konstatovat, že harmin se jeví jako perspektivní cíl pro přípravy dalších derivátů, jejichž aktivitní potenciál by

mohl být zaměřen jak na oblast terapie neurodegenerativních onemocnění typu Alzheimerovy demence, tak také na cytotoxický screening s možným uplatněním látek v terapii nádorových onemocnění.

7. Seznam použitých zkratek

Aβ	beta-amyloid
ACh	acetylcholin
AChE	acetylcholinesterasa
AD	Alzheimerova demence
AMPA	receptor kyseliny α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol propionové
ApoE	apolipoprotein E
APP	amyloidový prekurzorový protein
ATP	adenosintrifosfát
BuChE	butyrylcholinesterasa
CNS	centrální nervový systém
CT	počítačová tomografie
CYP1A1	izoforma cytochromu P450
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina, nese genetickou informaci organismu
DYRK1A	duálně specifická tyrosin-fosforylačně regulovaná kinasa 1A
EBM	evidence based medicine (medicína založená na důkazech)
ESI-HRMS	hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením
Fas	transmembránový receptor
FDA	Food and Drug Administration (americký Úřad pro kontrolu potravin a léčiv)
GABA	kyselina γ-aminomáselná, neurotransmiter
GC-MS	plynová chromatografie spojená s hmotnostním spektrometrem
GLT-1	glutamátový transportér
GSK-3β	glykogen-syntasa kinasa 3β
HDL	high density lipoprotein (lipoprotein s vysokou hustotou)
HSV-2	herpes simplex virus typu 2
IC_{50}	koncentrace inhibitoru, při které poklesne aktivita enzymu o 50 %
IL-1	interleukin 1
LC-MS	kapalinová chromatografie spojená s hmotnostním spektrometrem
LDL	low density lipoprotein (lipoprotein s nízkou hustotou)
LLE	extrakce kapalina-kapalina (liquid-liquid extraction)
MAO	monoaminooxidasa

MF	mobilní fáze
MMSE	Mini-Mental State Examination
MRI	magnetická rezonance
NMDA	*N*-methyl-D-aspartátový receptor
NMR	nukleární magnetická rezonance
NSAIDS	nesteroidní antiflogistika
p53	jaderný protein, transkripční faktor fungující jako senzor poškození DNA
POP	prolyloligopeptidasa
PPAR-γ	receptor gamma aktivovaný peroxisomovým proliferátorem
RONS	reaktivní formy kyslíku a dusíku
ROS	reaktivní formy kyslíku
sAPP-α	neamyloidogenní fragment APP
sAPP-β	amyloidogenní fragment APP
SAR	vztah mezi strukturou a účinkem (structure-activity relationship)
TCDD	2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin, prokázaný karcinogen
TFAA	anhydrid kyseliny trifluoroctové
TLC	tenkovrstvá chromatografie

8. Přehled obrázků

Obrázek 1: Klasický průběh Alzheimerovy choroby 13

Obrázek 2: Řez zdravým mozkem (vlevo) a mozkem postiženým středně těžkou formou AD (vpravo) 16

Obrázek 3: Peganum harmala L. (foto prof. Lubomír Opletal) 23

Obrázek 4: Struktury hlavních alkaloidů z Peganum harmala 28

Obrázek 5: Zjednodušené schéma syntézy β-karbolinových alkaloidů 29

Obrázek 6: Harmin 30

Obrázek 7: Struktura harminu 34

Obrázek 8: Průběh reakce - detekce Dragendorffovým činidlem (vlevo), detekce pod UV lampou při λ = 254 nm (vpravo) 40

