

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA FARMAKOLOGIE A FARMACEUTICKÉ
BOTANIKY



DIPLOMOVÁ PRÁCE

IZOLACE ALKALOIDŮ DRUHU *GEISSOSPERMUM VELLOSI* ALLEMÃO
A STUDIUM JEJICH BIOLOGICKÉ AKTIVITY VIII.

Autor: Tomáš Pelnář

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

Hradec Králové 2022

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



DIPLOMA THESIS

ISOLATION OF ALKALOIDS OF THE SPECIES *GEISSOSPERMUM*
VELLOSII ALLEMÃO AND STUDY THEIR BIOLOGICAL ACTIVITY VIII.

Author: Tomáš Pelnář

Supervisor: PharmDr. Marcela Šafratová, Ph.D.

Hradec Králové 2022

ČESTNÉ PROHLÁŠENÍ

Čestně prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma „Izolace alkaloidů druhu *Geissospermum vellosii* Allemão a studium jejich biologické aktivity VIII.“ vypracoval samostatně pod vedením PharmDr. Marcely Šafratové, Ph.D.

Veškerá literatura a další zdroje z nichž jsem při zpracování čerpal, byly uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.

Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.

Hradec Králové

2022

Tomáš Pelnář

PODĚKOVÁNÍ

Tímto bych chtěl poděkovat PharmDr. Marcele Šafratové, Ph.D., vedoucí mojí diplomové práce, za její odborný dohled, trpělivost, cenné rady a také za pomoc při zpracování diplomové práce. Dále bych rád paní doktorce poděkoval za čas strávený při pomoci se zpracováním experimentální části diplomové práce, a to i v době osobního volna.

Děkuji také všem pracovníkům katedry za příjemné pracovní prostředí a vytvořené podmínky pro zpracování mé diplomové práce a také za jejich obětavou pomoc.

Tato práce vznikla za finanční podpory projektu Specifického vysokoškolského programu SVV 260 550.

Obsah

PŘEHLED OBRÁZKŮ	8
PŘEHLED TABULEK	8
SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	9
1. ÚVOD	13
2. CÍL PRÁCE	15
3. TEORETICKÁ ČÁST	16
3.1. ALKALOIDY	16
3.1.1. Indolové sloučeniny.....	17
3.1.2. Indolové alkaloidy.....	17
3.1.2.1. Biosyntéza indolových alkaloidů.....	19
3.1.3. Čeledě s významným obsahem indolových alkaloidů.....	21
3.1.3.1. Čeleď Apocynaceae.....	21
3.1.3.1.2. <i>Alstonia scholaris</i>	22
3.1.3.1.3. <i>Catharanthus roseus</i>	23
3.1.3.1.4. <i>Nerium oleander</i>	25
3.1.3.1.5. <i>Tabernaemontana divaricata</i>	26
3.1.3.1.6. <i>Vinca minor</i>	27
3.1.3.2. Čeleď Loganiaceae.....	28
3.1.3.2.1. <i>Strychnos nux-vomica</i>	28
3.1.3.3. Čeleď Fabaceae	29
3.1.3.3.1. <i>Physostigma venenosum</i>	29
3.1.3.4. Čeleď Zygophyllaceae.....	30
3.1.3.4.1. <i>Peganum harmala</i>	30
3.1.3.5. Čeleď Clavicipitaceae.....	31
3.1.3.5.1. <i>Secale cornutum</i>	32
3.2. GEISSOSPERMUM VELLOSI	34
3.2.1. Taxonomické zařazení.....	34
3.2.2. Charakteristika.....	34
3.2.3. Lidové léčitelství.....	34
3.2.4. Použití	35
3.2.5. Obsahové látky.....	35
3.2.6. Biologické aktivity.....	37
3.2.6.1. Antinociceptivní aktivita	37
3.2.6.2. Anticholinesterasová aktivita	38
3.2.6.3. Antiplasmodiální aktivita	39
3.2.6.4. Benigní hyperplazie prostaty	40
3.2.6.5. Protinádorová aktivita:	41
3.2.6.5.1. Kolorektální karcinom.....	42
3.2.6.5.2. Rakovina ovárií	43
3.2.6.5.3. Rakovina prostaty.....	43
3.2.6.5.4. Rakovina Pankreatu	45
3.3. ALZHEIMEROVA CHOROBA	46
3.3.1. Definice	46
3.3.2. Historie.....	46
3.3.3. Epidemiologie	46
3.3.4. Rizikové faktory	46
3.3.5. Klinický obraz a průběh nemoci.....	47
3.3.6. Cíl léčby	48
3.3.7. Diagnostika	48
3.3.8. Etiopatogeneze	49
3.3.8.1. Teorie β -amyloidu	49
3.3.8.2. Teorie neurofibrilárních klubek.....	50
3.3.8.4. Glutaminergní teorie.....	51
3.3.8.5. Oxidační stres.....	51

3.3.8.6.	Apolipoprotein E	51
3.3.8.7.	Diabetes mellitus II a inzulinová rezistence	52
3.3.9.	<i>Farmakoterapie</i>	52
3.3.9.1.	Kognitivní farmakoterapie	52
3.3.9.1.1.	Inhibitory AChE	52
3.3.9.1.2.	Inhibitory NMDA receptorů	54
3.3.9.1.3.	Podpůrná léčba	55
3.3.9.1.4.	Nové přístupy k léčbě AD	55
3.3.9.1.4.1.	Látky snižující tvorbu β -amyloidu	55
3.3.9.1.4.2.	Látky zvyšující clearance β -amyloidu	56
3.3.9.1.4.2.1.	Imunoterapie	56
3.3.9.1.4.2.2.	Plazmaferéza	56
3.3.9.1.4.3.	Terapie zaměřena na τ protein	56
3.3.9.1.4.3.1.	Inhibitory GSK-3	56
3.3.9.1.4.3.2.	Serotonergní látky	56
3.3.9.1.4.3.3.	Antagonisté receptorů pro konečné produkty pokročilé glykace (rAGEs – advanced glycation end products)	57
3.3.9.1.4.4.	Přírodní zdroje léčiv	57
3.3.9.2.	Nekognitivní farmakoterapie	57
3.3.10.	<i>Nefarmakologická léčba</i>	58
4.	PRAKTICKÁ ČÁST	59
4.1.	LABORATORNÍ POTŘEBY	59
4.1.1.	<i>Rozpouštědla</i>	59
4.1.2.	<i>Chemikálie</i>	59
4.1.3.	<i>Pomocný materiál</i>	59
4.1.4.	<i>Detekční činidla</i>	60
4.1.5.	<i>Vyvíjecí soustavy pro preparativní tenkovrstvou chromatografii</i>	60
4.1.6.	<i>Chromatografické sorbenty</i>	61
4.1.7.	<i>Přístrojové vybavení</i>	61
4.1.8.	<i>Rostlinný materiál</i>	61
4.2.	OBECNÉ POSTUPY	62
4.2.1.	<i>Příprava a čištění rozpouštědel</i>	62
4.2.2.	<i>Odpařování</i>	62
4.2.3.	<i>Příprava litých desek</i>	62
4.2.4.	<i>Chromatografie</i>	62
4.2.5.	<i>Detekce alkaloidů</i>	63
4.2.6.	<i>Eluce</i>	64
4.2.7.	<i>Skladování vzorků</i>	64
4.3.	STRUKTURNÍ ANALÝZA	64
4.3.1.	<i>GC-MS analýza</i>	64
4.3.2.	<i>NMR analýza</i>	64
4.3.3.	<i>Měření optické otáčivosti</i>	65
4.4.	STANOVENÍ INHIBIČNÍ AKTIVITY VŮČI HUMÁNNÍM REKOMBINANTNÍM CHOLINESTERASAM	65
4.4.1.	<i>Chemikálie</i>	65
4.4.2.	<i>Činidla pro stanovení inhibiční aktivity vůči hAChE a hBChE</i>	65
4.4.3.	<i>Pufry</i>	66
4.4.4.	<i>Přístroje</i>	66
4.4.5.	<i>Podmínky měření</i>	66
4.4.6.	<i>Rekombinantní enzymy</i>	66
4.4.7.	<i>Vlastní stanovení inhibiční aktivity izolovaných alkaloidů proti AChE a BChE</i>	66
4.5.	STANOVENÍ HEPATOTOXICITY	68
4.5.1.	<i>Použité přístroje a materiál</i>	68
4.5.2.	<i>Použitá média a chemikálie</i>	68
4.5.3.	<i>Vlastní stanovení hepatotoxicity</i>	68
4.6.	IZOLACE ALKALOIDŮ FRAKCE GV-4	69
5.	VÝSLEDKY	74
5.1.	STRUKTURNÍ ANALÝZA	74

5.1.1.	<i>GV-4-D-3-A-1: Anhydropereirin</i>	74
5.1.2.	<i>GV-4-D-5-3: diastereomer Geissoschizolinu</i>	75
5.1.3.	<i>GV-4-C-3-3-1(I): Deoxydihydronorfluorocurarin</i>	76
5.1.4.	<i>GV-4-D-6-5: nová struktura</i>	77
5.2.	BIOLOGICKÉ AKTIVITY IZOLOVANÝCH LÁTEK	78
5.2.1.	<i>Inhibiční aktivita izolovaných látek vůči cholinesterasam</i>	78
5.2.2.	<i>Hepatotoxicita</i>	78
6.	DISKUSE	79
7.	ZÁVĚR	81
8.	ZDROJE	82
9.	ABSTRAKT	89
10.	ABSTRACT	90

Přehled obrázků

Obrázek 1: prekurzor tryptofan ^[6]	17
Obrázek 2: indolalkylaminový typ ^[6]	17
Obrázek 3: fysostigminový typ ^[6]	18
Obrázek 4: β-karbolinový typ ^[6]	18
Obrázek 5: ergolinový typ ^[6]	18
Obrázek 6: strychninový typ ^[6]	18
Obrázek 7: první krok biosyntézy monoterpenních indolových alkaloidů ^[13]	19
Obrázek 8: syntéza β-karbolinových alkaloidů ^[13]	20
Obrázek 9: geissospermin a produkty jeho kyselá hydrolyzy ^[75]	36
Obrázek 10: geissolosimin a produkty jeho kyselá hydrolyzy ^[75]	37
Obrázek 11: flavopereirin ^[75]	38
Obrázek 12: 12-methoxy-1-methylspidospemidin ^[75]	38
Obrázek 13: rivastigmin ^[110]	53
Obrázek 14: galanthamin ^[110]	53
Obrázek 15: donepezil ^[110]	54
Obrázek 16: memantin ^[110]	55
Obrázek 17: kontrolní TLC – kontrolní TLC – zóny A-I ve vyvíjecí soustavě S ₁	71
Obrázek 18: kontrolní TLC – zóny A-I ve vyvíjecí soustavě S ₆	71
Obrázek 19: TLC frakce D, rozdělení na zóny D-1 až D-8	72
Obrázek 20: kontrolní TLC přečištěné podfrakce D-5-3 a D-6-5	73
Obrázek 21: struktura anhydropereirinu.....	74
Obrázek 22: struktura geissoschizolinu.....	75
Obrázek 23: struktura deoxydihydronorfluorocurarinu	76
Obrázek 24: hrubá struktura nové látky	77

Přehled tabulek

Tabulka 1: <i>Rauwolfia serpentina</i> , alkaloidy a jejich použití ^[20,21]	22
Tabulka 2: <i>Catharanthus roseus</i> , alkaloidy a jejich použití ^[29,30]	24
Tabulka 3: aktivity alkaloidů obsažených v <i>G. vellosii</i> ^[66,73]	35
Tabulka 4: nežádoucí účinky inhibitorů acetylcholin esterasy ^[98]	53
Tabulka 5: hmotnosti jednotlivých frakcí A-I.....	70
Tabulka 6: inhibiční aktivita vůči cholinesterasám.....	78
Tabulka 7: výsledky stanovení hepatotoxicity deoxydihydronorfluorocurarinu.....	78

Seznam použitých zkratek

5ARI	inhibitory 5 α - redukasy
AD	Alzheimerova choroba
ADAS	Alzheimer disease assesing scale
ADH	antidiuretický hormon
ADT	androgenní deprivační terapie
ACh	acetylcholin
AChE	acetylcholinesterasa
AKT	serin-treoninkinasa
AMK	aminokyseliny
AML	akutní myeloidní leukemie
Ap	amyloidní peptid
ApoE	apolipoprotein E
APP	amyloidový prekursorový protein
AR	androgenní receptor
ATP	adenosintrifosfát
A β	amyloid β
Bcl-2	B-buněčný lymfom 2
Bcl-XL	B-buněčný lymfom-extra large
BHP	benigní hyperplazie prostaty
BChE	butyrylcholinesterasa
BPSD	behaviorální a psychické příznaky demence
BZD	benzodiazepiny
c-Myc	buněčná cytomatóza
Caco-2	buněčná linie kolorektálního karcinomu
CDK-5	cyklin dependentní kinasa 5
CIAPs	buněčné inhibitory apoptózy
CNS	centrální nervový systém
COX	cyklooxygenasa
CRC	kolorektální karcinom
CRPC	kastračně rezistentní karcinom prostaty
CSC	buňky podobné kmenovým
CT	výpočetní tomografie, radiologická vyšetřovací metoda

DHA	dokosahexaenová kyselina
DHT	dihydrotestosteron
DM	diabetes mellitus
DMAPP	dimethylallylpyrofosfát
DMSO	dimethylsulfoxid
DMT	dimethyltryptamin
DTNB	5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina
EPA	eikosapentaenová kyselina
Fab	specifické protilátky
GC	plynová chromatografie
GC-MS	plynová chromatografie s hmotnostním detektorem
GIT	gastrointestinální trakt
GSK-3 β	glykogensynthasa-kinasa 3 β
GV	<i>Geissospermum vellosii</i>
hAChE	lidská acetylcholinesterasa
hBChE	lidská butyrylcholinesterasa
HEB	hematoencefalická bariéra
HIV/AIDS	virus lidské imunitní nedostatečnosti/syndrom získaného selhání imunity
HSV-1	herpes simplex viru typu 1
HT-29	buněčná linie karcinomu tlustého střeva
iAChE	inhibitory acetylcholinesterasy
iBChE	inhibitory butyrylcholinesterasy
IC ₅₀	inhibiční koncentrace enzymu na 50 %
IgE	imunoglobulin E
IgG	imunoglobulin G
IL-1	interleukin 1
iMAO	inhibitory monoaminoxydasy
IR	inzulinová rezistence
IRN	irinotekan
KVS	kardiovaskulární systém
LNCaP	buněčná linie karcinomu prostaty
LOX	lipooxygenasa
MAPT	proteiny spojené s mikrotubuly

MIA	monoterpenoidní indolové alkaloidy
MK	mastná kyselina
MMSE	krátký test kognitivních funkcí
MRI	magnetická rezonance
MS	hmotnostní spektrometrie
n.d.	nedefinováno
NEPC	neuroendokrinní rakovina prostaty
NF- κ B	nukleární faktor kappa B
NFT	neurofibrilární klubka
NMDA rp.	N-methyl-D-aspartátové receptory
NMR	nukleární magnetická rezonance
NOS	reaktivní sloučeniny kyslíku
PAD	perorální antidiabetika
PC3	buněčná linie karcinomu prostaty
PCa	karcinom prostaty
PCPA	methylester p-chlorfenylalanin
PD	Parkinsonova choroba
PDE 1	fosfodiesterasa 1
PET	pozitronová emisní tomografie
PPAR γ rp	receptory aktivované pproliferátorem peroxisomu
PSA	prostatický specifický antigen
QoL	kvalita života
rAGES	antagonisté receptorů pro konečné produkty pokročilé glykace
RF	rizikové faktory
ROS	reaktivní sloučeniny dusíku
SAM	S-adenosylmethionin
SRD5A1	3-oxo-5-alfa-steroid-4-dehydrogenasa 1
SSRI	selektivní inhibitor zpětného vychytávání serotoninu
TLC	tenkovrstvá chromatografie
TNF- α	tumor nekrotizující faktor α
VBL	vinblastin
VCR	vinkristin
VRL	vinorelbin

XIAP

X chromozom vázaný inhibitor apoptózoého proteinu

1. Úvod

Odedávna lidé využívali rostliny jako zdroj obživy, ale také jako zdroj léčivé síly. I dnes asi dvě třetiny světové populace využívají rostlinné extrakty a sušené rostlinné části v rámci své léčby. Téměř 400 milionů lidí, zejména v rozvojových zemích, je na tento způsob léčby zcela odkázáno. ^[1,2] Fytoterapie se řadí mezi nejstarší způsoby léčení, které jsou mezi lidmi po celém světě praktikované. Rostlinné zdroje byly pro léčbu různých nemocí využívány po tisíciletí a léčebné znalosti se předávaly z generace na generaci.

K velkému rozvoji fytoterapie došlo zejména v Indii. Pochází odsud Ajurvéda – nauka o životě, která vznikla přibližně v polovině druhého tisíciletí před naším letopočtem. Na územích jako je Indie, Čína a dalších asijských a jihoamerických států se stále velké množství obyvatel spoléhá na fytoterapii i z důvodů její lepší finanční dosažitelnosti. ^[3]

Rostliny jsou v dnešní době velice důležitým zdrojem léčiv. Po celém světě jsou rostliny využívány pro léčbu nemocí i jako prostředek pro udržení dobrého zdraví (různá fytofarmaka a nutraceutika). Koncem minulého století se dostaly přírodní látky do úpadku, protože došlo k rozvoji strategie založené na molekulárních cílech. V současnosti se ale zase dostávají přírodní látky do popředí.