Obrázek 9: Obecné schéma přípravy derivátů harminu 43

Obrázek 10: Schéma syntézy 9-*N*-benzylharminu 43

Obrázek 11: ESI-HRMS analýza HMA-1 44

Obrázek 12: Schéma syntézy 9-*N*-(3-bromobenzyl)harminu 45

Obrázek 13: ESI-HRMS analýza HMA-2 45

Obrázek 14: Schéma syntézy 9-*N*-(4-bromobenzyl)harminu 46

Obrázek 15: ESI-HRMS analýza HMA-3 47

Obrázek 16: Schéma syntézy 9-*N*-(2-bromobenzyl)harminu 48

Obrázek 17: ESI-HRMS analýza HMA-4 48

Obrázek 18: Schéma syntézy 9-*N*-(4-methylbenzyl)harminu 49

Obrázek 19: ESI-HRMS analýza HMA-5 50

Obrázek 20: Schéma syntézy 9-*N*-(3-methylbenzyl)harminu 51

Obrázek 21: ESI-HRMS analýza HMA-6 51

Obrázek 22: Schéma syntézy 9-*N*-(4-isopropylbenzyl)harminu 52

Obrázek 23: ESI-HRMS analýza HMA-7 53

Obrázek 24: Schéma syntézy 9-*N*-(4-chlorobenzyl)harminu 53

Obrázek 25: ESI-HRMS analýza HMA-8 54

Obrázek 26: Schéma syntézy 9-*N*-(3-chlorobenzyl)harminu 55

Obrázek 27: ESI-HRMS analýza HMA-9 55

Obrázek 28: Schéma syntézy 9-*N*-(2-chlorobenzyl)harminu 56

Obrázek 29: ESI-HRMS analýza HMA-10 57

Obrázek 30: Schéma syntézy 9-*N*-(3-fluorobenzyl)harminu 58
Obrázek 31: ESI-HRMS analýza HMA-12 58
Obrázek 32: Schéma syntézy 9-*N*-(2-fluorobenzyl)harminu 59
Obrázek 33: ESI-HRMS analýza HMA-13 60
Obrázek 34: Schéma syntézy 9-*N*-(3-methoxybenzyl)harminu 61
Obrázek 35: ESI-HRMS analýza HMA-14 61
Obrázek 36: Schéma syntézy 9-*N*-(2,4-dimethylbenzyl)harminu 62
Obrázek 37: ESI-HRMS analýza HMA-15 63
Obrázek 38: Schéma syntézy 9-*N*-(3,5-dimethylbenzyl)harminu 64
Obrázek 39: ESI-HRMS analýza HMA-16 64
Obrázek 40: Schéma syntézy 9-*N*-(3,5-dimethoxybenzyl)harminu 65
Obrázek 41: ESI-HRMS analýza HMA-17 65
Obrázek 42: Schéma syntézy 9-*N*-(3,4-dichlorobenzyl)harminu 66
Obrázek 43: ESI-HRMS analýza HMA-18 67

9. Přehled tabulek

Tabulka 1: Rozdělení frakcí pomocí flash chromatografie 38

Tabulka 2: Rozdělení frakce C z flash chromatografie 39

Tabulka 3: Příprava syntetických derivátů 69

Tabulka 4: Inhibiční aktivita derivátů proti AChE a BuChE 70

Tabulka 5: Predikce průchodu látek přes HEB pasivní difúzí 71

Tabulka 7: Inhibiční aktivita derivátů proti GSK-3β 71

Tabulka 6: Cytotoxická aktivita 72

10. Literatura

[1] LI, S., ZHANG, Y., DENG, G., et al. Exposure Characteristics of the Analogous β-Carboline Alkaloids Harmaline and Harmine Based on the Efflux Transporter of Multidrug Resistance Protein 2. *Frontiers in Pharmacology* [online]. 2017, 8 [cit. 2022-01-03]. ISSN 1663-9812.

[2] ZHANG, Y., LI, S.,WANG, Y. et al. Potential Pharmacokinetic Drug–Drug Interaction Between Harmine, a Cholinesterase Inhibitor, and Memantine, a Non-Competitive N-Methyl-d-Aspartate Receptor Antagonist. *Molecules* [online]. 2019, 24(7) [cit. 2022-01-04]. ISSN 1420-3049.

[3] ZVĚŘOVÁ, M. *Alzheimerova demence*. Praha: Grada Publishing, 2017. Psyché (Grada). ISBN 978-80-271-0561-8.

[4] IRANSHAHY, M., FAZLI BAZAZ, S., HARIRIZADEH, G., ABOOTORABI, B., MOHAMADI, A., KHASHYARMANESH, Z. Chemical composition and antibacterial properties of Peganum harmala L.. *Avicenna Journal of Phytomedicine*. 2019, 9(6), 530-537.

[5] MANZOOR, S., HODA, N. A comprehensive review of monoamine oxidase inhibitors as Anti-Alzheimer's disease agents: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry* [online]. 2020, 206 [cit. 2022-01-05]. ISSN 02235234.

[6] AHMED, F., GHALIB, R.M., SASIKALA, P., MUEEN AHMED, K.K. Cholinesterase inhibitors from botanicals. *Pharmacognosy Reviews* [online]. 2013, 7(14) [cit. 2022-01-08]. ISSN 0973-7847.

[7] YANG, Y., CHENG, X., LIU, W., CHOU, G., WANG, Z., WANG, C. Potent AChE and BChE inhibitors isolated from seeds of Peganum harmala Linn by a bioassay-guided fractionation. *Journal of Ethnopharmacology* [online]. 2015, 168, 279-286 [cit. 2022-01-08]. ISSN 03788741.

[8] VLČEK, J., FIALOVÁ D., VYTŘÍSALOVÁ M. *Klinická farmacie*. Praha: Grada, 2014. ISBN 978-80-247-3169-8.

[9] JIRÁK, R. *Demence*. Praha: Maxdorf, c1999. ISBN 80-85800-44-6.