Rostliny jsou považovány za velice cenný zdroj bioaktivních sloučenin. ^[2,4] V posledních desetiletích bylo vynaloženo hodně prostředků a úsilí na izolaci bioaktivních látek pocházejících právě z rostlinného materiálu. ^[5] Je třeba dávat pozor na dávky rostlinných extraktů, stejně jako u konvenčních léčiv, protože mnoho zástupců rostlin produkuje toxické metabolity nebo obsahuje látky, které jsou ve větším množství škodlivé (těžké kovy, toxiny, bakterie, pesticidy), proto lze v rámci lékopisu nalézt články, které se na stanovení a limity těchto látek zaměřují.

Studiem přírodních látek se zabývá farmakognozie, která řeší účinek drog rostlinného i živočišného původu na lidský organismus. Rostliny produkují dva typy sloučenin – primární a sekundární metabolity. Primární metabolity jsou takové látky, které rostlina potřebuje pro svoji existenci. Sekundární metabolity mají spoustu aktivit a použití. Jedná se o alkaloidy, saponiny, flavonoidy, třísloviny atd. Mnoho syntetických molekul vznikalo na podkladě přírodních předloh (cca 61 %). ^[6,7] To je důvod, proč je důležité stále hledat v rostlinách nové molekuly, které by mohly přispět k vývoji nového léčiva pomocí strukturních obměn. Velmi bohatým zdrojem nových sloučenin jsou rostliny z tradiční čínské a indické medicíny. Dalším podstatným zdrojem jsou rostliny z Amazonie, jako je například *Geissospermum vellosii* (GV).

Tato rostlina se v Jižní Americe řadí mezi 10 nejpoužívanějších rostlin. Hlavní skupinou obsahových látek s biologickým účinkem jsou indolové alkaloidy. Z této rostliny se již povedlo izolovat okolo 20 alkaloidů a jistě skrývá mnoho dalších struktur, které by mohly pomoci při vývoji nových léčiv. Lidově se používá na léčbu malárie, na kterou stále stoupá rezistence. Základní molekulou s touto aktivitou je geissolosimín. Extrakt z kůry a listů prokazuje antimalarickou, antibakteriální, anticholinesterasovou, protinádorovou a antinociceptivní aktivitu. Aktivita proti acetylcholinesterase (AChE) a butyrylcholinesterase (BChE) může přispět k vývoji nových léčiv na Alzheimerovu chorobu (AD). [8,9]

2. Cíl práce

- provedení literární rešerše na uvedené téma a zajištění potřebné originální literatury
- výběr a utřídění faktů
- izolace alkaloidů z vybrané frakce za použití standardních chromatografických metod včetně jejich přečištění a určení jejich struktury pomocí analytických metod
- podíl na stanovení biologické aktivity
- napsání práce podle zvyklostí na pracovišti

3. Teoretická část

3.1. Alkaloidy

Sekundární metabolity rostlin můžeme rozdělit do několika kategorií. Mezi nejdůležitější patří fenolické látky, terpenoidy a sloučeniny dusíku, k nimž patří alkaloidy. [5]

Alkaloidy se vzhledem ke své struktuře řadí mezi heterocyklické struktury, které jsou odvozeny od aminokyselin (AMK). Jsou to přírodní sloučeniny organického původu, které mají ve své struktuře vázaný dusík pocházející z AMK. Když dusík není vázán v heterocyklickém systému, jde o protoalkaloidy. Pokud dusík nepochází z AMK, jedná se o pseudoalkaloidy. Jde o velmi rozsáhlou skupinu přírodních látek. Jsou typické zvláště pro krytosemenné rostliny (zastoupení alkaloidů je asi u 25 % zástupců) [10] a plní pro rostliny důležitou ochrannou funkci. [6,7] Vznikají z AMK, které obsahují jeden nebo více atomů dusíku. Podle prekursoru biosyntetické dráhy lze alkaloidy klasifikovat na odvozené od tryptofanu, ornithinu, fenylalaninu atd. Dále je dělíme podle struktury: piperidinové, pyrrolidinové, pyrrolové, indolové, isochinolinové, tropanové, β -karbolinové atd. [5] Tato práce se zabývá na indolové alkaloidy, které jsou odvozené od tryptofanu.

Jak název alkaloidy už napovídá, tyto látky mají alkalickou povahu. Mají schopnost reagovat s kyselinami za vzniku solí. Ve formě volné baze jsou špatně rozpustné ve vodě, lipofilní a většinou pevné bezbarvé látky. Soli jsou naopak ve vodě poměrně dobře rozpustné a nerozpustné v nepolárních rozpouštědlech. Další formou jsou N-oxidy, které jsou polární, rozpustné ve vodě, ale méně stabilní, proto je jejich izolace obtížná. Jde o transportní formu alkaloidů, která je zapojena do metabolických pochodů v buňce. Primárním zdrojem alkaloidů jsou vyšší rostliny.

Složením půdy, klimatem a prostředím lze ovlivnit kvalitativní i kvantitativní obsah alkaloidů. Také dochází ke kolísání obsahu alkaloidů během různého vegetačního období rostliny. Obecně lze říct, že tvorba alkaloidů se snižuje nebo je úplně zastavena na začátku kvetení. Výživa rostlin je také jedním z faktorů, který může významně ovlivňovat tvorbu alkaloidů (amonné soli).

3.1.1. Indolové sloučeniny

Obecně indolové sloučeniny jsou přírodní produkty, které jsou známé pro svou antikancerózní aktivitu. Mohou vyvolat buněčnou smrt u různých typů buněčných liniích. Tyto látky lze získat z uhlé smoly nebo různých rostlin. Také vznikají ve střevě bakteriálním rozkladem aminokyseliny tryptofanu. Indol byl poprvé syntetizován reakcí známou jako Fischerova syntéza indolu. Indolové sloučeniny slouží jako signální molekuly v rostlinách nebo zvířatech. Indoly jsou poměrně hojně zastoupeny v brukvovité zelenině (květák, zelí, tuřín, brokolice, růžičková kapusta). Konzumace této zeleniny je spojována se snížením rizika rakoviny tlustého střeva, prsu a prostaty (antimutagenní a antikarcinogenní vlastnosti).^[11]

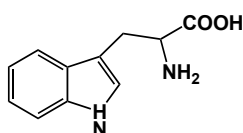
3.1.2. Indolové alkaloidy

Skupina indolových alkaloidů je velice rozsáhlá a čítá více než 4000 zástupců. Bicyklická struktura je tvořena benzenovým jádrem a přikondenzovaným pyrrolovým kruhem.

Tento typ alkaloidů je velice zajímavý pro velké množství terapeutických vlastností: antiflogistické, antinociceptivní, antikancerózní, antibakteriální, antimalarické, antifungální, antiparazitární, antivirové, anticholinesterasové.^[10]

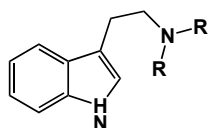
Jsou zastoupeny hlavně v čeledích Apocynaceae, Rubiaceae, Loganiaceae.^[12]

Indolové alkaloidy, odvozené od tryptofanu (Obr. 1), můžeme rozdělit na několik základních typů:



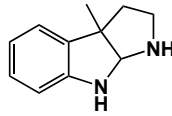
Obrázek 1: prekurzor tryptofan^[6]

- indolalkylaminový typ (bufotenin, gramin, psylocybin – Obr. 2)



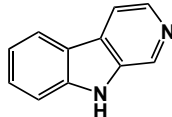
Obrázek 2: indolalkylaminový typ^[6]

- fysostigminový typ (fyzostigmin – Obr. 3)



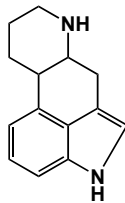
Obrázek 3: fysostigminový typ ^[6]

- β -karbolinový typ (harmin, harman, rauwolfiové alkaloidy – Obr. 4)



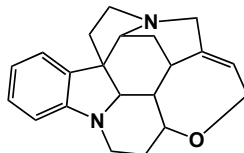
Obrázek 4: β -karbolinový typ ^[6]

- ergolinový typ (námelové alkaloidy – Obr. 5)



Obrázek 5: ergolinový typ ^[6]

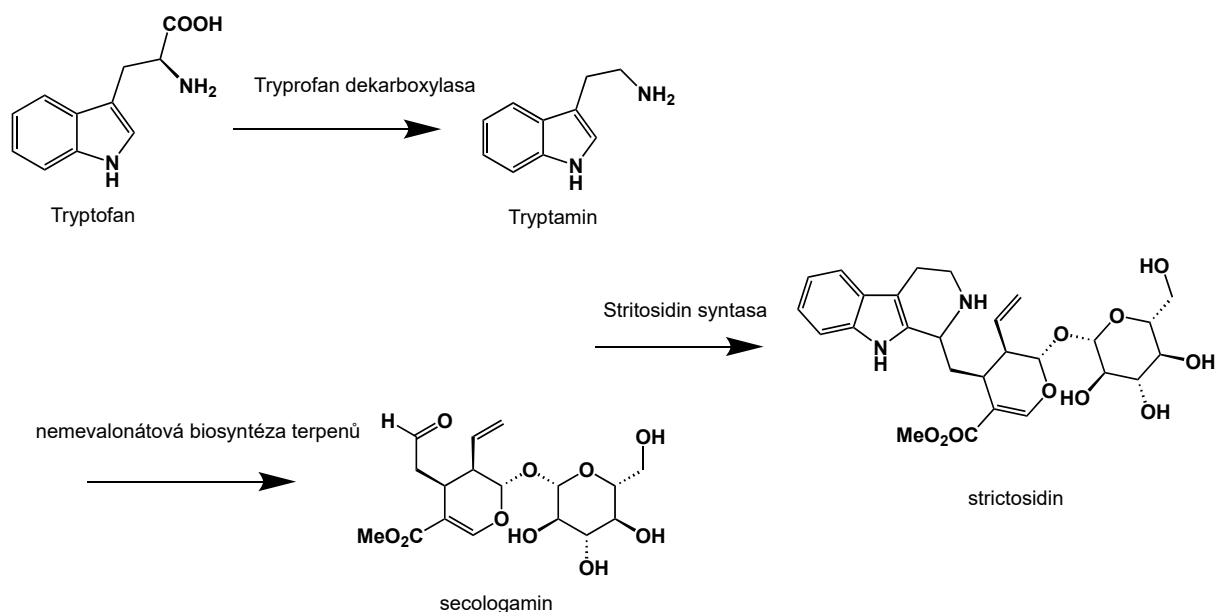
- strychninový typ (rod *Strychnos*, kurare – Obr. 6) ^[6]



Obrázek 6: strychninový typ ^[6]

3.1.2.1. Biosyntéza indolových alkaloidů

Největší podskupinou indolových alkaloidů jsou monoterpenoidní indolové alkaloidy (MIA), které čítají asi 2000 zástupců. [7] Monoterpenoidní indolové alkaloidy (MIA) jsou složeny z indolového skeletu (benzenový kruh kondenzovaný s pětičlenným pyrrolovým kruhem). Pyrrolový kruh je zodpovědný za základní vlastnosti indolových alkaloidů. Další část molekuly je terpenoidního charakteru. [5] Aminokyselina tryptofan je biogenetickým prekurzorem všech indolových alkaloidů. Prvním krokem v syntéze je dekarboxylace tryptofanu za přítomnosti tryptofan dekarboxylasy za vzniku tryptaminu. Tryptamin s iridoidním terpenem secologaminem projde stereoselektivní kondenzací za katalýzy enzymem strictosidin syntasou. Vznikne strictosidin (Obr. 7). [11]



Obrázek 7: první krok biosyntézy monoterpenoidních indolových alkaloidů [13]

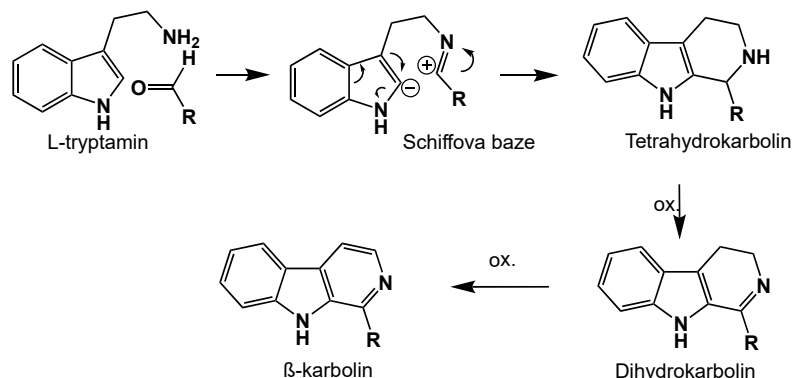
Každá rostlina má trochu jinou strukturu indolových alkaloidů. Některé se liší nepatrně, jiné mají ve struktuře značné rozdíly. [11]

Indolalkylaminový typ alkaloidů

Dimethyltryptamin (DMT) vzniká z tryptaminu methylací za přítomnosti S-adenosylmethioninu (SAM). Z dimethyltryptaminu oxidací vzniká psylocin a poté se fosforyluje na psylocybin.

β -karbolinový typ alkaloidů

Syntetizují se ze Schiffovy base, která vznikne reakcí tryptofanu a aldehydu nebo ketokyseliny. Následuje intramolekulární Mannichova reakce, přičemž uhlík v poloze 2 indolového skeletu působí jako nukleofil. Následně dojde k obnovení aromaticity eliminací protonu na atomu C2. Tetrahydro- β -karbolinový skelet se oxiduje na dihydro- β -karbolin a β -karbolin (Obr. 8). [11]



Obrázek 8: syntéza β -karbolinových alkaloidů [13]

Bisindolové (indolindolinové) alkaloidy mají vyšší aktivitu než monomerní alkaloidy.

Nejnámější jsou vinka alkaloidy z *Catharanthus roseus*. Jsou to první klinicky používané alkaloidy jako antineoplastika (od 60. let 20. století). [14]

Ergolinový typ alkaloidů

Vznikají alkyací tryptofanu přes dimethylallylpyrofosfát (DMAPP), který na atom uhlíku v poloze 4 indolového skeletu působí jako důležitý facilizátor nukleofilu. Následně 4-dimethylallyl-L-tryptofan podstoupí N-methylaci. Námelové alkaloidy mají tetracyklickou strukturu, kdy kruh A a B pochází z aminokyseliny L-tryptofanu a kruhy C, D pocházejí z cyklizace DMAPP. [11]

Strychninový typ alkaloidů

Alkaloidy strychninového typu vychází ze syntézy MIA. Vznikají reakcí tryptaminu a sekologaninu (Mannichova reakce) za vzniku striktosidinu. Dalším krokem je přeměna na dehydrogeissoschizin, který přechází na preakuammicin což je corynanthový typ respektive strychninový podtyp. Preakuammicin může dále přecházet na další alkaloidy strychninového podtypu. [11]

Fysostigminový typ alkaloidů

Alkaloidy fysostigminového typu (pyrroloindolový skelet) vzniká z 5-hydroxytryptofanu. Nejprve dojde k dekarboxylaci na tryptamin. Následuje acetylace aminu. Dalšími kroky jsou C5 karbamylace a C3 methylace. Vzniká reaktivní meziprodukt (iminiový ion), který je atakován aminovým nukleofilem za vzniku pyrroloindolového skeletu. Dalšími methylacemi a acetylací vzniká fysostigmin. ^[15]

3.1.3. Čeledě s významným obsahem indolových alkaloidů

3.1.3.1. Čeleď *Apocynaceae*

Čeleď *Apocynaceae*, známá také jako „Dogbane“, je významným zdrojem alkaloidů. Zahrnuje celkem 5 podčeledí: *Periplocoideae*, *Rauwolfioideae*, *Asclepiadoideae*, *Secamonoideae* a *Apocynoideae*. Čeleď čítá kolem 4600 druhů v 424 rodech.

Zástupci jsou rozmanití, jde o stromy, dřevité keře i byliny. ^[5] Větvení bývá většinou sympodiální. Listy jsou nejčastěji vstříčné nebo v přeslenech, téměř vždy bez palistů, celokrajné, často kožovité nebo sukulentní. V úžlabí listů se často nachází trichomové útvary vylučující pryskyřici. Květy jsou ve vrcholičnatých květenstvích. Plodem bývá měchýřek, tobolka, bobule nebo peckovice. ^[16] Většina zástupců při poranění vypouští mléčnou mizu s latexem. Sekundární metabolity jsou významně zastoupeny ve všech částech rostliny.

Tato čeleď je v Indii i v jiných zemích využívána od nepaměti v tradiční lidové medicíně jako antipyretikum, analgetikum, antimalarikum, antidiabetikum a k léčbě onemocnění gastrointestinálního traktu. ^[5,17]

Několik farmakologicky využívaných struktur vzniklo napodobením či úpravou nebo přímým využitím přírodních produktů z této čeledi (kardiotonika – srdeční glykosidy, terpeny, flavonoidy a alkaloidy – antiproliferační účinek pro léčbu rakoviny, hypercholesterolémie, neuroprotektivní aktivita). Také se prokázala antimikrobiální aktivita (některé silice, terpenoidy, glykosidy, flavonoidy, taniny, alkaloidy). To je slibné pro překonání mnohočetné lékové rezistence. ^[18] Z této čeledi bylo již izolováno přes 2600 alkaloidních sloučenin. ^[19]

3.1.3.1.1. *Rauwolfia serpentina*

Zmijovice hadová z čeledi Apocynaceae, známá též pod označením indický hadí kořen nebo Sarpagandha. ^[18] Keř malého vzrůstu pocházející z Indie, Pákistánu, Barmy, Vietnamu a Bangladéše. Je hojně rozšířený v Asii, Africe a Americe. ^[20] Listy jsou kožovité stálezelené, květy bělorůžové, plodem peckovice.

V tradiční indické medicíně se používá proti horečce, hypertenzi, dysentérii, uštknutí hadem a bodnutí hmyzem. Dále se používá na léčbu nervových onemocnění a duševních chorob.

Mezi sekundární metabolity obsažené v tomto keři patří steroly (7-dihydrosterol) a především indolové alkaloidy (ajmalicin, ajmalin, reserpin, serpentin – Tab. 1). Ty se využívají při léčbě hypertenze, HIV, malárie, průjmu, onemocnění kardiovaskulárního systému (KVS), některých psychóz, diabetu mellitu (DM) a rakoviny. ^[18,21] Dále vykazují hypnotický účinek. Prokázal se inhibiční vliv na centrální nervový systém (CNS).

Methanolové extrakty vykazují hypoglykemické, hypolipidemické a antioxidační účinky. Reserpin je silné antihypertenzní a trankvilizační činidlo (schizofrenie, paranoia), dále je možné jeho použití při Parkinsonově chorobě (PD) a rakovině prsu (v ajurvédě se sušený kořenový prášek užívá na léčbu rakoviny). ^[20,21]

ALKALOID	POUŽITÍ
ajmalin	antihypertenzivum, antiarytmikum
ajmalicin	antihypertenzivum, cévní onemocnění
serpentin	antihistaminová aktivita (uštknutí hadem)
yohimbin	použití u erektilní dysfunkce, afrodisiakum – doplněk stravy
indobin a indobinin	testovány jako inhibitory aldosoreduktasy

Tabulka 1: *Rauwolfia serpentina*, alkaloidy a jejich použití ^[20,21]

Vzhledem k hojnému využívání kořenové drogy se keř řadí mezi celosvětově ohrožené druhy. ^[18,22]

3.1.3.1.2. *Alstonia scholaris*

Rod *Alstonia* z čeledi Apocynaceae čítá asi 60 druhů, z nichž *A. scholaris* je nejvíce prozkoumán. Tento stálezelený strom pochází z jihovýchodní Asie a Indie. Hojně se vyskytuje i v Africe. ^[18] První zmínky byly zaznamenány již v ajurvédské dokumentaci. ^[23] *Alstonia scholaris* je nazývána také jako d'áblův strom, blackboardtree, saptaparni a další. ^[18]

Dřevo z tohoto stromu je tvrdé, trvanlivé a využívá se při výrobě buničiny, papíru a také na desky školních tabulí (odtud pochází druhové označení scholaris a synonymum blackboardtree). [23,24]

V lidové medicíně se používají sušené listy a kůra z kmene na léčbu kašle, astma a chronické bronchitidy. [25] Dále se využívá k léčbě anémie, chronického průjmu, úplavice, menstruačních poruch, malarické horečky, akutní artritidy, vředů a nádorových onemocnění. [24,26]

Fytochemické studie prokázaly obsah cca 300 sloučenin, které zařazujeme mezi iridoidy, kumariny a flavonoidy. V listech, v kůře a kořenech najdeme terpenoidy, v květech jsou nejvíce zastoupeny triterpeny (lupeol, β -amyrin). V celé rostlině jsou přítomné flobafeny, jednoduché fenoly, steroidy, saponiny a především alkaloidy (kolem 70 druhů). [18,23,24]

Nejvíce jsou zastoupeny MIA (alstonitrin A, scholarisin A, alstoscholarin, 19-episolarisin, vallesamin, pikrinin, echitamidin, echitamin, ditain). [24] V závislosti na regionu se obsahové látky liší. Zatímco v Číně, Indii, Pákistánu a Thajsku je především pikriminový typ MIA, v Indonésii a na Filipínách je spíše angustilobinový typ. [25]

Studie doložily antimikrobiální a antifungální aktivitu (bylo zkoušeno proti *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus niger*, *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Streptococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*). Dále antiflogistickou, antipyretickou, analgetickou, anthelmintickou, antitusickou, antineoplastickou, anti diarrhoickou, antioxidační, antidiabetickou, antiplasmodiální a hepatoprotektivní aktivitu. [5,18,23,25]

Alkaloidy scholarisin I a scholarisin II prokázaly kardiotonické vlastnosti. [26] Protizánětlivý účinek je docílen inhibicí nukleárního faktoru κ B (NF- κ B), což je důležitý protizánětlivý transkripční faktor. Periferní analgetický a antiflogistický účinek prokázaly picrinin, vallesamin a scholarisin (*in vitro* a *in vivo*) [25] Inhibicí kyseliny arachidonové, resp. cyklooxygenasy (COX) 1,2 a lipooxygenasy (LOX) dojde ke snížení prostaglandinů a leukotrienů, což jsou hlavní mediátoři zánětu. [27]

3.1.3.1.3. *Catharanthus roseus*

Catharanthus roseus je tropický vytrvalý polokeř čeledi Apocynaceae. [7] Lidově je známý jako brčál madagaskarský nebo *Vinca rosea*. [28] Tento rod zahrnuje celkem 8 druhů, z nichž sedm je endemických na Madagaskaru a jeden v Indii. [29]

Dnes je rozšířen do celého světa jako okrasná rostlina. Dosahuje výšky až 90 cm. Listy jsou dlouhé asi 7 cm. [28] Rostlina je velice bohatým zdrojem alkaloidů. Obsahuje jich více než

400. [30] Jejich nejvyšší zastoupení je po odkvětu. [31] Kromě alkaloidů jsou zastoupeny fenolové sloučeniny (fenylpropanoidy, deriváty kyseliny skořicové, flavonoidy, anthokyany). [32]

Lidové léčitelství v Číně, Indii, Malajsii a Jižní Americe využívá rostlinu k léčbě bolesti hlavy, DM (hypoglykemický efekt je vysvětlován zlepšením příjmu glukózy v pankreatických nebo svalových buňkách.). [33] Na Madagaskaru se používají hořké listy jako adstringens a emetikum, kořen jako projímadlo, hemostatikum a proti bolesti zubů. V Jižní a střední Americe se rostlina používá jako lék na nachlazení, záněty a bolest v krku. [31]

Farmaceuticky využívané (Tab. 2) jsou hlavně dimerní alkaloidy vinkristin (VCR) a vinblastin (VBL) jako antineoplastická činidla. Pro léčbu hypertenze je využíván ajmalicin. [28]

VCR a VBL se používají na léčbu leukémie, Hodgkinových lymfomů, neuroblastomů, rhabdomyosarkomů, Wilmsova nádoru a dalších. Často jsou tyto látky zahrnuty v kombinovaných režimech chemoterapie. [30,34] Tyto antineoplastické alkaloidy vykazují také silnou antimikrobiální a antiparazitární aktivitu (např. proti *Trypanosoma cruzi*). [29]

Mechanismus spočívá v působení na buňky v průběhu mitózy, blokují β -tubulin a nedojde k polymerizaci s α -tubulinem. Nevytvoří se mikrotubuly, tedy ani mitotické vřetenko, chromozomy se rozptýlí a dojde k apoptóze buňky. [28] Mají také nežádoucí účinky. VBL je toxický pro bílé krvinky, způsobuje nevolnost, zvracení, zácpu, dušnost, sípání, horečku a vzácně sekreci antidiuretického hormonu (ADH). Vinorelbin (VRL) je v terapii používaným derivátem VBL, snižuje odolnost vůči infekcím, způsobuje anémii, zácpu, průjem, nevolnost, periferní neuropatii, zánět v místě vpichu. [34] VCR a VBL jsou obsaženy v listech v malém zastoupení, ročně se izoluje asi 3 kg alkaloidů, tedy 300 tun sušených listů. Rostlina je ohrožena. [4]

ALKALOID	POUŽITÍ
vinorelbin (derivát)	protinádorová aktivita (na rakovinu prsu, prostaty a plic)
vinflumin	syntetický derivát schválený pro léčbu karcinomu uroteliálních buněk
vinkamin	vazodilatans, hypoglykemický, ředí krev, zlepšuje paměť (zmírňuje demenci a AD)
ajmalicin a serpentin	antihypertenzivní a protizánětlivý
yohimbin	léčba erektilní dysfunkce, antivirotikum
vindolicin, vindolin, vindolidin a vindolinin	potenciální zdroj pro vývoj nových antidiabetik

Tabulka 2: *Catharanthus roseus*, alkaloidy a jejich použití [29,30]

3.1.3.1.4. *Nerium oleander*

Rod *Nerium* z čeledi Apocynaceae má pouze jediného zástupce, a to druh oleandr [35], známý též jako růžový či bílý oleandr podle barvy květu. Ukazuje se, že bílý oleandr má nižší obsah kardenolidů. [35] ¹ Někdy bývá označován synonymem *Nerium odorum* nebo *Nerium indicum*. [35]

Oleandr je stálezelený keř až malý strom, který se dorůstá výšky 2 až 6 m. [36] Původem je ze středomoří, vyskytuje se v oblasti Afriky a Evropy. Je kultivován jako okrasný keř. Listy jsou kožovité, lineární tmavě zelené až šedozeleň s výraznými světle žlutými žilkami, dlouhé 10-15 cm. [37,38] Květy jsou nálevkovité s 5 laloky a vyskytují se pouze na koncových větvích. [36] Plodem je lusk s obsahem velkého množství semen. [39]

Všechny části rostliny jsou jedovaté vlivem obsahu srdečních glykosidů (neriin, folineriin, oleandrin, adynerin, digitoxigenin). [35,37,39] Smrtelnou otravu způsobí požití 5-15 listů nebo 15 g kořene. Pokud je požit ve formě čaje, je nástup otravy rychlejší než u syrové drogy. Příznaky jsou velice podobné otravě digoxinem, a proto je shodná i léčba aktivním uhlím. Na akutní intoxikaci lze použít digoxin specifické protilátky (Fab), které jsou ovšem hodně drahé. [37]

Po požití nastoupí nevolnost, zvracení, bolest břicha, průjem, dysrytmie, hyperkalémie. Z farmakologického pohledu po GIT potížích následuje bradykardie s prodlouženým PR a QRS intervalem, může dojít k sinusové zástavě, různým stupňům AV bloku, junkční tachykardie, komorové ektopie. [3]

Mechanismus působení: srdeční glykosidy se váží na Na^+/K^+ ATPasovou pumpu na cytoplazmatické membráně buněk srdce a tím ji blokují. To má za následek ovlivnění $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ kanálů, vzroste koncentrace Ca^{2+} uvnitř buňky, a to vede ke zvýšení kontraktility myokardu (pozitivně inotropní účinek). [37]

V lidovém léčitelství má široké uplatnění: zažívací potíže, kožní onemocnění, malárie, srdeční selhání, abortivum, diuretikum (především list). Kořen je využíván na léčbu rakoviny, vředů, malomocenství a revmatoidní artritidy. [37,38]

Oleandr je bohatý zdroj sekundárních metabolitů: fenolické látky, třísloviny, terpenoidy, alkaloidy, saponiny, antrachinony. Fytochemické studie ukázaly, že v listech je obsah saponinů, riboflavinu, thiaminu a tříslovin. Kořen obsahuje vysokou koncentraci kyseliny askorbové a stopy alkaloidů β -karbolinového typu (reserpin). [35]

¹ pozn.: Žlutě kvetoucí druh je blíže příbuzná *Thevetia peruviana*. [35]

Methanolový extrakt z listů prokázal silnou antidiabetickou aktivitu (inhibuje α -glukosidasu a α -amylasu, což jsou enzymy zodpovědné za trávení sacharidů, zpomalí se tím rychlost uvolňování glukózy z potravy v tenkém střevě, tak jako akarbósa).^[40]

Obsahuje vysokou koncentraci kyseliny p-kumarové, k. jasmínové, k. gallové, k. vanilové, k. 4-hydroxybenzoové a rutinu. Prokázal se také vliv na AD svým neuroprotektivním účinkem především z oblasti květů. Hexanový extrakt obsahuje skvalen a α -tokoferol. Dichlormethanová frakce obsahuje k. ellagovou, methylgallát, katechin, reserpin (navzdory jaterní toxicitě má hepatoprotektivní potenciál).^[35]

Další aktivity, které se podařilo prokázat jsou: antineoplastická (rakovina tlustého střeva a prsu), antivirová, antifungální (proti *C. albicans*)^[18], antibakteriální (G^+/G^-), analgetická, neuroprotektivní, antioxidační (k. skořicová, k. chlorogenová, rutin, katechin, kvercetin), a také anticholinestrasová.^[35,36,41]

3.1.3.1.5. *Tabernaemontana divaricata*

Známá také jako „Crape Jasmine“. ^[42] Tento rod zahrnuje asi 120 druhů. ^[18] *T. divaricata* se řadí mezi nejvýznamnější zástupce rodu. ^[5]

Charakteristické jsou bílé trubkové květy, mléčný nebo vodnatý latexový exudát. ^[42] Jde o běžně rozšířenou zahradní rostlinu jihovýchodní Asie. Je rozšířena v Africe, Asii, Oceánii, Americe. ^[18]

V západní Indii se používá latex k hojení ran. Koagulovaný latex má stiptické vlastnosti^[42], proti bolesti břicha a bolesti v krku. ^[5] Semena a kůra se využívají při léčbě srdečních chorob a rakoviny. Zatímco odvar z kořene při plicních onemocněních.

Rostlina obsahuje hlavně MIA a bisindolové alkaloidy. Dále terpeny, laktony, steroidy, fenoly, flavonoidy. ^[42] Ethanolický extrakt působí tlumivě na CNS, dále vykazuje antinociceptivní a hypotenzní aktivitu, také působí jako kosterní myorelaxans. ^[43] Alkaloid koronaridin vykazuje antifungální aktivitu proti *Penicillium chrysogenum* srovnatelnou s nystatinem. Dichlormethanová frakce má významnou aktivitu proti houbovým kmenům *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. neoformans*, *C. cerevisiae*, *A. flavus*, *A. fumigatus*. ^[42]

Alkaloidy vykazují další účinky: antiflogistické, analgetické, sedativní, cytotoxické, na menstruační potíže, projímavé, afrodisiakální, antidiabetické, antikonvulzivní, antivirotické (aktivita proti viru herpes simplex typu 1) ^[43,44] Extrakt z kořene i stonku vykazuje inhibiční aktivitu proti AChE (nejvyšší aktivitu mají 2 bis-indolové alkaloidy 19,20-dihydrotabernamin a 19,20-dihydroervahanin). ^[43] Extrakt z květů měl slibnou bakteriostatickou aktivitu proti *E. coli* a *S. aureus*.^[18] Také využití pro prevenci zapomínání a zlepšení paměti ^[43]

Ibogamin, 3-oxokoronaridin, 12-methoxy-4-methylvoachalotin mají protinádorovou a cytostatickou aktivitu na rakovinu prsu, prostaty a tlustého střeva. Isovoacagin, voacangin pak na rakovinu ledvin, prsu, plic, varlat, vaječnicků, tlustého střeva a leukémii.

Conophyllin vykazuje antidiabetickou aktivitu. [42]

3.1.3.1.6. *Vinca minor*

Barvíněk menší, též známý jako barvíněk trpasličí, je bylina z čeledi Apocynaceae. [45] Rod *Vinca* je poměrně rozšířený v oblasti Středozemního moře, [46] původem ze severního Španělska. Dále je rozšířen v západní Francii, Evropě i na Kavkaze. [19] Barvíněk je jediný zástupce čeledi, který se u nás volně vyskytuje v důsledku zplanění. [7] Jedná se o vytrvalou plazivou rostlinu, při bázi dřevnatějící. Listy jsou kožovité, protistojné, zelené barvy. Květy jsou modré. Plodem je měchýřek. [19] Tato rostlina je blízce příbuzná s rodem *Tabernaemontana*. [18]

V lidovém léčitelství je používán na poruchy krevního oběhu (i v mozku), podporu metabolismu v mozku, při ztrátě paměti, hypertenzi, cystitidě, gastritidě, enteritidě, průjmech a DM. Zevně pak na bolest hrdla, podlitiny, abscesy, ekzémy a zástavu krvácení. [4,19]

Obsahuje především MIA (vinkamin, akuamicinin, minovicinin, lochericinin, vincadifformin). Některé alkaloidy mají bisindolovou strukturu, stejně jako u *Catharantus roseus* (vinkristin, vinblastin). [4,45]

Extrakt vykazuje antineoplastické (buněčné linie karcinomu tlustého střeva HT-29 a kolorektálního karcinomu Caco-2), antidiabetické, baktericidní, antihypertenzní, analgetické, antiflogistické, antioxidační, antimalarickou, antiulcerózní, anticholinesterasové a antitrombotické účinky. Stále probíhají další studie, které se snaží najít nové aktivity. [18,19,45,46]

Bylo vyizolováno více než 50 MIA, některé mají vysokou biologickou aktivitu a nachází využití ve farmaceutických přípravcích.

Vinpocetin, syntetický derivát vinkaminu, je používán pro léčbu cerebrovaskulárních poruch (mrtvice, senilní demence a poruchy paměti). Vinpocetin v terapeutických dávkách nevykazuje nežádoucí účinky a je vhodný pro dlouhodobou terapii. [47] Dokáže překonat hematoencefalickou bariéru (HEB) a vstoupit do mozku. Spolu s vinkaminem vykazují vazodilatační aktivitu a používají se tak k léčbě kardiovaskulárních poruch. Také významně posilují průtok krve mozky – mozkové vazodilatátory (inhibitor PDE-1). [47] Nachází využití při neurodegenerativních onemocněních jako je Alzheimerova choroba (AD), PD,

Huntingtonova choroba. ^[7,45] Také vykazují silný protizánětlivý účinek (inhibuje expresi NF- κ B a TNF- α). ^[47]

Zastoupení alkaloidů v rostlině je nízké, proto je nutná rozsáhlá sklizeň, což je finančně náročné a rostliny ohrožuje, hrozí tak jejich vyhynutí. ^[4]

3.1.3.2. Čeleď *Loganiaceae*

Čeleď je tvořena vyššími dvouděložnými rostlinami. Zástupci čeledi jsou hlavně byliny, keře, liány a vzácně stromy. Listy jsou vstřícné, někdy střídavé, celokrajné. Žilnatina zpeřená nebo od báze 3-7 žilná. Někdy můžeme pozorovat úžlabní trny nebo úponky. Květy jsou oboupohlavné okolíkované nebo redukované na jeden květ. Listeny bývají obvykle malé, kalich i koruna jsou 4-5 laločné. Semeník je svrchní nebo polospodní. Plodem je tobolka, bobule nebo peckovice.