[10] JIRÁK, R., KOUKOLÍK, F. *Demence: neurobiologie, klinický obraz, terapie*. Praha: Galén, c2004. ISBN 80-7262-268-4.

[11] REKTOROVÁ, I. *Kognitivní poruchy a demence*. Praha:Triton, 2007. ISBN 978-80-7387.017-1.

[12] https://www.alzheimer.cz/alzheimerova-choroba/vyskyt-demence/ (staženo 26.12.2021)

[13] KOUKOLÍK, F., JIRÁK, R. *Alzheimerova nemoc a další demence*. Praha: Grada, 1998. ISBN 80-7169-615-3.

[14] AMES, D., O´BRIEN, J.T., BURNS, A. *Dementia*. 5. Boca Raton, FL: CRC Press, 2017. ISBN 978-1-4987-0310-9.

[15] ARMSTRONG, R.A. Risk factors for Alzheimer's disease. *Folia Neuropathologica* [online]. 2019, 57(2), 87-105 [cit. 2021-12-27]. ISSN 1641-4640.

[16] JANOUTOVÁ, J., KOVALOVÁ, M., AMBROZ, P. et al. Possible prevention of Alzheimer's disease. *Česká a slovenská neurologie a neurochirurgie* [online]. 2020, 83/116(1), 28-32 [cit. 2021-10-16]. ISSN 12107859.

[17] KORÁBEČNÝ, J., SOUKUP, O., VALIŠ, M. *Alzheimerova nemoc: patofyziologie, klinika, farmakoterapie*. Praha: Maxdorf, [2020]. Jessenius. ISBN 978-80-7345-643-6.

[18] PIDRMAN, V. *Demence*. Praha: Grada, 2007. Psyché (Grada). ISBN 978-80-247-1490-5.

[19] RŮŽIČKA, E., ŠONKA, K., MARUSIČ, P., RUSINA, R. *Neurologie*. Praha: Stanislav Juhaňák - Triton, 2019. ISBN 9788075536815.

[20] FRANJESEVIC, A.J., SILLART, S.B., BECK, J.M., VYAS, S., CALLAM, C.S., HADAD, C.M. Resurrection and Reactivation of Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase. *Chemistry – A European Journal* [online]. 2019, 25(21), 5337-5371 [cit. 2022-01-06]. ISSN 0947-6539.

[21] WANG, X., WANG, W., LI, L., PERRY, G., LEE, H., ZHU, X. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* [online]. 2014, 1842(8), 1240-1247 [cit. 2021-10-25]. ISSN 09254439.

[22] SIATKA, T., ADAMCOVÁ, M., OPLETAL, L., CAHLÍKOVÁ, L., DJUN, D., HRABINOVÁ, M., KUNEŠ, J., CHLEBEK, J. Cholinesterase and Prolyl Oligopeptidase Inhibitory Activities of Alkaloids from Argemone platyceras (Papaveraceae). *Molecules* [online]. 2017, 22(7) [cit. 2021-10-30]. ISSN 1420-3049.

[23] SZETO, Y.Y., LEWIS, Jennifer a Simon J.G.. Current Treatment Options for Alzheimer's Disease and Parkinson's Disease Dementia. *Current Neuropharmacology* [online]. 2016, 14(4), 326-338 [cit. 2021-11-14]. ISSN 1570159X.

[24] WANG, R., TANG, X. C.. Neuroprotective Effects of Huperzine A. *Neurosignals* [online]. 2005, 14(1-2), 71-82 [cit. 2021-11-15]. ISSN 1424-862X.

[25] YANG, M., WU, S., YOU, W., JAISI, A., XIAO, Y.. Selection of Reference Genes for Expression Analysis in Chinese Medicinal Herb Huperzia serrata. *Frontiers in Pharmacology* [online]. 2019, 10 [cit. 2021-11-19]. ISSN 1663-9812.

[26] YANG, G., WANG, Y., TIAN, J., LIU, J-P., SCHERER, R.W.. Huperzine A for Alzheimer's Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Clinical Trials. *PLoS ONE* [online]. 2013, 8(9) [cit. 2021-11-15]. ISSN 1932-6203.

[27] https://www.novabotanika.eu/Jedovate_rostliny_medicina.html (staženo 19.11.2021)

[28] Padda, I.S., Parmar M. Aducanumab. 2021 Aug 12. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021 Jan–. PMID: 34424635.

[29] PHIZACKERLEY, D. Aducanumab for Alzheimer's disease – too many unanswered questions. *Drug and Therapeutics Bulletin* [online]. 2021, 59(9), 130-130 [cit. 2021-12-28]. ISSN 0012-6543.