Čeleď zahrnuje asi 350 druhů v 15 rodech. Vyskytuje se v tropech a subtropích, některé druhy zřídka i v mírném podnebném pásu. Hlavní obsahové látky jsou indolové alkaloidy, strukturně blízké čeledi *Apocynaceae*. ^[48,49]

3.1.3.2.1. *Strychnos nux-vomica*

Patří do čeledi *Loganiaceae*. ^[1] Stálezelený strom dorůstající do výšky 15 metrů. Pochází z Indie, Cejlonu, Malajsie. Pěstuje se v západní Africe. ^[7,50] Semena jsou jemně plstnatá, zploštělá, uložena v bobulích. Plody jsou zdrojem iridoidních glykosidů. ^[50]

Hlavními alkaloidy jsou strychnin a brucin. Strychnin je centrální analeptikum s dlouhým účinkem a také zvyšuje tonus svalů. V toxických dávkách působí jako křečový jed. Terapeutické rozmezí je velice úzké. Brucin lze použít jako standard hořkosti. Jeho účinek je asi 50x nižší než u strychninu. ^[7]

Semena jsou v ajurvédě dlouho využívána pro léčbu ochrnutí, DM, kapavky, anémie, bronchitidy. Tradiční čínská medicína používá semena k léčbě revmatoidní artritidy, otokové bolesti, trauma, zlomeniny kostí, myastenii gravis. ^[51]

Mezi prokázané aktivity patří cytotoxicita (proti buňkám epidermálního hrtanu, karcinomu prsu), analgetikum, antipyretikum, antiflogistikum (tyto aktivity jsou pravděpodobně částečně způsobeny přítomností fenolových sloučenin), antioxidant, působí proti hadímu kousnutí. Extrakt ze semen vykazuje antioxidační aktivitu (zabraňuje peroxidaci lipidů), potlačuje aktivitu na alergeny specifickou odpověď IgE protilátek. Antiproliferační a cytotoxická aktivita je pravděpodobně způsobena alkaloidy strychninem a brucinem, které se vyskytují v kořenech.

V listech je strychnin a vomicin. Extrakt z listů má silnou antinociceptivní aktivitu. Periferní analgetický účinek může být zprostředkovaný inhibicí cyklooxygenasy a lipooxygenasy. Flavonoidy (deriváty kaemferolu, quercetinu a rutin) inhibují biosyntézu prostaglandinů (konečné produkty COX a LOX). Centrální analgetický účinek může být zprostředkován inhibicí centrálních receptorů bolesti. [1]

3.1.3.3. Čeleď *Fabaceae*

Do této čeledi patří byliny i dřeviny. Kořeny mají převážně hlízky (symbióza s nitrogenními bakteriemi rodu *Rhizobium*). Listy mají uspořádání střídavé, jednoduše zpeřené nebo dlanitě složené, vzácně jsou i jednoduché, palistnaté. Palisty někdy vytvářejí trny (trnovatí). Květenství bývají většinou hroznovitá, někdy se vyskytují jednotlivé květy. Jsou oboupohlavné, souměrné, kalich i koruna srostlé z pěti lístků. Plodem je lusk, který puká v jednom nebo dvou švech, je bez přepážky, vzácně s podélnou přepážkou. Někdy může být lusk nepukavý (obdoba nažky) s jedním nebo více semeny bez endospermu nebo s endospermem jen nepatrně vyvinutým.

Zástupci čeledi jsou rozšířeni po celém světě. Existuje cca 12000 druhů ve 480 rodech. Zástupci ve formě dřevin se nacházejí především v teplých podnebních pásech. Čeleď je využívána hlavně pro dřevo a plody. [52,53]

3.1.3.3.1. *Physostigma venenosum*

Jde o liánu, vyskytující se v tropické západní Africe. Květy jsou velmi podobné květům fazolí. Plodem je dřevnatý lusk dlouhý až 20 cm s obsahem 1-3 semen ledvinovitého, mírně zploštělého tvaru (lidově nazývána jako semena kalabar). Jsou bez zápachu s moučnou nasládlou chutí. Mezi domorodci je rozšířené označení „esere“ a používají je k tzv. božím soudům, kdy obžalovaný musel vypít nápoj ze semen a tím prokázat svoji vinu (pokud zemře) nebo nevinu. [6,7]

Nejdůležitější alkaloid je fysostigmin. Jde o silný reverzibilní inhibitor acetylcholinesterasy, působící jako parasymptomimetikum. Zvyšuje množství acetylcholinu v oblastech cholinergního přenosu (na periférii i v CNS) [6,54] V oftalmologii se používá jako silné miotikum, používá se při léčbě glaukomu, stahuje oční zornici a tím usnadňuje odtok vody. [6,7,55] Fysostigmin také zlepšuje ukládání informací do dlouhodobé paměti. [54] Při rozkladu fysostigminu vzniká jako hlavní metabolit eserolin (s účinky podobnými morfinu), který vede k nežádoucí stimulaci CNS, způsobuje smrt neuronálních buněk důsledkem ztráty adenosintrifosfátu (ATP). Na světle a v teple je fysostigmin nestabilní a rychle se degraduje na rubreserin (červená barva) [54]

Základem mechanismu působení fysostigminu je vazba karbamátové funkční skupiny na aktivní místo cholinesterasy. Může sloužit také jako ochrana před organofosfáty (bojové látky způsobující intenzivní svalové křeče), které se vážou. Další využití fysostigminu je při patologické únavě, presenilní demenci. [55]

Další alkaloidy zastoupené v semenech jsou geneserin, eseramin, fysovelin, kalabarin, eseridin, fytosterin. [54] Alkaloidní zastoupení v semenech je kolem 0,5 %. Zbytek tvoří primární metabolity – bílkoviny (25 %), škrob (50 %) a olej. [6]

3.1.3.4. Čeleď *Zygophyllaceae*

Čeleď je zastoupena jednoletými či vytrvalými bylinami nebo keři. Pryskeřičnaté palisty jsou často silně vonné a lepkavé, v párech jsou na bázi listů, volné, vytrvávající nebo vzácně i opadavé. Případně může dojít k metamorfóze v trny. Listy jsou často lichozpeřené, vzácně jednoduché, s palisty. Květy se vyskytují v úžlabí listenů jednotlivě nebo ve vidlanových květenstvích. Květy jsou oboupohlavné, většinou pětičetné. Plod se rozpadá na jednoplodolistové plůdky, popř. méně často na tobolky nebo bobule. [56,57]

Existuje asi 25 rodů, zahrnující asi 170 druhů. Převážně v suchých polopouštních a pouštních oblastech subtropů na obou polokoulích. Někteří zástupci jsou bohatí na obsah dusičnanů a mohou být jedovatí pro ovce a dobytek. [56,57]

3.1.3.4.1. *Peganum harmala*

Harmala stepní je polokeř, který patří do čeledi *Zygophyllaceae*. Rod *Peganum* zahrnuje 6 druhů. [58] Roste v Íránu, na severu Afriky, jihozápadu Ameriky i v Austrálii. [6]

Je to vytrvalá bylina dorůstající do výšky 30-60 cm. Kořeny jsou krátké, plazivé. Květy jsou světle žluté až bílé. Listy má úzké, střídavě uspořádané na tuhém zeleném stonku. Plodem jsou tobolky trojúhelníkovitého tvaru. Zelené plody jsou nezralé a postupně mění barvu na oranžovohnědou. [59]

Bylo izolováno více než 300 sloučenin různých strukturních typů. [58] Hlavními obsahovými látkami jsou β -karbolinové alkaloidy (harmin, harmalin, harmanol) a chinazolinový typ alkaloidů (peganin, vascin, vascinon, deoxyvascinin s antitusickými, expektoračními, bronchodilatačními účinky). [6,58] Nejvíce alkaloidních látek obsahují semena a kořeny. [58,59] Stonky a listy mají pouze nízký obsah alkaloidů a v květech nejsou zastoupeny vůbec. [58] V tradiční medicíně se používá jako karminativum, galaktagogum, diuretikum, emetogogum, antitrombotikum a analgetikum. [59] Odvar se používá při onemocnění plic a jater. Obklady ze semen se využívají při paralýze, bolesti kloubů a bolesti zad. Kadidlo ze semen se používá na bolest zubů. [59] Aktivní alkaloidy mají široký rozptyl farmakologických účinků:

analgezie (centrálně i periferně), halucinace, antidepressiva, neuroprotektce, iMAO (antiparkinsonismus iMAO-B).^[59]

Studie prokázaly poměrně velké množství účinků: na KVS (snížení systémového arteriálního tlaku, snížení periferního cévního odporu, bradykardie, zvýšení srdeční kontraktility), antimikrobiální aktivita (antifungální, antibakteriální, insekticidní, antileishmaniální) a antiproliferativní aktivita. Studie prokázaly i účinky neurologické, insekticidní, antineoplastické, gastrointestinální, antiemetické a antidiabetické (ke snížení hladiny glukózy v krvi stejně účinný jako metformin),^[58] posilující vidění. Dále působí jako antiepileptikum a antipsychotikum.^[59] Má také spoustu nepříznivých účinků: neurosenzorické příznaky, vizuální halucinace, bradykardie, hypotenze, agitovanost, třes, ataxie, potraty a zvracení. Během těhotenství je užívání kontraindikováno, kvůli abortivním a mutagenním účinkům (interkalace do DNA).^[59]

Harmin nachází použití při onemocnění extrapyramidálního systému (PD) a amébové dysenterii.^[6] Inhibuje AChE.^[58] Dále prokázal účinnost proti *C. albicans*, *A. fumigates*, *A. niger*, *A. flavus*.^[59] Harman vykazuje vyšší aktivitu proti *E. coli* a *A. niger*. Harmalin je účinnější proti *C. albicans*.^[60]

Harmin i harmalin mají antiplasmodiální aktivitu proti *Plasmodium falciparum*^[59] a protinádorový účinek díky inhibici topoizomerasy DNA, vykazují aktivitu na hepatokarcinom, fibrosarkom, myelom, rakovinu prsu, rakovinu vaječníků, melanom.

Harmalin je 2x toxičtější než harmin. Způsobuje třes a klonické křeče.

Harman, norharman působí antidepressivně přes BZD receptory.^[58]

3.1.3.5. Čeleď *Clavicipitaceae*

Zástupcem tohoto rodu je *Claviceps purpurea* (paličkovice nachová). Jedná se o parazitující vřeckovýtrusnou houbu, která napadá semeníky trav, hlavně žita. Semeníky přeměňuje v růžkaté sklerocium – námel. Sklerocium poté vypadává z klasu na zem, kde přezimuje. Na jaře z něj vyrůstají plodnice – stromata, které jsou stopkaté, růžové a kulovité. Vyprodukuje nitkovité výtrusy, z kterých vznikají askospory. Ty jsou unášeny větrem na kvetoucí žito. Askospory vyklíčí v hyfy pronikající do semeníku, který rozrušují. Semeník poté spolu s houbovým pletivem produkuje slizovitou hmotu. Asi 14 dní po infekci vylučuje sladkou lepkavou tekutinu – medovici. Ta je prostoupena konidiemi, které jsou roznášeny hmyzem na další květy, tím dochází k sekundární konidiové infekci. Během vyživování hostitelské rostliny se sfacelium rychle vyvine a ve sklerociu se opět přetváří na námel. Takto se celý cyklus opakuje.^[6]

3.1.3.5.1. *Secale cornutum*

Patří mezi významné přírodní toxiny, ale i léčiva. Námelové alkaloidy mají tradiční využití proti migréně, při porodech a potratech. [61]

Námel je produkován především rodem *Claviceps*. Jednotliví zástupci se liší hostitelskou specifitou. Jedná se o parazitující houby na více než 600 druzích jednoděložných rostlin, včetně důležitých obilovin jako žito, ječmen, rýže, proso, kukuřice a oves.

Claviceps purpurea je rozšířený v Evropě a dokáže nakazit přes 400 druhů rostlin námelem (běžný název „Ergot Fungus“). Tmavé sklerotie jsou bohatým zdrojem farmaceuticky významných námelových alkaloidů.

Ve středověku běžně docházelo ke konzumaci žitného chleba, který byl kontaminován námelem, a tak docházelo k hromadným otravám (ergotismy). [62]

Existují tři skupiny námelových sloučen:

- peptidy (ergopeptiny) – ergotamin,
- klavinové alkaloidy (deriváty 6,8-dimethylergolinu),
- amidy kyseliny lysergové – ergometrin, methylegometrin [63]

Farmakologická aktivita je způsobena podobností sloučenin od kyseliny D-lysergové s neurotransmitery jako noradrenalin, dopamin a serotonin. Námelové alkaloidy mohou interagovat s receptory pro tyto neurotransmitery (agonisté i antagonisté – v závislosti na substituentech karboxylové skupiny). [61,62] Bylo objeveno přes 40 sloučenin z nichž 6 může způsobit toxicitu interakcí s neurotransmitery (ergotamin, ergokornin, ergokryptin, ergokrystin, ergosin, ergometrin). [63]

Námel na rostlinách je vysoce rizikový i pro zvířata. U lidí je dnes otrava námelem velice vzácná. Dříve byl používán k léčbě Parkinsonismu a dalších endokrinních a neurologických poruch. Ergotamin se využíval v porodnictví k zastavení poporodního krvácení. Dalším alkaloidem, který ovlivňuje dělohu je ergometrin, který může způsobit kontrakce dělohy a lze ho též použít k zástavě poporodního krvácení. Dnes se používá hlavně ergotamin a dihydroergotamin k zastavení laktace, při migrenózních stavech (receptory 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D}, 5-HT_{1F} – léčba a profylaxe migrény, ve srovnání s triptany působí déle). [64]

Bromokriptin se používá při léčbě AML (akutní myeloidní leukemie – druh rakoviny, který postihuje krev a kostní dřeň). Indukuje apoptózu buněk AML. Dále k léčbě rakoviny prsu (downregulace prolaktinu, tím snižuje až potlačuje proliferaci buněk) [63] a hyperprolaktémie nebo PD.

Nicergolin se používá na léčbu demence a vaskulárních poruch (cerebrální trombóza).

Alkaloidy jako dihydroergokristin, dihydroergocornin, dihydroergokryptin mohou být prospěšné pro léčbu demence a s věkem souvisejících kognitivních poruch (Alzheimerova choroba).

Námel také vyvolává cytotoxické a apoptotické účinky, používá se jako protirakovinová terapie. Důležité je postupovat opatrně, protože námel je silný vasokonstriktor a může mít vážné nežádoucí účinky na kardiovaskulární systém (arytmie, koronární vasospasmus a smrt). Může vyvolat serotoninový syndrom – dochází k serotoninergní hyperstimulaci a může dojít k rozvoji křečového ergotismu (charakterizovaný příznaky změn chování a duševních poruch). Námel není vhodný pro pacienty s HIV, kdy dochází k interakci s protivirovou léčbou. ^[64]

3.2. *Geissospermum vellosii*

3.2.1. Taxonomické zařazení

Doména: Eukarya

Říše: Plantae

Podříše: Tracheobionta

Kmen: Spermatophyta

Oddělení: Magnoliophyta

Třída: Rosopsida.

Podtřída: Asteridae.

Nadřád: Gentiananae.

Řád: Gentianales

Čeleď: Apocynaceae

Podčeleď: Rauvolfioideae.

Rod: *Geissospermum*

Druh: *Geissospermum vellosii* Allemão ^[65]

3.2.2. Charakteristika

G. vellosii je nejznámější druh rodu *Geissospermum* (další druhy jsou *G. argenteum*, *G. reticulatum*, *G. sericum*, *G. urceolatum* – mají podobné tradiční použití). ^[66] Pochází z Bolívie, Brazílie, Kolumbie, Ekvádoru, Francouzské Guyany, Peru a Venezuely. ^[67] Známy také jako *G. leave*, *G. martianum*, *Tabernaemontana laevis*, Pao pereira, Pau-pereira, quina-na („falešný chinin“), quina-quina (odkazuje na hořkost chininu), acari, acariquara a další. ^[66]

Strom roste v amazonském pralese, je vysoký až 80 m s průměrem kmene do 3 metrů. Kmen je rozbrázděný, světle hnědý až žlutý. Listy jsou uspořádané střídavě, květy jsou nápadné, bílé barvy. Kvete od září do listopadu. Plody jsou rohovité (2 folikulovité segmenty jsou srostlé), zralé mají žlutou barvu, masitá dužina je hořké chuti. Semena jsou bílá, plochá (v každém plodu je obsaženo 5-15 semen). Plody a konce větví produkují latex. ^[66]

První zmínky o rodu *Geissospermum* učinil v 19. století doktor Freire Allemão. ^[68] Je zajímavé, že rozlišení mezi *Geissospermum* a velice podobnou rostlinou zvanou *Aspidosperma* se povedlo již v roce 1876. ^[69]

3.2.3. Lidové léčení

Druhy *Geissospermum* jsou široce rozšířeny v lidovém léčení v oblasti Amazonie. Domorodí jihoameričtí indiáni využívají jejich kůru a listy. ^[69] Kůra stromu je hořká a má

spoustu léčivých vlastností. V lidovém léčitelství se používá na léčbu bolesti, onemocnění jater, horečku, ztrátu chuti k jídlu, špatné trávení, jako sexuální stimulant, na posílení imunitního systému ^[70], závratě, zácpu, průjem, krvácení, astenie, malárii a mnoho dalších. Odvar z kůry může vyvolat potrat. ^[66]

3.2.4. Použití

Druhy rodu *Geissospermum* vykazují antiplasmodiální, antibakteriální, antivirové, antinociceptivní, antiflogistické účinky a také antineoplastickou aktivitu (na rakovinu prostaty, vaječníků a pankreatu). ^[71] Obsahuje MIA a β -karbolinové alkaloidy. ^[71] Kromě alkaloidů jsou zastoupeny flavonoidy a další polyfenolické látky. ^[69,72] V současné době zájem o rostliny z Jižní Ameriky roste, důvodem jsou zajímavé aktivity těchto rostlin. ^[72]

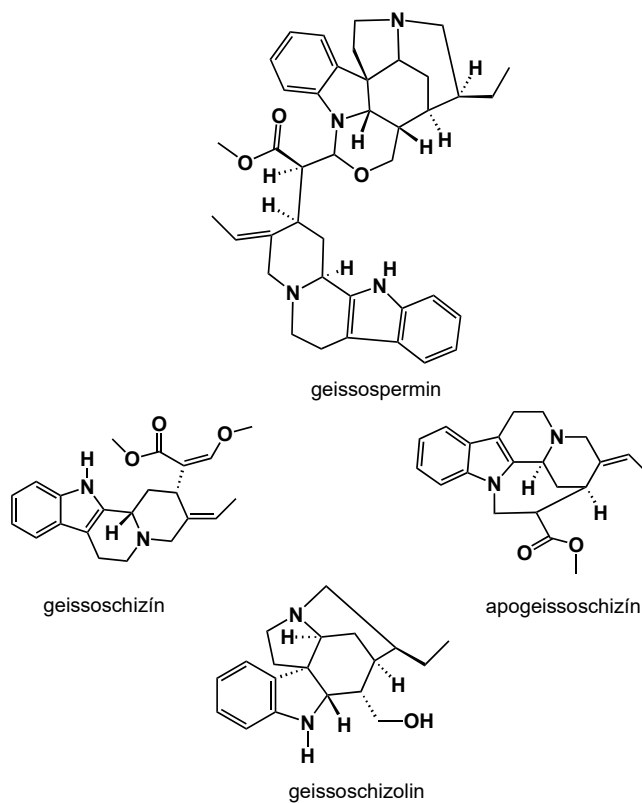
3.2.5. Obsahové látky

Obsahuje velké množství indolových alkaloidů. Hlavně v kůře stromu (Tab. 3).

Alkaloid	Biologická aktivita
flavopereirin	léčba rakoviny, HIV/AIDS
12-methoxy-1-methyl-aspidospermin	antinociceptivní
geissospermin a další	anticholinesterasová
flavoperein, aspidokarpin, geisolosimin	antiplasmodiální
flavopereirin, geissoschizolin, geissospermin	snižují vychytávání serotoninu

Tabulka 3: aktivity alkaloidů obsažených v *G.vellosii* ^[66,73]

Geissospermin je první alkaloid izolovaný z *G. vellosii* (1877). Obsahuje ve své struktuře cyklickou etherovou skupinu, která je relativně nestabilní. Po provedení kyselé hydrolyzy poskytl tento bisindolový alkaloid 3 štěpné produkty geissoschizin, apogeissoschizin a geissoschizolin (Obr. 9). ^[66,74]

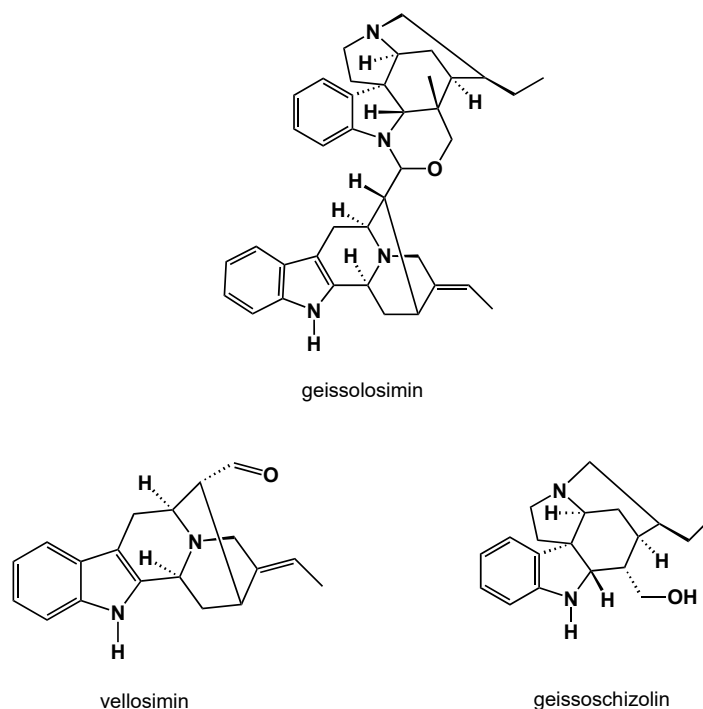


Obrázek 9: geissospermin a produkty jeho kyselé hydrolyzy [75]

Geissoschizolin má protizánětlivé účinky (snižuje mikroglální uvolňování NO a TNF- α). [76]

Pereirin (geissoschizolin) byl první izolovaný alkaloid v Brazílii. Své využití našel při léčbě malárie. [66]

Dalším dimerním alkaloidem je geissolosimin, který se hydrolyzuje na vellosimin a geissoschizolin (Obr. 10).



Obrázek 10: geissolosimin a produkty jeho kyselé hydrolyzy [75]

3.2.6. Biologické aktivity

Přírodní látky, zejména alkaloidy, které jsou zastoupeny v *Geissospermum vellosii* Allemão mají řadu zajímavých aktivit, z nichž ty nejdůležitější jsou v této práci zmíněny. [77]

3.2.6.1. Antinociceptivní aktivita

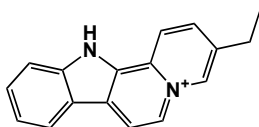
Bolest je percepce nocicepce, která se uskuteční v mozku. Pocit bolesti je jedinečný pro každého člověka a je odlišný od nocicepce. Bolest není stimul, ale komplexní percepce, která má hluboké afektivní a kognitivní vlastnosti. Nocicepce je aktivita, která se odehrává v periferních nociceptivních drahách. Zprostředkuje přenos informací o škodlivých událostech (poškození tkání, vznik zánětu atd.), stimul pokračuje do dorzálních spinálních rohů a dále do mozku. Po výstupu z mozku již mluvíme o bolesti. [78]

Surový extrakt *G. vellosii* i jeho dichlormethanová frakce podaná intraperitoneálně dokázala inhibovat viscerální nocicepci (vyvolanou kyselinou octovou) a také neurogení i pozdější zánětlivou fázi bolesti (vyvolanou injekcí formalinu). Studie byla provedena na myších.

Z výsledků se došlo k závěru, že antinociceptivní účinek dichlormethanové frakce je spojen s interakcí s 5-HT receptory (5-HT_{1A}, 5-HT₂, 5-HT₃ – modulují nociceptivní přenos). Serotoninergní systém je důležitý pro mechanismus potlačení bolesti. Tento systém může potlačit škodlivý vjem přicházející do míchy a zabránit tak vzniku bolesti. [73]

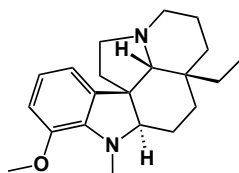
Ve srovnání s indometacinem byly podobné dávky ethanolového extraktu Pao pereira dvakrát účinnější. Předpokládá se, že *G. vellosii* nemá centrální analgetický účinek (antinociceptivní aktivita nesouvisí s opioidním systémem). [9]

Zjistilo se, že některé alkaloidy z *G. vellosii* snižují absorpci serotoninu synaptosomy potkanů *in vitro* (flavopereirin, geissoschizolin, geissospermin). Z toho se usuzuje, že serotoninergní systém se skutečně podílí na antinociceptivních účincích extraktu (Obr. 11).



Obrázek 11: flavopereirin [75]

Antinocicepce byla významně oslabena u myši, kterým byl podán PCPA (methylester p-chlorfenylalanin), inhibitor syntézy serotoninu. Hlavní alkaloid s antinociceptivní aktivitou izolovaný z dichlormethanové frakce je 12-methoxy-1-methyl-aspidospermidin (Obr. 12). [73]



Obrázek 12: 12-methoxy-1-methylaspidospermidin [75]

3.2.6.2. Anticholinesterasová aktivita

Studie, která byla provedena, dokázala, že extrakt *G. vellosii* má acetylcholinesterasovou inhibiční aktivitu (iAChE) v mozku potkanů a elektrických úhořů (*Electrophorus electricus*). Byl použit Ellmanův kolorimetrický test na tenkovrstvé chromatografii. Frakce, která měla tuto aktivitu, byla bohatá na geissospermin (hlavní alkaloid *G. vellosii*). Extrakt prokázal také inhibici butyrylcholinesterasy (iBChE) koňského séra. Záleželo na koncentraci. U úhoře byla IC₅₀ asi 15x nižší (2,9 µg/ml) než u potkanů (IC₅₀ = 39,3 µg/ml). Mezi jednotlivými druhy AChE je citlivost na iAChE značně variabilní. Testovaná frakce extraktu (o pH=7) byla 25x účinnější proti iBChE než iAChE. Tím může zlepšit kognici a potencionálně kontrolovat neurozánět. [9] Testovaná frakce bohatá

na geissospermin prokázala, že se dokáže vázat na lidský enzym AChE. Způsob vazby do aktivního místa enzymu AChE není zatím známý.

U pacientů s AD bylo zjištěno, že aktivita AChE klesá, zatímco BChE aktivita stoupá. Ve studii se kromě AChE aktivity *in vitro* hodnotil vliv na zlepšení (zvýšení) paměti *in vivo*. Myším, na kterých byla studie prováděna, se podával skopolamin, který u nich vyvolal amnézii. Došlo ke zvrácení amnézie navozené skopolaminem. Míra odstranění kognitivních deficitů záležela na koncentraci. Předpokládá se, že ve vyšších dávkách extraktu dochází k presynaptické stimulaci muskarinových M₂ receptorů. To způsobuje pokles uvolněného acetylcholinu, což se negativně ovlivňuje kognitivní deficit. [8]

Cílem je návrh nových potenciálních inhibitorů AChE, které jsou relevantní pro léčbu AD. [8,77]

3.2.6.3. *Antiplasmodiální aktivita*

Malárie patří mezi nejzávažnější parazitární nákazy na světě. Má poměrně vysokou mortalitu i morbiditu. Ročně se vyskytne asi 247 milionů případů, z toho asi 1 milion nakažených nemoci podlehne. Vyskytuje se nejčastěji v tropických oblastech odkud se rozšiřuje do všech částí světa. Nákaza je vyvolána prvoky druhu *Plasmodium* a je roznášena vektory – komáry rodu *Anopheles*. Toto onemocnění přenáší jen samice.

Přenos probíhá tak, že komár nasaje krev z nakaženého jedince. V trávicím traktu, tělní dutině i slinných žlázách komára zůstanou gametocyty obsažené v erytrocytech. Ty se vyvinou v tzv. sporozoity – sexuální fáze dělení. Pokud komár saje krev zdravého člověka, zanesou do jeho krevního řečiště sporozoity, ty se krví šíří do jater, kde se asi 14 dní množí a dozrávají v merozoity, které se dostávají do krve a napadají erytrocyty. Tato fáze je bezpříznaková. V erytrocytech dochází k dalšímu množení, tentokrát nepohlavnímu, což postupně vede k jejich lýze. Některé merozoity se mění v gametocyty a celý cyklus se opakuje.

Pokud jde o mírnou nekomplikovanou formu nemoci, pak mezi klinické projevy patří především horečka, zimnice a pocení. Dále se objevuje bolest hlavy, zvracení, vodnatý průjem, někdy i anémie.

Těžká forma má vyšší úmrtnost. Mezi klinické projevy patří malarická anémie, hemoglobinurie, hypoglykémie, metabolická acidóza (vede k respiračním potížím), akutní selhání ledvin, oběhový kolaps až nezvratné kóma (cerebrální malárie). [79,80]

V dnešní době se výskyt malárie opět zvyšuje, *Plasmodium falciparum* je stále více rezistentní k dostupným antimalarikům. WHO odhaduje, že každým rokem se objeví po celém

světě asi 300–500 milionů nových případů. Hlavní místo výskytu je Afrika, Asie a Jižní Amerika.

Používané léky jsou odvozené od chininu a artemisinu. Rezistence na tyto léky narůstá, proto je snaha o vývoj nových léků, účinných proti parazitům, jejichž buněčná stěna je velice špatně propustná. [81]

Také při léčbě malárie prokázal extrakt z *G. vellosii* aktivitu (i tam, kde ani chinin nepomohl) zvláště v léčbě intermitentních horeček.

Alkaloid pereirin používaný k léčbě v tradiční medicíně je účinnější než chinin, přesto se *G. vellosii* používá spíše jako prevence než léčba (pro léčbu pouze pokud selhala léčba chininem). [82]

Proběhly fytochemické studie a bylo izolováno několik sloučenin, které podstoupily testování na aktivitu proti kmenu *P. falciparum*, který je citlivý na chlorochin.

Methanolová frakce extraktu, která je bohatá na polární látky, prokázala poměrně výraznou antileishmaniální aktivitu (flavopereirin je hlavním alkaloid v této frakci), zatímco hexanová a ethylacetátová frakce neprokázaly slibnou aktivitu. Alkaloid flavopereirin je aktivní proti *P. falciparum* (antiplasmodiální aktivita *G. vellosii* souvisí především s tímto alkaloidem). Ve srovnání s amfotericinem B bylo prokázáno, že flavopereirin je selektivnější (po 24 i 72 hodinách). Dalším alkaloidem je geissolosimin, který vykazoval nejvyšší antiplasmodiální aktivitu. Hledání nových terapeutických alternativ k amfotericinu B je důležité kvůli jeho obtížnému použití (poměrně vysoká toxicita). [74]

Vývoj antimalarik je důležitý, protože parazité jsou stále více rezistentní vůči používaným sloučeninám. [82]

3.2.6.4. Benigní hyperplazie prostaty

Benigní hyperplazie prostaty (BHP) a rakovina prostaty jsou dvě nejčastější urogenitální patologie u starších mužů, které často koexistují u stejného pacienta.

BHP je progresivní zvětšení prostaty, které přichází s věkem (50 % u mužů po 50. roce, 80 % po 80. roce). Zvětšující se tkáň vyvolává nepříjemné symptomy dolních cest močových v důsledku komprese močové trubice a močového měchýře. Tím narušuje močení a ovlivní i spánek (noční nutkání k močení) a dochází tak celkově ke snížení kvality života. [83]

BHP vzniká pouze v centrální žláze prostaty. Mechanismus původu BHP není zcela pochopen. Důkazy naznačují, že jde o narušení homeostázy androgenní regulace, která upřednostňuje proliferaci před buněčnou smrtí apoptózou. Hlavním androgenem je

dihydrotestosteron (DHT), který vzniká z testosteronu enzymatickým působením 5 α - redukasy.

Změna rovnováhy testosteronu a DHT je podmíněná věkem. DHT má až 3x vyšší afinitu k androgennímu receptoru. Je tedy důležitým mediátorem rozvoje BHP. Vysoké hladiny DHT zvyšují hladinu prostatického specifického antigenu (PSA).^[69]

Léčba je řešena pomocí inhibitorů 5 α - redukasy (5ARI) a α_1 blokátorů. Tato léčiva mají několik vedlejších účinků (erektilní dysfunkce a kardiovaskulární rizika).^[69] Hlavním účinkem 5ARI je podpora buněčné atrofie a apoptózy v epiteliálním kompartmentu prostatické tkáně (dojde ke zmenšení celé prostaty, a tím uvolní kompresi podél močové trubice, což zmírní symptomy dolních močových cest indukované BHP).^[83]

Použití 5ARI, jako chemoprevence ke snížení incidence a oddálení progresu rakoviny prostaty, se ukazuje jako slibná strategie. Účinky na růst nádoru prostaty nejsou zatím zcela pochopené. Předpokládá se, že podporují apoptózu nádorových buněk. Také indukují zmenšení prostaty, což ale snižuje inhibiční účinek na nádory. Prostata se běžně zvětšuje s věkem – mechanické namáhání. Soupeření mezi mechanickým účinkem a apoptotickou upregulací vede ke kontroverzním názorům na vliv 5ARI na rakovinu prostaty.

Zvýšení apoptózy je zřetelně vyšší v prvních měsících terapie, pak ale převládá spíše zmenšování prostaty.^[83]

Bylinná léčba je považována za dobrou alternativu, protože někdy vykazuje srovnatelné výsledky a méně nežádoucích účinků. Mezi nejpoužívanější patří extrakty ze *Serenoa repens*, *Pyogenum africanum*, *Secale cereal*.

Při podávání extraktu z *G. vellosii* potkanům s BHP (vyvoláno podáváním testosteronu) došlo ke snížení hmotnosti prostaty, srovnatelné s potkanem, kterému byl podáván finasterid (inhibice exprese AR). Extrakt obsahuje flavopereirin, u kterého byla objevena cytotoxická aktivita na epitelu lidské prostaty (zastavení buněčného cyklu ve fázi G2/M). Flavopereirin potlačoval expresi SRD5A1, AR a PSA. Jako další alkaloidy byly v extraktu přítomny geissolosimin, geissospermin, geissoschizin. Použití extraktu nesnižuje počet spermií u potkanů (což je vedlejší účinek finasteridu).

Extrakt *G. vellosii* může potlačit BHP snížením tloušťky vrstvy epiteliálních buněk prostaty a zvětšením plochy lumenu. Jeví se tedy jako velice prospěšný v léčbě BHP.^[69]

3.2.6.5. Protinádorová aktivita:

Onkologická onemocnění jsou v dnešní době velice častou příčinou úmrtí. Dnešní terapie je založená především na syntetických chemoterapeutikách (hodně vedlejších účinků,

často se objevuje rezistence), proto se hledají stále nové látky. Díky novým látkám je možné snížit dávky chemoterapeutik a tím i omezit nežádoucí účinky.^[84]

Tumor supresorové geny fungují jako brzda cyklu růstu buněk, replikace DNA a dělení buněk. Pokud tyto geny nefungují správně, dochází k nekontrolovanému růstu – rakovině.