[30] FILLIT, H., GREEN, A. Aducanumab and the FDA — where are we now? *Nature Reviews Neurology* [online]. 2021, 17(3), 129-130 [cit. 2021-12-28]. ISSN 1759-4758.

[31] SHEARDOVÁ, K., HORT, J., RUSINA, R., BARTOŠ, A., LÍNEK, V., RESSNER, P., REKTOROVÁ, I. Doporučené postupy pro terapii Alzheimerovy nemoci a ostatních demencí. *Neurologie pro praxi*. 2009, roč. 10, č. 1, s. 28-31. ISSN 1213-1814.

[32] DRTINOVÁ, L., POHANKA, M. Alzheimerova demence: aspekty současné farmakologické léčby. *Česká a slovenská farmacie* [online].2011, č.5, 60, 219-228. ISSN 1805-4439.

[33] ALI, A.A., KHALIL, M.G., ABD EL-LATIF, D.M., OKDA, T., ABDELAZIZ, A.I., ABU-ELFOTUH, K., KAMAL, M.M., WAHID, A. The influence of vinpocetine alone or in combination with Epigallocatechin-3-gallate, Coenzyme COQ10, Vitamin E and Selenium as a potential neuroprotective combination against aluminium-induced Alzheimer's disease in Wistar Albino Rats. *Archives of Gerontology and Geriatrics* [online]. 2022, 98 [cit. 2022-01-02]. ISSN 01674943.

[34] ICER, M.A., ARSLAN,N., GEZMEN-KARADAG, M. Effects of vitamin E on neurodegenerative diseases: an update. *Acta Neurobiologiae Experimentalis* [online]. 2021, 81(1), 21-33 [cit. 2021-12-27]. ISSN 0065-1400.

[35] GAVRILOVA, S.I., ALVAREZ, A. Cerebrolysin in the therapy of mild cognitive impairment and dementia due to Alzheimer's disease: 30 years of clinical use. *Medicinal Research Reviews* [online]. 2021, 41(5), 2775-2803 [cit. 2021-12-27]. ISSN 0198-6325.

[36] BINDU, S., MAZUMDER, S. BANDYOPADHYAY, U. Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and organ damage: A current perspective. *Biochemical Pharmacology* [online]. 2020, 180 [cit. 2021-12-27]. ISSN 00062952.

[37] SCHEYER, O., RAHMAN, A., HRISTOV, H., BERKOWITZ, C., ISAACSON, R.S., DIAZ BRINTON, R., MOSCONI, L. Female Sex and Alzheimer's Risk: The Menopause Connection. *The Journal Of Prevention of Alzheimer's Disease* [online]. 2018, , 1-6 [cit. 2021-12-28]. ISSN 22745807.

[38] XUAN, K., ZHAO, T., QU, G., LIU, H., CHEN, X., SUN, Y. The efficacy of statins in the treatment of Alzheimer's disease: a meta-analysis of randomized controlled trial. *Neurological Sciences* [online]. 2020, 41(6), 1391-1404 [cit. 2021-12-28]. ISSN 1590-1874.

[39] https://www.biolib.cz/cz/taxon/id207262/ (staženo 18.12.2021)

[40] https://apps.faf.cuni.cz/daidalea/PlantSpecies.asp?id=10260 (staženo 20.12.2021)

[41] WOUTERSEN, A., JARDINE, P.E., BOGOTÁ-ANGEL, R.G. et al. A novel approach to study the morphology and chemistry of pollen in a phylogenetic context, applied to the halophytic taxon Nitraria L.(Nitrariaceae). *PeerJ* [online]. 2018, 6 [cit. 2021-12-25]. ISSN 2167-8359.

[42] DU, Q., XIN, H.,PENG, C. Pharmacology and phytochemistry of the Nitraria genus (Review). *Molecular Medicine Reports* [online]. 2015, 11(1), 11-20 [cit. 2021-12-25]. ISSN 1791-2997.

[43] SENEJOUX, F., GIRARD, C., AISA, H.A., BAKRI, M., KERRAM, P., BERTHELOT, A., BÉVALOT, F., DEMOUGEOT, C. Vasorelaxant and hypotensive effects of a hydroalcoholic extract from the fruits of Nitraria sibirica Pall. (Nitrariaceae). *Journal of Ethnopharmacology* [online]. 2012, 141(2), 629-634 [cit. 2021-12-26]. ISSN 03788741.

[44] VORONKOVA, M., BANAEV, E., TOMOSHEVICH, M., AK-LAMA, T., BANAEV, E.V., TOMOSHEVICH, M.A., ZAYTSEVA, Y.G. Possibilities of using the HPLC method in the taxonomy of the genus Nitraria (Nitrariaceae). *BIO Web of Conferences* [online]. 2020, 24 [cit. 2021-12-26]. ISSN 2117-4458.