Protein p53 byl popsán poprvé v roce 1979. Téměř u všech typů rakoviny u lidí bylo prokázáno, že tento protein nefunguje správně. Protein p53 je aktivovaný pouze při stresu nebo poškození buněk. Protein p53 zastaví buněčný cyklus těchto buněk a dojde k jejich apoptóze. Protein p53 může způsobit smrt přímou stimulací mitochondrií a produkcí nadbytku toxické reaktivní formy kyslíku.^[85]

Přírodní produkty a později i jejich deriváty jsou již po staletí považované za významný zdroj nových léčiv. Vinka alkaloidy byly prvními alkaloidy používanými v klinické praxi. Další byly taxany, kampoteciny a topotekan.^[84] Protirakovinná činidla byla obvykle hodnocena z hlediska jejich schopnosti indukovat apoptózu. Mechanismů stimulace apoptózy je několik:

- downregulace antiapoptotických genových produktů, jako je Bcl-2 (B-buněčný lymfom 2) a Bcl-XL (extra large),
- downregulace inhibitoru proteinů apoptózy, např. CIAPs, XIAP (X- chromozom vázaný inhibitor apoptózového proteinu),
- upregulace proapoptotických faktorů (gen Bax), uvolnění mitochondriálního cytochromu C, inhibice NF-κB signální dráhy.

Rakovinné buňky jsou schopné pohybovat se lymfatickými a krevními cévami a mohou obsazovat další zdravé tkáně tzv. metastázovat.^[11]

3.2.6.5.1. Koloréktální karcinom

Koloréktální karcinom (CRC) je agresivní maligní nádor. Je rozšířen po celém světě a je příčinou vysoké morbidity a mortality. Jde o třetí nejčastější nádorové onemocnění. Prognóza pacientů není příznivá, a proto je nutné pracovat na vývoji nové strategie léčby.

Jako první volba je chirurgická operace a chemoterapie, ale i tak se často objevují recidivy a systémové metastázy, což snižuje šanci na přežití pacienta až na 5 %. Proto je nutné vývoj účinného terapeutického činidla s nízkou toxicitou.

Irinotekan (IRN) je vysoce účinný lék proti CRC, který působí na topoizomerasu I, tím ovlivní replikaci DNA a také transkripci. Dlouhodobé systémové podávání IRN má za následek mnoho nežádoucích účinků (cholinergní syndrom, průjem, neutropenie).^[86]

Flavopereirin (3-ethyl-12H-indolo[2,3-a]-chinolizinin chloristan) prokázal poměrně výrazné snížení životaschopnosti nádorových buněk CRC (pouze nádorových). Větší inhibiční

účinek byl zpozorován po 24 hodinách ($IC_{50} = 0,023 \mu\text{g/ml}$) než po 72 hodinách ($IC_{50} = 0,015 \mu\text{g/ml}$). Způsobil vnitřní i vnější apoptózu a indukoval zástavu buněčného cyklu v G2/M fázi. Flavopereirin také způsobil downregulaci Janusovy kinasy – převodník signálu a aktivátor transkripce (JAKs – STATs) a buněčné myelocytomatózy (c-Myc). Aktivuje spíše p21-p53 než JAKs_STATs a c-Myc signalizaci k potlačení CRC. Dále zvýšil expresi a fosforylaci p53 v CRC buňkách. Flavopereirin podporuje vnitřní a vnější apoptózu v buňkách CRC, stimuluje zástavu buněčného cyklu G2/M fáze v CRC buňkách. Exprese a aktivita proteinu P53 je důležitá při omezení růstu maligních buněk (zástava buněčného cyklu a apoptóza).^[86,87] Flavopereirin selektivně potlačuje syntézu DNA – tvoří komplexy flavopereirin – DNA pouze u nádorových buněk.^[88]

3.2.6.5.2. Rakovina ovárií

Rakovina vaječníků způsobuje více úmrtí než jakákoli jiná rakovina postihující ženský reprodukční systém. Kvůli nedostatečnému screeningu často dojde k diagnostice až v pokročilém stádiu. Přestože terapie zlepšila pětileté přežití, celkovou míru vyléčení nezvýšila. U více než 70 % pacientek s rakovinou vaječníků dojde k relapsu a rozvoji rezistence vůči chemoterapeutikům na bázi taxanu a platiny. Proto je nutné hledat nové účinné látky pro pokročilou rakovinu vaječníků.

Chemoterapeutika mohou vzájemně působit aditivně nebo synergicky při likvidaci rakovinných buněk. Díky kombinaci je možno aplikovat nižší dávky jednotlivých chemoterapeutik, a tím dosáhnout vyšší bezpečnosti a nižší toxicity léčby.

Příkladem může být např. taxol (izolovaný z tichomořského tisu – *Taxus brevifolia* Nutt.) kombinovaný s platinou. U pacientek s rakovinou vaječníků bylo dosaženo mnohem lepších klinických výsledků.

Extrakt z kůry *G. vellosii* v kombinaci s platinou, dovolil snížit dávky platiny 1,2 až 10x (v závislosti na typu buněčných liniích). Výsledky jednoznačně potvrzují, že extrakt v kombinaci s karboplatinou prokázal vyšší inhibiční aktivitu.^[88]

3.2.6.5.3. Rakovina prostaty

Rakovina prostaty (PCa) je druhý nejčastější typ rakoviny u mužů. Je často diagnostikována u mužů nad 50 let.^[89] Dnes dokážeme detekovat i léčit PCa již v raném stádiu. V počátku roste v zóně, kde vznikla, postupně se stává maligní a metastazuje do dalších tkání. Je zajímavé, že nádory ve zvětšené prostatě vykazují příznivější patologické rysy (malý objem, nízká agresivita, mírné invazivní chování). Mechanický stres, např. BHP, brání růstu nádoru. Důležitým faktorem rozvoje jsou paradoxně androgeny, které jsou důležité i pro vývoj a funkci

prostaty. ^[83] Nejvíce úmrtí na PCa je způsobeno metastázemi, které jsou odolné vůči terapii androgenní ablací. Pro tyto pacienty neexistuje žádný způsob léčby a jejich relativní míra přežití pěti let je asi 30 %. ^[90]

Androgenní deprivativní terapie (ADT) byla základem léčby pokročilé a metastatické PCa. Tato léčba je jen dočasná (dočasně zvyšuje proapoptotickou aktivitu). Nakonec dojde k progresi rakoviny.

U pacientů, kteří dostávají 5ARI jako určitou chemoprevenci, je větší pravděpodobnost, že se u nich vyvine kastročtě rezistentní karcinom prostaty (CRPC) nebo neuroendokrinní rakovina prostaty (NEPC). Předpokládá se, že podporují apoptózu nádorů, ale také indukují globální zmenšení prostaty což snižuje inhibiční účinek na nádory. Apoptotický účinek 5ARI převažuje v prvních měsících léčby. Dlouhodobě záleží na konkurenci mezi snížením hydrostatického stresu díky smršťování prostaty a růstu nádoru. ^[83]

Mechanismy rezistence mají za následek epigenetické změny, zvýšení nebo utlumení transkripční aktivity. Epigenetické změny transkripční regulace zahrnují metylaci DNA, modifikace histonů a chromatinu. Studie naznačují, že metylace DNA, integrita chromatinu a dostupnost pro regulaci transkripce hrají důležitou roli v iniciaci a progresy rakoviny prostaty. ^[89]

Nádory, které nejsou závislé na androgenních signálních drahách, mohou po 5ARI vykazovat horší up-regulaci apoptózy a tím je pak horší kontrola růstu. ^[83]

Jediný terapeutický prostředek často nestačí k léčbě pokročilého karcinomu prostaty. Proto se pro léčbu používají kombinace léčiv, např. olaparib v kombinaci s karbazitaxelem, karboplatinou, prednisonem atd. Kombinace platiny a docelataxelu je běžná pro léčbu NEPC. Nejsme ale schopni dosáhnout dostatečné specifity pro nádorové buňky, a tak dochází i ke vzniku řady nežádoucích účinků. ^[89]

Podle nedávné studie prokázal extrakt *G. vellosii* značnou aktivitu proti růstu buněk rakoviny prostaty. Konkrétně na linii buněk LNCaP a PC3 závislých na androgenech. Extrakt potlačoval růst buněk CRPC – PC3 v závislosti na dávce a čase prostřednictvím indukce apoptózy a zastavení buněčného cyklu prostřednictvím zvýšení exprese p21 a p27 a snížení exprese proliferačních proteinů (in vitro i in vivo). Kromě toho extrakt indukoval upregulaci proapoptotického Bax, snížení antiapoptotických Bcl-2, Bcl-xL.

Dalším mechanismem, který extrakt vykazoval, byla inhibice signalizace AKT/NFκB, která hraje velice důležitou roli při regulaci genové exprese v imunitním systému, při zánětech a stresových reakcích a také reguluje přežití buněk. ^[90] AKT je serin-treoninkinasa, která je

schopna ovlivnit (inhibovat) dráhy apoptózy. Exprese a aktivita je regulována pomocí NFκB. ^[91]

Extrakt se tedy jeví jako vhodný kandidát pro terapeutické využití u pacientů s CRPC.

3.2.6.5.4. Rakovina Pankreatu

Rakovina pankreatu je jedním z nejsmrtelnějších typů rakoviny. Tento typ není příliš častý (asi 2 % diagnostikovaných rakovin), ale má vysokou mortalitu a morbiditu. Prognóza zůstává velice špatná. U více jak 90 % pacientů dochází k vývoji metastází.

Léčivem 1. linie je gemcitabin, který dává vyšší šanci na přežití ve srovnání s 5-fluorouracilem (o 12 měsíců). Nově se využívá režim FOLFIROX (5-fluorouracil, leukovorin, irinotekan a oxaliplatin), který zvyšuje přežití o 5 měsíců oproti gemcitabinu.

Přírodní látky mají nižší toxicitu, což je výhoda oproti syntetickým chemoterapeutikům. Extrakt prokázal potenciální vliv na léčbu rakoviny pankreatu *in vitro* i *in vivo*. Má potenciál samostatně, ale jeho uplatnění má budoucnost spíše v kombinaci s jinými chemoterapeutiky. Extrakt *G. vellosii* dokázal vyvolat apoptózu v závislosti na dávce u pěti testovaných linií rakoviny slinivky břišní.

Synergický účinek extraktu s gemcitabinem byl pozorován u několika buněčných linií rakoviny (PANC-1, AsPC-1, HPAF-II a BxPC-3). ^[92,93]

Mechanismus, kterým extrakt inhibuje cancer stem-like cell (CSC) je třeba dále prozkoumat. Prozatím studie ukázaly, že snižuje jadernou hladinu β-katechinu PANC-1. Dále došlo ke snížení hladiny mRNA několika genů souvisejících s CSC (Dppa4, EsRRb atd.). Samotný extrakt dokázal potlačit růst nádoru až o 70 %. V kombinaci byla tato inhibice ještě vyšší (až 82 %) a také bylo zaznamenáno výrazné snížení metastatických lézí v peritoneu. ^[92,93]

3.3. Alzheimerova choroba

3.3.1. Definice

Alzheimerova choroba (AD) je progresivní neurodegenerativní porucha CNS, která se klinicky projevuje syndromem demence. Pro tento typ demence je charakteristická rozsáhlá porucha kognitivních funkcí neurologickým poškozením, která se projevuje poruchou paměti, emoční poruchou a v pozdních fázích změnou osobnosti. [43,94]

3.3.2. Historie

Alzheimerova choroba má název po německém psychiatrovi Aloisovi Alzheimerovi, který tuto nemoc poprvé popsal. Pozoroval u své pacientky kognitivní deficit a postupnou ztrátu soběstačnosti. Během pitvy byla popsána atrofie kortexu a senilní plaky. Ve stejné době učinil obdobný nález i český psychiatr Oskar Fischer. [95] Jde o nejčastější druh demence u starších lidí. [44] Alzheimerovu chorobu nedokážeme vyléčit, můžeme pouze ovlivnit její průběh, se snahou oddálit těžké stádium nemoci. Dnes je intenzivní snaha o vývoj léků, které by dokázaly nemoc zastavit nebo dokonce zvrátit. [95]

3.3.3. Epidemiologie

V ČR se počet pacientů s demencí odhaduje asi na 164 tisíc, přičemž asi dvě třetiny tvoří ženy. Ve věku nad 65 let trpí demencí každý třináctý, nad 80 let každý pátý a nad 90 let každý druhý. Do roku 2050 se předpokládá nárůst na 383 tisíc pacientů. [96] Ve skutečnosti jich bude mnohem více, protože mnoho lidí není vůbec diagnostikováno. [97] V roce 2000 postihla AD po celém světě 25 milionů lidí. Očekává se, že v důsledku prodloužení života dojde do roku 2050 ke zvýšení na 114 milionů pacientů. [76,98]

3.3.4. Rizikové faktory

Rizikové faktory (RF) lze rozdělit na ovlivnitelné (diabetes mellitus, hypertenze, dyslipidémie, kouření, alkohol, obezita, úrazy hlavy, deprese atd.) a neovlivnitelné (pohlaví, věk, výskyt nemoci v rodině nebo výskyt polymorfismu ApoE4 v genu pro apolipoprotein E) [96]

Faktory můžeme rozdělit na genetické, kardiovaskulární, RF související s životním stylem (kouření, alkohol, nedostatek pohybu, nízká úroveň vzdělání, výživa), RF související s prostředím (kvalita ovzduší, UV záření, přítomnost radonu, hliníku, vliv pesticidů). [96] Polovinu pacientů s Downovým syndromem postihuje demence. Při nedostatku spánku se zvyšuje produkce β -amyloidu a tím se může zvyšovat i riziko vzniku AD. [96]

3.3.5. Klinický obraz a průběh nemoci

Mnoho struktur mozku a jejich funkce jsou ovlivněny dříve, než je AD diagnostikována. [99] Předpokládá se, že nemoc začíná 20-30 let před nástupem příznaků. Jsou očekávány nové léčebné postupy, které jsou samozřejmě nejúčinnější v počátečních fázích nemoci. Mezi nejdříve postižené funkce patří paměť epizodická, sémantická, slovní. Pacienti s AD často trpí depresí (asi v 50 % případů). Deprese je spojena s horší kvalitou života, větším postižením každodenních aktivit, rychlejší kognitivní deteriorací. [100]

Nemoc se může vyskytovat ve dvou formách – presenilní, tj. s časným začátkem, kdy se klinické příznaky objevují do 65 let věku. Tato forma, také označovaná jako familiární, je poměrně vzácná. Mnohem častější je výskyt příznaků až po 65. roce života, mluvíme tak o sporadické formě. Příznaky nastupují nenápadně a pozvolna, proto se často stává, že pacienti, ani jejich blízcí, nezaznamenají změny včas nebo jim nepřikládají zvýšenou pozornost a vše přikládají projevu stárnutí.

Mezi první pozorovatelné změny patří degenerace neuronálního systému. Stupeň degenerace odpovídá závažnosti zhoršení paměti. V hippocampu a kůře mozku spojené s pamětí začne docházet ke ztrátě presynaptických prvků cholinergního systému. Postsynaptické prvky zůstávají neporušené (kromě pozdního stádia, tehdy jsou všechny neurotransmitery na velice nízké úrovni a dochází ke ztrátě mozkové hmoty). [55,101] Dochází ke vzniku patologického β -amyloidu, který se postupně extracelulárně ukládá. Dále dochází k degeneraci τ proteinu, vznikají neurofibrilní klubka (intracelulárně). Současně probíhají další neurodegenerativní procesy. Vše vede ke snížení počtu synaptických spojů a k apoptóze neuronů. [76,97,101]

S postupujícím onemocněním začnou mít pacienti problémy se složitějšími každodenními aktivitami (např. obsluha počítače, řízení auta). Nakonec jsou problémové i banální činnosti jako oblékání, osobní hygiena apod. Často se vyskytuje deprese nebo poruchy cyklu bdění a spánku. V pozdních stádiích jsou nemocní naprosto nesoběstační. Dochází u nich k inkontinenci moči i stolice a mají problém s poznáváním blízkých osob. Alzheimerova choroba trvá od objevení do exitu cca 7-10 let, ale někdy přežívají pacienti i déle než 15 let, jindy zase umírají do 3 let po objevení nemoci.

Průběh nemoci dělíme na tři stádia. První stádium, též preklinické stádium, probíhá asymptomaticky. Již několik let před objevením prvních klinických příznaků je možné pomocí pozitronové emisní tomografie (PET), kdy se aplikuje radioaktivně značená látka, zaznamenat depozita β -amyloidu v mozku.

Druhé stádium doprovází mírná kognitivní porucha, kdy je postižena epizodická paměť. Nedochází však k postižení denních aktivit běžného života a pacienti jsou soběstační.

Třetím stádiem je demence. Ta se klinicky dělí na lehkou, střední a těžkou. Dochází k narušení aktivit všedního dne a mohou se projevovat psychologické a behaviorální poruchy. ^[96] Dohled je potřebný pro středně těžké a těžké demence. ^[102]

3.3.6. Cíl léčby

Cílem léčby by obecně měla být zlepšená kvalita života. Koncepce ABC:

- A – activities of daily living (aktivity denního života)
- B – behavioural changes (změny chování)
- C – cognition (kognitivní funkce)

Mezi poruchy kognitivních funkcí řadíme poruchy orientace, úsudku, poruchy vizuospeciálních funkcí, poruchy paměti a učení, poruchy korových symbolických funkcí (agnozie, apraxie, afázie), exekutivních (výkonných) funkcí (organizování, plánování, následnosti, abstrakce).