[45] https://botany.cz/cs/peganum-harmala/ (staženo 20.12.2021)

[46] SHARIFI-RAD, J., QUISPE, C., HERRERA-BRAVO, J. et al. Peganum spp: A Comprehensive Review on Bioactivities and Health-Enhancing Effects and Their Potential for the Formulation of Functional Foods and Pharmaceutical Drugs. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* [online]. 2021, 1-20 [cit. 2021-12-21]. ISSN 1942-0994.

[47] LI, S., CHENG, X., WANG, Ch. A review on traditional uses, phytochemistry, pharmacology, pharmacokinetics and toxicology of the genus Peganum. *Journal of Ethnopharmacology* [online]. 2017, 203, 127-162 [cit. 2021-12-21]. ISSN 03788741.

[48] MOLOUDIZARGARI, M., MIKAILI, P., AGHAJANSHAKERI, S., ASGHARI, M. H., SHAYEGH, J.. Pharmacological and therapeutic effects of Peganum harmala and its main alkaloids. *Pharmacognosy Reviews* [online]. 2013, 7(14) [cit. 2021-11-21]. ISSN 0973-7847.

[49] EL-BAKATOUSHI, R., AHMED, D.G.A. Evaluation of genetic diversity in wild populations of Peganum harmala L., a medicinal plant. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology* [online]. 2018, 16(1), 143-151 [cit. 2021-12-23]. ISSN 1687157X.

[50] ASGARPANAH, J.. Chemistry, pharmacology and medicinal properties of Peganum harmala L. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology* [online]. 2012, 6(22) [cit. 2021-11-20]. ISSN 19960816.

[51] Darabpour, E., Poshtkouhian Bavi, A., Motamedi, H., Seyyed Nejad, SM. Antibacterial activity of different parts of Peganum harmala L. growing in Iran against multi-drug resistant bacteria. *EXCLI J*. 2011;10:252-263.

[52] FAYVUSH, G., ALEKSANYAN, A., MEHDIYEVA, N.P., ALIZADE, V.M., ZAMBRANA, N.Y.P., BUSSMANN, R.W. Peganum harmala L. Nitrariaceae. *Ethnobotany of the Caucasus* [online]. Cham: Springer International Publishing, 2017, 2017-06-29, s. 463-467 [cit. 2021-12-26]. European Ethnobotany. ISBN 978-3-319-49411-1.

[53] WANG, Ch., ZHANG, Z., WANG, Y., HE, X. Cytotoxic Indole Alkaloids against Human Leukemia Cell Lines from the Toxic Plant Peganum harmala. *Toxins* [online]. 2015, 7(11), 4507-4518 [cit. 2021-12-24]. ISSN 2072-6651.

[54] HAIDER, S., ALHUSBAN, M., CHAURASIYA, N.D., TEKWANI, B.L., CHITTIBOYINA, A.G., KHAN, I.A. Isoform selectivity of harmine-conjugated 1,2,3-triazoles against human monoamine oxidase. *Future Medicinal Chemistry* [online]. 2018, 10(12), 1435-1448 [cit. 2022-01-02]. ISSN 1756-8919.

[55] HAMILL, J., HALLAK, J., DURSUN, S.M., BAKER, G. Ayahuasca: Psychological and Physiologic Effects, Pharmacology and Potential Uses in Addiction and Mental Illness. *Current Neuropharmacology* [online]. 2019, 17(2), 108-128 [cit. 2022-01-02]. ISSN 1570159X.

[56] ZHAO, T., HE,Y., WANG, J., DING, K., WANG, C., WANG, Z. Inhibition of Human Cytochrome P450 Enzymes 3A4 and 2D6 by β-Carboline Alkaloids, Harmine Derivatives. *Phytotherapy Research* [online]. 2011, 25(11), 1671-1677 [cit. 2021-12-31]. ISSN 0951418X.

[57] JAIN, S., PANUGANTI, V., JHA, S., ROY, I. Harmine Acts as an Indirect Inhibitor of Intracellular Protein Aggregation. *ACS Omega* [online]. 2020, 5(11), 5620-5628 [cit. 2022-01-03]. ISSN 2470-1343.

[58] DJAMSHIDIAN, A., BERNSCHNEIDER-REIF, S., POEWE, W., LEES, A.J. Banisteriopsis caapi , a Forgotten Potential Therapy for Parkinson's Disease? *Movement Disorders Clinical Practice* [online]. 2016, 3(1), 19-26 [cit. 2021-12-30]. ISSN 23301619.

[59] SPILKOVÁ, J. *Farmakognozie*. Praha: Univerzita Karlova v Praze, nakladatelství Karolinum, 2016. ISBN 978-80-246-3264-3.

[60] BERLIN, J., RÜGENHAGEN, Ch., GREIDZIAK, N., KUZOVKINA, I.N., WITTE, L., WRAY, V. Biosynthesis of serotonin and β-carboline alkaloids in hairy root cultures of Peganum harmala. *Phytochemistry* [online]. 1993, 33(3), 593-597 [cit. 2021-12-23]. ISSN 00319422.

[61] Allen, J.R.F., Holmstedt, B.R. The simple β-carboline alkaloids. *Phytochemistry* [online]. Volume 19, Issue 8, 1980, Pages 1573-1582, ISSN 0031-9422.

[62] TELEZHENETSKAYA, M. V., YUNUSOV, S.Y. Alkaloids ofPeganum harmala. *Chemistry of Natural Compounds* [online]. 1977, 13(6), 613-624 [cit. 2021-12-23]. ISSN 0009-3130.

[63] JIANG, B., MENG, L., ZOU, N. et al. Mechanism-based pharmacokinetics-pharmacodynamics studies of harmine and harmaline on neurotransmitters regulatory effects in healthy rats: Challenge on monoamine oxidase and acetylcholinesterase inhibition. *Phytomedicine* [online]. 2019, 62 [cit. 2022-01-06]. ISSN 09447113.

[64] FILALI, I., BOUAJILA, J., ZNATI, M., BOUSEJRA-EL GARAH, F., BEN JANNET, H. Synthesis of new isoxazoline derivatives from harmine and evaluation of their anti-Alzheimer, anti-cancer and anti-inflammatory activities. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* [online]. 2014, 30(3), 371-376 [cit. 2022-01-06]. ISSN 1475-6366.

[65] RÉUS, G.Z., STRINGARI, R.B., DE SOUZA, B. et al. Harmine and Imipramine Promote Antioxidant Activities in Prefrontal Cortex and Hippocampus. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* [online]. 2010, 3(5), 325-331 [cit. 2022-01-03]. ISSN 1942-0900.

[66] FROST, D., MEECHOOVET, B., WANG, T., GATELY, S., GIORGETTI, M., SHCHERBAKOVA, I., DUNCKLEY, T. SKOULAKIS, E.M.C. B-Carboline Compounds, Including Harmine, Inhibit DYRK1A and Tau Phosphorylation at Multiple Alzheimer's Disease-Related Sites. *PLoS ONE* [online]. 2011, 6(5) [cit. 2022-01-02]. ISSN 1932-6203.

[67] ZHANG, L., LI, D., YU, S.. Pharmacological effects of harmine and its derivatives: a review. *Archives of Pharmacal Research* [online]. 2020, 43(12), 1259-1275 [cit. 2021-11-20]. ISSN 0253-6269.

[68] BENZEKRI, R., BOUSLAMA, L., PAPETTI, A., HAMMAMI, M., SMAOUI, A., LIMAM, F.. Anti HSV-2 activity of Peganum harmala (L.) and isolation of the active compound. *Microbial Pathogenesis* [online]. 2018, 114, 291-298 [cit. 2021-11-22]. ISSN 08824010.

[69] YAMAZAKI, Y., KAWANO, Y.. Inhibitory Effects of Herbal Alkaloids on the Tumor Necrosis Factor-.ALPHA. and Nitric Oxide Production in Lipopolysaccharide-Stimulated RAW264 Macrophages. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* [online]. 2011, 59(3), 388-391 [cit. 2021-11-29]. ISSN 0009-2363.

[70] EL GENDY, M. A. M., EL-KADI, A. O. S.. Harmine and Harmaline Downregulate TCDD-Induced Cyp1a1 in the Livers and Lungs of C57BL/6 Mice. *BioMed Research International* [online]. 2013, 1-9 [cit. 2021-12-07]. ISSN 2314-6133.

[71] Panahi, Y., Saadat, A., Seifi, M., Rajaee, M., Butler, A.E., Sahebkar, A. Effects of Spinal-Z in Patients with Gastroesophageal Cancer. *J Pharmacopuncture*. 2018;21(1):26-34.

[72] ZHANG, X-F., SUN, R-Q., JIA, Y-f. et al. Synthesis and mechanisms of action of novel harmine derivatives as potential antitumor agents. *Scientific Reports* [online]. 2016, 6(1) [cit. 2021-12-16]. ISSN 2045-2322.

[73] CHAO, R., CHEN, Q., HOU, X., CHEN, H., GUAN, H., MA, Y., PENG, W., XU, A.. Synthesis, acute toxicities, and antitumor effects of novel 9-substituted β-carboline derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* [online]. 2004, 12(17), 4613-4623 [cit. 2021-12-16]. ISSN 09680896.

[74] CHEN, Q., CHAO, R., CHEN, H., HOU, X., YAN, H., ZHOU, S., PENG, W., XU, A.. Antitumor and neurotoxic effects of novel harmine derivatives and structure-activity relationship analysis. *International Journal of Cancer* [online]. 2005, 114(5), 675-682 [cit. 2021-12-16]. ISSN 00207136.