Nekognitivní behaviorální poruchy lze definovat jako chování, které může znepokojovat pacienta nebo způsobovat potíže nejen pacientovi, ale také pečovateli a dalším osobám v jeho okolí.

Symptomy: agresivita, toulání, apatie, agitace, poruchy myšlení (bludy), poruchy stravování (změny v chuti, anorexie, bulimie), vokalizace (sténání, křik), sexuální desinhibice, afektivní poruchy (deprese, mánie, anxieta), poruchy vnímání (halucinace, iluze). ^[103]

3.3.7. Diagnostika

Při použití zobrazovacích metod jako CT a MRI je patrná atrofie mediálních temporálních struktur (hippokampus a amygdala). ^[97] Díky těmto metodám jsme schopni odhalit nemoc dříve, než dojde k projevu prvních příznaků.

V mozkomíšním moku můžeme ve vztahu k AD prokazovat 3 hlavní biomarkery – likvorový triplet: fosforylovaný τ protein, β -amyloid, celkový τ protein. ^[104]

Kognitivní porucha musí být pro klinickou diagnózu dostatečně závažná, aby byla kompromitována činnost každodenního života. ^[102]

Nejpoužívanější je krátký test kognitivních funkcí (MMSE), který však není pokaždé spolehlivý a někdy vykazuje falešně negativní výsledky. Specifickým testem pro AD je kreslení hodin. Složitější testy kognitivních funkcí poskytují i vyšší spolehlivost,

např. Alzheimer disease assesing test (ADAS).^[97] Pečlivé neuropatologické vyšetření může odhalit i velmi mírné kognitivní poruchy pět let před klinickými projevy.^[102]

3.3.8. Etiopatogeneze

Příčinou vzniku AD se vědci zabývají již od poloviny 20. století. Stále není zcela jasné, co vše onemocnění předchází a jak přesně probíhá. Na vzniku AD se podílí mnoho faktorů. Dva hlavní patologické procesy jsou vznik β -amyloidu a ukládání τ proteinu.^[95]

3.3.8.1. *Teorie β -amyloidu*

Amyloidový prekurzorový protein (APP) je přirozeně se vyskytující peptid, který je uložen transmembránově.² Za běžných fyziologických podmínek je štěpen α -sekretasami na solubilní krátké fragmenty – β peptid, který je fyziologicky důležitý pro tvorbu nových neuronálních synapsí.

U AD dochází ke štěpení APP β a následně γ sekretasou (jejich hladiny jsou u AD zvýšené) na delší β peptid – β -amyloid ($A\beta$) 40 a 42 ($A\beta$ 40 je izoforma, která převládá, $A\beta$ 42 agreguje rychleji a je často spojena s familiární AD), který oligomerizuje, stává se nerozpustný a postupně difunduje do synaptické štěrbině. Dochází ke změně konformace $A\beta$ na β -skládaný list. Tato konformace je podmíněna oxidačním stresem a radikálovým poškozením řídicích molekul.^[105]

V extracelulárním prostoru dochází ke shlukování β peptidu v amyloidní fibrily, které dále agregují a tvoří senilní plaky. Toxicita plaků vede k neurodegenerativním dějům.

V oblasti plaků tak dojde ke vzniku lokálního sterilního zánětu, to způsobí aktivaci mikroglií. Jejich aktivace vede k uvolňování interleukinu 1 (IL-1), čímž dochází k aktivaci cyklooxygenasy, a tím k syntéze prostaglandinů. Dojde k uvolnění excitovaných AMK (glutamát, aspartát), které se navážou na N-methyl-D-aspartátové (NMDA) receptory. Jejich aktivací dojde k influxu Ca^{2+} do neuronu. Vše vede k aktivaci proapoptotických enzymů a tím k apoptóze neuronů.

Plaky $A\beta$ se ze začátku vyvíjejí v bazální, temporální a orbitofrontální neokortexové oblasti mozku. V pozdějších stádiích je nacházíme v hipokampu, amygdale, diencephalonu a v bazálních gangliích.^[76,95,97,102,104,106,107]

² Gen pro tento peptid je uložený na 21. chromozomu. Mutace APP představují 10-15 % familiární AD s časným nástupem. U pacientů s Downovým syndromem (trizomie 21 chromozomu) se vyvinou amyloidní depozita, která způsobují neuropatii.^[95]

3.3.8.2. *Teorie neurofibrilárních klubek*

Fyziologicky se τ protein podílí na spojování mikrotubulů v axonech neuronů. Podporuje polymeraci a podílí se na uspořádání a stabilitě mikrotubulů. Též podporuje růst neuritů. Tau proteiny mají důležitou funkci v axonálním transportu. ^[95,104] τ -protein je kódován genem MAPT, který se nachází na 17. chromozomu. τ -protein má více než 30 fosforylovaných míst, ale může být fosforylován asi na 80 místech, nejčastěji na AMK serinu nebo threoninu. ^[100]

Za patologických podmínek je τ protein nadměrně fosforylován prostřednictvím glykogensyntasy-kinasy 3β (3β -GSK) a cyklin dependentní kinasy 5 (CDK-5). Hyperfosforylovaný τ protein agreguje a vznikají párové heliakální filamenta, ze kterých vznikají neurofibrilární klubka NFT (neurofibrillary tangles), které jsou nerozpustné. NFT způsobí narušení cytoskeletu, který následně podléhá rozpadu. Také se naruší axonální transport, což vede k zániku neuronů a rozvoji AD. ^[95,104]

Vazba fosforylovaného τ -proteinu na mikrotubuly způsobuje jejich nestabilitu a je typická pro AD.

Koncentrace τ -proteinu v mozkomíšním moku je asi 3x zvýšena. ^[100]

3.3.8.3. *Cholinergní teorie*

Acetylcholin (ACh) působící jako neurotransmitter, který inhibuje indukci lipopolysacharidů, produkci protizánětlivých cytokinů včetně IL-1, TNF- α . ^[9] Je degradován enzymem acetylcholinesterasou (AChE) na acetát a cholin. ^[55] Mechanismus degradace acetylcholinu: ACh reaguje se serinovým zbytkem na aktivním místě AChE za vzniku kovalentního meziprojektu acetyl-enzymu a dochází k uvolnění cholinu. Acetyl-enzym reaguje s vodou za vzniku acetátu a regenerace enzymu. ^[55]

AChE podporuje vznik amyloidních agregátů urychlením sestavení amyloid β do Ap fibril. ^[9] AChE je přítomna v celém těle a má i jiné funkce než degradaci acetylcholinu. Nachází se v synaptické štěrbině cholinergních neuronů, kde je vázána v síti kolagenu a glukosaminoglykanů. Existuje jí ještě velice blízký enzym – butyrylcholiesterasa (BChE). ^[55] BChE zpomaluje proces tvorby Ap fibril stabilizací rozpustných Ap agregátů. ^[76]

Celý proces rozštěpení acetylcholinu je velice rychlý (asi 40 mikrosekund). Synapse dokáže přenést až 1000 impulsů za vteřinu (za předpokladu, že membrána obnoví svoji polarizaci – klidový potenciál). ^[55] Přirozeně se v mozku vyskytuje ve větším množství AChE. Během AD stoupá množství BChE, a to hlavně v oblasti kumulace A β .

Tvoří se vysoce toxický produkt AChE-amyloid β s vysokou neurotoxicitou. To je důvod, proč se léčbou snažíme obnovit cholinergní přenos zvýšením hladiny Ach. ^[9] Současně používané léky nedokážou obnovit synaptický přenos. Dokážou ale snížit již vzniklé poškození mozku. ^[76]

3.3.8.4. *Glutaminergní teorie*

Nadměrné uvolňování excitačních AMK, které se vážou na NMDA receptory (glutamát a aspartát), způsobí otevření Ca^{2+} kanálů a influx Ca^{2+} iontů do neuronů, tím dojde k narušení synaptické funkce a k aktivaci proteinkinas a fosfatas. Tímto mechanismem dojde k apoptóze neuronů. Klinicky se tento stav projeví narušením paměti a učení – typické pro AD. ^[97] Viz teorie A β .

3.3.8.5. *Oxidační stres*

Vlivem oxidačního stresu dochází ke vzniku většího množství volných radikálů. Nejčastěji vznikají kyslíkové radikály (reaktivní formy kyslíku – ROS). V menším zastoupení vznikají reaktivní sloučeniny dusíku (NOS). Tyto radikály mají schopnost napadat všechny typy makromolekul (sacharidy, proteiny, lipidy, DNA). To v důsledku vede k poškození funkce buněk i tkání. Oxidační stres, tzn. nadprodukce volných radikálů, provází mnoho nemocí. Mezi tyto nemoci patří i neurodegenerativní onemocnění jako je AD.

Amyloidní plaky vznikají v důsledku změny konformace amyloidního proteinu na β skládaný list. Tato změna konformace může být silně potencována oxidačním stresem a radikálovým poškozením řídicích molekul. Mozková tkáň je oproti ostatním tkáním v těle více náchylná k oxidačnímu poškození (dochází k narušení ATP, glukózy atd.). ^[105]

3.3.8.6. *Apolipoprotein E*

Na 19. chromozomu se nachází gen pro apolipoprotein E (ApoE). Má tři alely ϵ 2,3,4, které kódují izoformy proteinu Apo-E 2, 3, 4. ApoE ϵ 4 podporuje ukládání β -amyloidu, neurotoxicitu a oxidační stres. I lidé bez genu ApoE ϵ 4 mohou onemocnět AD. Naproti tomu u nositelů genu onemocnění nemusí propuknout. Když je přítomná jedna alela, je pravděpodobnost vzniku AD 3x vyšší.

Lidé s familiární AD, mají vyšší výskyt Apo-E ϵ 4. Pravděpodobnost vzniku AD se při výskytu dvou alel zvyšuje až 15x. ^[96]

3.3.8.7. *Diabetes mellitus II a inzulínová rezistence*

Inzulínová rezistence (IR) je jedním z hlavních patogenetických faktorů manifestace diabetu mellitu 2 (DM 2). Je spojena i s výskytem dalších neuropsychiatrických onemocnění. Riziko AD je přítomností DM2 (ale i samostatnou IR) zvyšováno.

DM je charakterizován dysfunkcí β buněk pankreatických ostrůvků sekretovat dostatečné množství inzulínu tak, aby jeho hladina byla normální nebo dokonce zvýšená (hyperinzulémie).

Inzulín prostupuje do CNS přes HEB a váže se na inzulínové receptory. Inzulín se může v mozku tvořit lokálně. Inzulínové receptory jsou v mozku nejvíce zastoupené v hippocampu, hypotalamu, amygdale a mozkové kůře. V neuronech inzulín zvyšuje degradaci A β .

Signalizace inzulínu cestou inzulínového receptoru působí inaktivaci glykogensyntasy-kinasy 3 β (GSK-3 β) fosforylací, zatímco inzulínová rezistence podporuje defosforylací, a tak aktivaci GSK-3 β . To vede k fosforylaci τ proteinu a tvorbě patologických tangles. ^[108]

3.3.9. Farmakoterapie

Farmakoterapii lze dělit na farmakologickou a nefarmakologickou. Farmakologickou pak dále dělíme na kognitivní, která ovlivňuje postižené kognitivní funkce (spíše kauzální léčba) a nekognitivní, která ovlivňuje především postižené behaviorální a psychologické příznaky demence (použití antipsychotik a antidepresiv). ^[97]

3.3.9.1. *Kognitivní farmakoterapie*

Již v počátcích nemoci je narušen centrální acetylcholinergní systém. Tento systém je důležitý mimo jiné pro mechanismy krátkodobé paměti a paměťové konsolidace (vštipivosti paměti).

Současně je snížen i počet nikotinových acetylcholinergních receptorů, zatímco počet muskarinových acetylcholinergních receptorů zůstává relativně nezměněn. Acetylcholin je v synaptické štěrbině odbouráván enzymy acetylcholin esterasy. ^[109]

3.3.9.1.1. Inhibitory AChE

Při léčbě AD jsou tato léčiva používána jako první volba.

Centrální inhibitory cholinesteras musejí dobře procházet HEB, ovlivňovat specificky mozkové formy cholinesteras a být dobře tolerovány. Podstata terapeutického působení je zablokování enzymů odbourávajících acetylcholin. Mají efekt na zpomalení průběhu AD. ^[109]

Inhibitory mohou být reverzibilní, kdy jsou inhibitor a jeho aktivní metabolity odbourávány v játrech a jejich působení trvá po dobu jejich přítomnosti v plazmě.

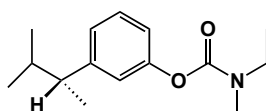
Pseudoireverzibilní inhibitory jsou odbourávány přímo cholinesterasami a jejich působení trvá déle, než je jejich přítomnost nebo přítomnost jejich aktivních metabolitů. [109]

Tato léčiva působí centrálně, v mozku mohou zvyšovat hladinu acetylcholinu a tím zmírnit příznaky. Problém tvoří periferní nežádoucí účinky (Tab. 4). [8]

Léčivo	Nežádoucí účinky
donepezil	bolest hlavy a bolest celkově, únava, závratě, nevolnost, zvracení, průjem, anorexie, hubnutí, svalové křeče, nespavost
rivastigmin	hubnutí, anorexie, závratě
galanthamin	nevolnost, zvracení, průjem, anorexie, ztráta hmotnosti, cévní onemocnění (srdeční infarkt, mrtvice)

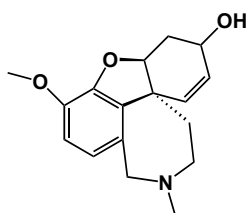
Tabulka 4: nežádoucí účinky inhibitorů acetylcholin esterasy [98]

Rivastigmin (Obr. 13) má nejméně nežádoucích účinků, které mohou být ještě redukovány použitím transdermální náplasti. Inhibuje AChE i BChE. [97]



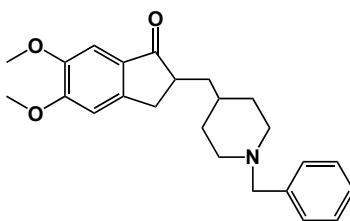
Obrázek 13: rivastigmin [110]

Galanthamin (Obr.14) je reverzibilní inhibitor AChE a také alostericky moduluje nikotinové receptory. Nelze ho použít u pacientů s jaterní a ledvinovou insuficiencí. [97,111]



Obrázek 14: galanthamin [110]

Donepezil (Obr. 15) inhibuje AChE a také zabraňuje ukládání A β plaků v CNS. Prokázal též neuroprotektivní a antioxidační účinky. Léčivo má dlouhý biologický poločas a je poměrně dobře tolerováno. [109,112]



Obrázek 15: donepezil [110]

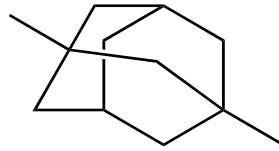
AChEi jsou kontraindikovány u aktivní vředové choroby gastroduodenální a u poruch převodního srdečního systému. [97] AChE inhibitory mohou zmírnit symptomy, ale nedokážou zastavit progresi onemocnění – působí pouze symptomaticky. [98] Míra zlepšení je úměrná úrovni inhibice enzymu AChE i BChE. [55]

3.3.9.1.2. Inhibitory NMDA receptorů

S postupnou progresí dochází k poškození mozku excitacích aminokyselin. Tento systém je nejrozšířenější neuromediátorový systém mozku. [109]

Dochází ke zvýšenému uvolňování excitacích aminokyselin (glutamat, aspartát). Tato aktivita je také navýšena tím, že např. v hippocampu dochází ke snížení zpětného vychytávání glutamátu. Nadměrná aktivace NMDA receptorů vede k otevření iontových kanálů pro Ca²⁺ a Na⁺ ionty. To způsobuje nadměrný vstup Ca²⁺ do neuronů, aktivaci enzymů měnících strukturu proteinů (proteinkinas) a zvýšenou expresi některých genů. To vede k destabilizaci vnitřního prostředí a zvýšené apoptóze neuronů. Jediným zástupcem je memantin. [97,109]

Memantin (Obr. 16) je nekompetitivní antagonist NMDA receptorů, používající se u pacientů ve středně těžkých a těžkých stádiích AD. Jeho biologický poločas je až 100 hodin a jeho dávku je nutné postupně titrovat. Nežádoucí účinky nejsou časté. Jedná se hlavně o závratě, bolesti hlavy a halucinace. Memantin pomáhá udržet kognitivní funkce a také přispívá ke zpomalení postupu AD. [107,109,112]



Obrázek 16: memantin ^[110]

3.3.9.1.3. Podpůrná léčba

Jako doplňkovou léčbu lze použít některé látky, které zlepšují mozkový metabolismus:

- Vasodilatancia jako je pentoxifylin a naftidrofuryl.
- Nootropika – látky zlepšující mozkový metabolismus, prokázali přínos u AD. Nootropika dokážou zlepšit utilizaci glukózy i kyslíku v mozku. Zlepšují paměť a učení. Nejvyužívanější jsou piracetam, pyritinol, nicergolin a extrakt z *Ginkgo biloba*.
- Látky snižující tvorbu volných radikálů: vitamín E, vitamín A, přípravky se selenem.
- Inhibitory MAO-B (selegilin) – snižují tvorbu volných radikálů, zamezují biodegradaci dopaminu, jsou poměrně často používané k léčbě demencí. ^[109]

3.3.9.1.4. Nové přístupy k léčbě AD

Novinkou v klinické praxi jsou nové aplikační formy dostupných kognitiv (náplast, roztok), které zmírňují některé nežádoucí účinky a umožňují jednodušší podání.

3.3.9.1.4.1. Látky snižující tvorbu β -amyloidu

β a γ sekretasa jsou zodpovědné za vznik toxického β -amyloidu. Inhibitory β a γ sekretas musejí být dobře prostupné přes HEB, což stěžuje jejich vývoj.