[75] DAI, F., CHEN, Y., SONG, Y. et al. A Natural Small Molecule Harmine Inhibits Angiogenesis and Suppresses Tumour Growth through Activation of p53 in Endothelial Cells. *PLoS ONE* [online]. 2012, 7(12) [cit. 2021-12-19]. ISSN 1932-6203.

[76] Raal, A., Meos, A., Hinrikus, T., Heinämäki, J., Romāne, E., Gudienė, V., Jak Tas, V., Koshovyi, O., Kovaleva, A., Fursenco, C., Chiru, T., Nguyen, HT. Dragendorff's reagent: Historical perspectives and current status of a versatile reagent introduced over 150 years ago at the University of Dorpat, Tartu, Estonia. *Pharmazie*. 2020 Jul 1;75(7):299-306.

[77] Vrabec, R., Maříková, J., Ločárek, M., Korábečný, J., Hulcová, D., Hošťálková, A., Kuneš, J., Chlebek, J., Kučera, T., Hrabinová, M., Jun, D., Soukup, O., Andrisano, V., Jenčo, J., Šafratová, M., Nováková, L., Opletal, L., Cahlíková, L.: Monoterpene indole alkaloids from Vinca minor L. (Apocynaceae): Identification of new structural scaffold for treatment of Alzheimer's disease, *Phytochemistry*, Volume 194, 2022, 113017, ISSN 0031-9422.

[78] Havelek, R., Seifrtova, M., Kralovec, K., Bruckova, L., Cahlikova, L., Dalecka, M., Vavrova, J., Rezacova, M., Opletal, L., Bilkova, Z. The effect of Amaryllidaceae alkaloids haemanthamine and haemanthidine on cell cycle progression and apoptosis in p53-negative human leukemic Jurkat cells. *Phytomedicine* 2014, 21 (4), 479-490.

[79] Hulcová, D.; Breiterová, K.; Siatka, T.; Klímová, K.; Davani, L.; Šafratová, M.; Hošťálková, A.; De Simone, A.; Andrisano, V.; Cahlíková, L. Amaryllidaceae Alkaloids as Potential Glycogen Synthase Kinase-3β Inhibitors. *Molecules* 2018, *23*, 719.

[80] Zhao, Ting, et al. "Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory activities of β-carboline and quinoline alkaloids derivatives from the plants of genus Peganum." *Journal of Chemistry* 2013 (2013).

[81] Filali, Insaf, et al. "Synthesis, cytotoxic, anti-lipoxygenase and anti-acetylcholinesterase capacities of novel derivatives from harmine." *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry* 31.sup1 (2016): 23-33.

[82] NIROUMAND, M. C., FARZAEI, M. H., AMIN, G. Medicinal properties of Peganum harmala L. in traditional Iranian medicine and modern phytotherapy: a review. *Journal of Traditional Chinese Medicine* [online]. 2015, 35(1), 104-109 [cit. 2022-04-14]. ISSN 02546272.

[82] Kohelová E., Peřinová R., Maafi N., Korábečný J., Hulcová D., Maříková J., Kučera T., González L.M., Hrabinova M., Vorčáková K., Nováková L., De Simone A., Havelek R., Cahlíková L.: Derivatives of the β-crinane Amaryllidaceae alkaloid haemanthamine as multitarget directed ligands for Alzheimer´s disease. Molecules 24, 1307 (2019).

[83] XING, S., LI, Q., XIONG, B., CHEN, Y., FENG, F., LIU, W., SUN, H. Structure and therapeutic uses of butyrylcholinesterase: Application in detoxification, Alzheimer's disease, and fat metabolism. *Medicinal Research Reviews* [online]. 2021, 41(2), 858-901 [cit. 2022-04-15]. ISSN 0198-6325.

[84] Kohelová E., Peřinová R., Maafi N., Korábečný J., Hulcová D., Maříková J., Kučera T., González L.M., Hrabinova M., Vorčáková K., Nováková L., De Simone A., Havelek R., Cahlíková L.: Derivatives of the β-crinane Amaryllidaceae alkaloid haemanthamine as multitarget directed ligands for Alzheimer´s disease. Molecules 24, 1307 (2019).

Abstrakt

Fejtková Martina: Biologická aktivita alkaloidů z *Peganum harmala* L. a jejich semisynteticky připravených derivátů II. Diplomová práce 2022. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra farmakognozie a farmaceutické botaniky.

Tato diplomová práce se věnuje přípravě semisyntetických derivátů alkaloidu harminu a studiu jejich biologické aktivity. Z podfrakce PH-F1 alkaloidního extraktu byl izolován a pomocí preparativní tenkovrstvé chromatografie dočištěn alkaloid harmin. Inkorporací různých substituentů do polohy N^9 harminu byla chemickou reakcí připravena řada semisyntetických derivátů. Pro účely této diplomové práce bylo připraveno 17 derivátů, které byly následně identifikovány na základě LC-MS, ESI-HRMS a NMR analýzy. Po ověření totožnosti a čistoty derivátů byla studována jejich biologická aktivita. U připravených látek byl testován jejich inhibiční vliv vůči lidské acetylcholinesterase (AChE), lidské butyrylcholinesterase (BuChE), glykogen syntase kinase 3β (GSK-3β) a dále byla měřena jejich cytotoxická aktivita na vybraných nádorových a leukemických liniích a jedné zdravé buněčné linii.

Některé připravené deriváty vykázaly zajímavý selektivní inhibiční potenciál vůči lidské BuChE, nejaktivnějším derivátem byl 9-*N*-(4-isopropylbenzyl)harmin (IC_{50} BuChE 2,50 ± 0,78 μM). Harmin ani žádný jeho derivát nevykazovaly výraznější inhibiční aktivitu vůči AChE nebo GSK-3β. Ze screenignu cytotoxické aktivity vyšly nejaktivnější deriváty 9-*N*-(3-methylbenzyl)harmin, 9-*N*-(2-chlorobenzyl)harmin, 9-*N*-(3-methoxybenzyl)harmin a 9-*N*-(3,5-dimethoxybenzyl)harmin, jejichž cytotoxická aktivita byla nejvyšší na nádorovou linii Jurkat (akutní leukemie T-lymfocytů). Nejaktivnějším derivátem byl 9-*N*-(3,5-dimethylbenzyl)harmin, který vykázal významný cytotoxický potenciál hned na několika nádorových liniích, a to Jurkat (viabilita po 48 hodinách 5 %), MOLT-4 (akutní lymfoblastická leukémie) (viabilita 20 %) a HeLa (adenokarcinom děložního čípku) (viabilita 38 %). Mnoho připravených derivátů tak projevilo určitou biologickou aktivitu a můžeme tedy konstatovat, že harmin představuje zajímavý cíl s vysokým potenciálem pro další studium.

Klíčová slova: *Peganum harmala,* harmalové alkaloidy, harmin, Alzheimerova demence, AChE, BuChE, GSK-3β, cytotoxicita

Abstract

Fejtková Martina: Biological activity of *Peganum harmala* L. alkaloids and their semi-synthetic derivatives II. Diploma thesis 2022. Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Department of Pharmacognosy und Pharmaceutical botany.

This diploma thesis deals with the preparation of semi-synthetic derivatives of the alkaloid harmine and the study of their biological activity. The alkaloid harmine was isolated by preparative TLC from an alkaloid extract, exactly from its subfraction PH-F1. Semi-synthetic derivatives were prepared by incorporation of different substituents in the N^9 position of harmine. For the purposes of this diploma thesis were prepared 17 derivatives, which were subsequently identified on the basis of LC-MS, ESI-HRMS and NMR analysis. After structural elucidation of prepared derivatives, their biological activity was studied. The prepared substances were tested for their inhibitory effect on human acetylcholinesterase (AChE), human butyrylcholinesterase (BuChE), glykogen synthase kinase 3β (GSK-3β) and their cytotoxic activity was also measured on selected tumor and leukemia lines and one healthy cell line.

Some of the prepared derivatives showed interesting selective inhibitory potencial against human BuChE, the most active derivative was 9-*N*-(4-isopropylbenzyl)harmine (IC_{50} BuChE 2,50 ± 0,78 μM). Neither harmine nor any of its derivatives showed significant AChE or GSK-3β inhibitory activity. The most active derivatives from the cytotoxic activity screening were 9-*N*-(3-methylbenzyl)harmine, 9-*N*-(2-chlorobenzyl)harmine, 9-*N*-(3-methoxybenzyl)harmine a 9-*N*-(3,5-dimethoxybenzyl)harmine, whose cytotoxic activity was highest on the Jurkat tumor line (acut T-cell leukemia). The most active derivative was 9-*N*-(3,5-dimethylbenzyl)harmine, which showed significant cytotoxic potencial in several tumor lines, namely Jurkat (viability after 48 hours 5 %), MOLT-4 (acute lymphoblastic leukemia) (viability 20 %) and HeLa (cervical adenocarcinoma) (viability 38 %). Many of the prepared derivatives showed a certain biological activity and we can therefore state that harmine represents an interesting pharmacophore with high potencial for further study.

Key words: *Peganum harmala,* harmala alkaloids, harmine, Alzheimer‘s disease, AChE, BuChE, GSK-3β, cytotoxicity