Problémem inhibitorů γ sekretas je, že štěpí i jiné důležité molekuly než $A\beta$. Příkladem je Notch protein, který reguluje buněčnou proliferaci, diferenciaci a růst buněk. Látky také vykazovaly hematotoxicitu, GIT potíže a alergické kožní reakce.

Druhá generace inhibitorů γ sekretas – Notch šetřící, prokázala větší bezpečnost. Výsledky klinických studií ale nevypadají příliš nadějně.

Jako inhibitory β sekretas první generace byly použity perorální antidiabetika (PAD), např. pioglitazon nebo rosiglitazon. Stimulují jaderný receptor PPAR γ , který se podílí na protizánětlivých účincích, snižují toxicitu $A\beta$ a zvyšují tvorbu antiapoptotického faktoru Bcl-2. V klinickém hodnocení jsou 3 molekuly – verubecestat, AZD3293, E2609.

Stimulací α -sekretasy se sníží produkce $A\beta$ a zvýší se množství solubilního β amyloidu. Testované jsou např. bryostatin-1, exebryl-1, ale nejeví se příliš perspektivně. ^[111]

3.3.9.1.4.2. Látky zvyšující clearance β -amyloidu

3.3.9.1.4.2.1. *Imunoterapie*

Aktivní imunizace proti $A\beta$ je stále zkoušena u pacientů s prodromálními symptomy AD.

Pasivní imunizace dosahuje největších úspěchů. V klinických testech jsou čtyři monoklonální protilátky: solanezumab, crenezumab, gantenerumab, adacanumab. Tento typ imunizace je výhodný z důvodu výskytu menšího množství nežádoucích účinků. Nevýhodou je nutnost opakovaného podávání protilátek v infuzích. Pasivní imunoterapie využívá principu zachování umělých hladin protilátek proti $A\beta$ pomocí imunoglobulinu G (IgG). U nich je předpokládána vyšší efektivita u časných stádií AD mechanismem zabraňujícím akumulaci β amyloidu. ^[111]

3.3.9.1.4.2.2. *Plazmaferéza*

Další možností jak dosáhnout snížení $A\beta$ je pomocí plazmaferézy. Mechanismus spočívá v jednoduchém zjištění. Snížení hladin $A\beta$ v periferní krvi vede ke snížení hladiny v likvoru. Tato metoda je však náročná na provedení, proto k jejímu masivnímu využití pravděpodobně nedojde. ^[113] Slibně se jeví také vakcinace lidským β amyloidem. ^[109]

3.3.9.1.4.3. Terapie zaměřena na τ protein

3.3.9.1.4.3.1. *Inhibitory GSK-3*

V psychiatrii jsou využívány lithium a valproát jako stabilizátory nálady. Tyto látky snižují fosforylaci τ proteinu a působí neuroprotektivně. Výsledky klinických studií spojených s AD však nebyly uspokojivé. Další možností byla nová látka tideglusid, která neprokázala účinek a testování bylo ve druhé fázi přerušeno. Nadějný je LMTM, který je ve 3. fázi klinických testů. Jedná se o derivát methylenové modři, který působí jako inhibitor hyperfosforylace τ proteinu. ^[111]

3.3.9.1.4.3.2. *Serotonergní látky*

Za kognitivní procesy a paměť jsou zodpovědné 5-HT_6 receptory. Jejich blokáda zvyšuje uvolňování acetylcholinu do synaptické štěrbině. Nadějnou látkou je antagonist 5-HT_6 idalopirdin, který je testován v kombinaci s donepezilem. V současné době je ve 3. fázi klinického hodnocení. Není ale jasné, zda za úspěchem nestojí právě přítomnost donepezilu. ^[111]

3.3.9.1.4.3.3. Antagonisté receptorů pro konečné produkty pokročilé glykace (rAGEs – advanced glycation end products)

Tyto látky hrají roli v patogenezi chronických onemocnění, včetně neurodegenerativních jako je AD. Například azeliragon antagonist rAGEs, který byl původně vyvíjen k léčbě diabetické neuropatie. Zabraňuje vzniku zánětu v neuronech. Látka se dostala do třetí fáze klinického hodnocení. [111]

3.3.9.1.4.4. Přírodní zdroje léčiv

Takrin byl první používaný inhibitor cholinesteras. Jeho použití v praxi bylo velmi komplikováno toxicitou (hepatotoxicita, GIT dyskomfort). Stále je snaha o vývoj nových derivátů takrinu a 7-methoxytakrinu. [111]

Další rostlina s výraznou aktivitou je *Huperzia serrata*. Huperzin A, který působí jako silný reverzibilní inhibitor AChE a také jako antagonist NMDA receptorů, je využíván v Asii, kde je schváleným přípravkem. [98]

Významné jsou také extrakty z *Ginkgo biloba*, které zvyšují aktivitu α sekretasy. Extrakt čaje a resveratrol inhibuje aktivitu β sekretasy. Kurkuminoidy (kurkumin) – inhibují agregaci Ap na oligomery. Omega 3 MK (EPA, DHA) zvyšují aktivitu α sekretasy. [98]

V posledních letech se v populaci rozšířila prevence AD orálním podáváním doplňků stravy – přírodních antioxidantů, získaných z léčivých bylin i z mořských živočichů. [44]

3.3.9.2. Nekognitivní farmakoterapie

U behaviorálních a psychických příznaků demence (BPSD) volíme atypická antipsychotika – olanzapin, risperidon (klasická jako je haloperidol nebo chlorpromazin nejsou vhodná pro svoji neselektivitu).

U anxiety a poruch spánku se užívají atypická neuroleptika – risperidon, quetiapin (snaha vyhnout se BZD). [103]

Pro léčbu deprese se používají antidepressiva 3. generace – SSRI (citalopram, sertralin, fluoxetin, paroxetin) a 4. generace (mirtazapin, reboxetin). Antidepressiva 1. a 2. generace nejsou vhodná kvůli anticholinergním vlastnostem a ovlivňování i jiných mediátorů. [97]

3.3.10. Nefarmakologická léčba

Léčbu AD nelze založit jen na farmakoterapii, je nutný také psychoterapeutický a socioterapeutický přístup. Je nezbytné procvičovat ty funkce, které zůstaly ještě zachované. ^[97] V rámci těchto přístupů se můžeme setkat s:

- muzikoterapií, arteterapií, léčbou tancem nebo léčbou pomocí zvířat nebo čtením
- nezbytná je podpora existujících sociálních vazeb pacientů (kontakt s rodinou a přáteli) ^[97]

Reedukace základních aktivit může probíhat pomocí PC programů. ^[103]

4. Praktická část

4.1. Laboratorní potřeby

4.1.1. Rozpouštědla

- Chloroform p.a. (CHCl_3), (Penta, Praha)
- Ethanol 95 % (EtOH), (Lihovar Chrudim)
- Ethylacetát p.a. (EtOAc), (Penta, Praha)
- Toluén p.a. (To), (Penta, Praha)
- Diethylamin p.a. (Et_2NH), (Penta, Praha)
- Amoniak p.a. (NH_3), (Penta, Praha)
- Aceton p.a. (Ac), (Penta, Praha)
- Cyklohexan p.a. (cHx), (Penta, Praha)
- Heptan p.a. (Hept), (Penta, Praha)
- Isopropylalkohol p.a. (IPA), (Penta, Praha)
- Methanol p.a. (MeOH), (Penta, Praha)
- Diethylether p.a. (Et_2O), (Penta, Praha)

4.1.2. Chemikálie

- Síran sodný bezvodý (Na_2SO_4), (Penta, Praha)
- Uhličitan sodný (Na_2CO_3), (Penta, Praha)
- Jodid draselný (KI), (Lach-Ner, Neratovice)
- Kyselina chlorovodíková 35 % (HCl), (Penta, Praha)
- Dusičnan bismutitý zásaditý [$\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$], (Lachema, Brno)
- Kyselina L-vinná p.a. ($\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_6$), (Penta, Praha)
- Chlorid rtuťnatý (HgCl_2), (Fisher Scientific, Pardubice)
- Kyselina hexajodoplaticitá ($\text{H}_2\text{PtCl}_6 \cdot x \text{H}_2\text{O}$), (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe)

4.1.3. Pomocný materiál

- Křemelina C 535 Cedlite, (Sigma-Aldrich, Praha)
- Vata čištěná

4.1.4. Detekční činidla

Dragendorffovo činidlo dle Muniera ^[114]

Zásobní roztok

Zásobní roztok Dragendorffova činidla vznikne smísením připraveného roztoku A a B v objemovém poměru 1:1.

Roztok A	Roztok B
1,7 g zásaditého dusičnanu bismutitého	16 g jodidu draselného
20 g kyseliny L-vinné	40 g destilované vody
80 g destilované vody	

Detekční roztok

Tento roztok se připraví smísením 5 ml zásobního roztoku s 10 g kyseliny L-vinné rozpuštěné v 50 g destilované vody.

Zásobní i detekční roztok se uchovává při teplotě přibližně 4 °C a je stálý několik měsíců.

Jodoplatičité činidlo ^[115]

Detekční roztok jodoplatičitého činidla vznikne smísením 5 ml 5% hexachloroplatičité kyseliny a 45 ml 10% vodného roztoku jodidu draselného a doplní se vodou do 100 ml.

Činidlo se připravuje vždy čerstvé, případně se po krátkou dobu uchovává při teplotě 4 °C.

Mayerovo činidlo ^[116]

5 g jodidu draselného
30 g destilované vody
1,35 g chloridu rtuťnatého

Jodid draselný se rozpustí ve vodě a následně se přidá chlorid rtuťnatý. Nejprve dojde ke vzniku sraženiny jodidu rtuťnatého. Ta se postupně rozpouští za vzniku komplexní sloučeniny tetrajodortuťnatanu draselného $K_2[HgI_4]$. Vodou se doplní na objem 100 ml. Tento roztok je čirý až slabě nažloutlý.

Činidlo se uchovává při teplotě 4 °C a je stálé několik měsíců.

4.1.5. Vyvíjecí soustavy pro preparativní tenkovrstvou chromatografii

- S₁: cHx:Et₂NH (9:1)
- S₂: Hept:Ac:CHCl₃:IPA: Et₂NH (70:10:10:5:5)
- S₃: To:MeOH:EtOAc (9:1:1)
- S₄: cHx:EtOAc:Ac: Et₂NH (50:10:10:7)

- S₅: To:MeOH (NH₃) (8:2 (0,1%))
- S₆: cHx:EtOAc: Et₂NH (50:50:5)
- S₇: Hept:IPA: Et₂NH (42,5:2,5:2,5)

4.1.6. Chromatografické sorbenty

- Silikagel (Silica gel 60 GF₂₅₄, Merck, Praha) použitý pro přípravu litých TLC desek
- Komerční chromatografické desky potáhnuté Silikagelem 60 GF₂₅₄ o velikosti 20 x 20 cm a tloušťce 0,2 mm (Merck, Praha)

4.1.7. Přístrojové vybavení

- Vakuová rotační odparka Heidolph HEI-VAP Advantage (Heidolph Instruments GmbH & Co)
- Magnetická míchačka s ohřevem Heidolph MR 3001 K (Heidolph Instruments GmbH & Co)
- Analytická váha KERN ABJ (max 220 g, e = mg, min = 10 mg, d = 0,1 mg) (KERN & SOHN GmbH)
- Laboratorní předvážky VWR Science Education (VWR International s.r.o.)
- Ultrazvuková lázeň Sonorex Super 10P, (Bandelin, Německo)
- GC-MS systém s GC zařízením typu 5975 inert MSD a MS detektorem typu Agilent Technologies 7890 (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, Kalifornie, USA)
- UV lampa
- Polarimetr P 3000 (A. Krüss Optronic, Hamburg, Německo)
- Bruker Avance DRX 500 Spectrometer (Bruker Corporation, USA)

4.1.8. Rostlinný materiál

Sušená kůra *Geissospermum vellosii* od Amazon Herbs Surinam. Tato rostlina odhalila velice zajímavou inhibiční aktivitu vůči cholinesterasám (IC₅₀ = 15,19±0,96 µg/ml pro AChE a IC₅₀ = 0,37±0,049 µg/ml pro BChE).

Pro přípravu sumárního extraktu bylo použito 43 kg sušeného rostlinného materiálu. Z tohoto množství materiálu vzniklo 5 kg sumárního extraktu. Ten byl dále zpracováván. Hmotnost získaných terciárních bází získaných ze sumárního extraktu byla 1530 g. Po vytřepání a vyčištění vzniklo 50,4 g etherového alkaloidního výtřepku.

Alkaloidní výtřepok byl podroben sloupcové chromatografii. Bylo získáno 272 podfrakcí, které byly pospojovány do výsledných 16 frakcí.

V této práci byla zpracovávána frakce GV-4 o hmotnosti 4,4 g.

4.2. Obecné postupy

4.2.1. Příprava a čištění rozpouštědel

Rozpouštědla používaná pro extrakci a následnou eluci (ethanol, methanol, chloroform, ethylacetát, benzin) alkaloidů byly regenerované pomocí destilace a uskladněny ve tmavých skleněných lahvích, pro lepší ochranu před rozkladem světlem a zářením.

4.2.2. Odpařování

Rozpouštědla použitá na eluci alkaloidů ze silikagelu se následně odpařovala pomocí rotační vakuové odparky. Tento způsob odpařování probíhá za sníženého tlaku, díky čemuž stačí nižší teplota vodní lázně, běžně kolem 40 °C.

Pro odpařování rozpouštědel z vialek, tedy menšího množství rozpouštědel, byla použita vodní lázeň o teplotě 50 °C. Pro rychlejší odpaření byl do vialek přiváděn proud vzduchu.

4.2.3. Příprava litých desek

Pro přípravu skleněných litých TLC desek o rozměru 15 x 15 cm je třeba 6,5 g silikagelu (Silica gel 60 GF₂₅₄) a 20,5 ml destilované vody. Tato koloidní směs se rovnoměrně nanáší na skleněnou desku, která je odmaštěna chloroformem. Voda se nechá z desek pozvolna odpařovat po dobu nejméně 24 hodin.

Na takto připravených deskách lze rozdělit 40-50 mg směsi látek.

4.2.4. Chromatografie

Chromatografie je separační metoda využívaná k dělení a čištění látek. V této diplomové práci je využívána tenkovrstvá chromatografie na normálních fázích, tedy polární stacionární fáze a nepolární mobilní fáze.

Na desky se nanáší alkaloidní extrakt rozpuštěný v co nejmenším množství rozpouštědla. V tenké lince se nanášejí na startovní linii pomocí chromatografického pera ve výšce 1-2 cm od okraje desky postupně v několika vrstvách. Z naneseného vzorku se nechá důkladně odpařit rozpouštědlo. Startovní linie musí být nad hladinou mobilní fáze.

Desky se vyvíjejí ve skleněných chromatografických komorách. Komory se před vyvíjením sytí parami mobilní fáze alespoň 20 minut. Mobilní fáze se do komory nalije tolik, aby byl ponořený okraj desky, ale nebyla ponořena startovací linie.

Vyvíjení v komorách probíhá do té doby, než mobilní fáze dosáhne stanoveného čela desky. Rychlost vyvíjení záleží na několika faktorech jako např. složení mobilní fáze a vliv okolních faktorů (těsnost komory, okolní teplota...).

Vyvinuté desky se suší v digestoři proudem teplého vzduchu.

V rámci diplomové práce byly použity dva druhy tenkovrstvé chromatografie:

- **Preparativní**

Preparativní TLC desky se používají pro dělení většího množství alkaloidů. Použité desky měly rozměr 15 x 15 cm. Deska tohoto rozměru unese 40–50 mg dělené směsi.

- **Analytická**

Pro analytickou tenkovrstvou chromatografii se používá komerčních chromatografických desek o velikosti 10 x 20 cm a tloušťce vrstvy 0,2 mm. Byly použité na kontrolní TLC a také při hledání vhodných mobilních fází.

4.2.5. Detekce alkaloidů

Vyvinuté desky lze po vysušení detekovat pod UV lampou při 254 nm. Na suchých deskách, které fluoreskují zeleně, jsou skvrny – alkaloidy, které zhasí UV záření.

Důkaz, zda jde o alkaloidy, se provede Dragendorffovým činidlem, kdy dojde ke vzniku oranžového až červeného zabarvení při přítomnosti alkaloidů. Tento barevný komplex $[R_3NH][BiI_4]$ vzniká v důsledku reakce vzniklého tetrajodobismutitanu draselného s terciárním dusíkem obsaženým v alkaloidech. ^[117] Po postřiku Dragendorffovým činidlem se deska nechá oschnout bez použití tepla, které způsobuje blednutí skvrn.

Další možností je použití jodoplaticitého činidla (světle modré až modrohnědé skvrny). Nevýhodou je nutnost přípravy vždy čerstvého činidla.

Při vytřepávání alkaloidů z alkalické vodné fáze do organické fáze se vodná fáze kontroluje, zda v ní opravdu nezbyly žádné alkaloidy. To se provede pomocí Mayerova činidla. Vodná fáze se musí okyselit pomocí HCl, aby její pH bylo cca 3–4. Pak se přikápnou několik kapek Mayerova činidla a pokud nevznikne bílá sraženina, jsou veškeré alkaloidy vytřepány a tato fáze je již bezcenná. Pokud vznikne bílá sraženina, je třeba vytřepávání do organické fáze opakovat.

4.2.6. Eluce

Na eluci alkaloidů ze silikagelu byla použita směs CHCl_3 : EtOH 1:1. Později byla tato směs nahrazena EtOAc nebo MeOH, protože chloroform zřejmě způsoboval rozklad alkaloidů (uvolňováním HCl vzniklé rozkladem chloroformu).

Silikagel byl promíchán s malým množstvím křemeliny a nanesen do eluční kolony. Větší množství bylo eluováno ve skleněných sloupcích za pomoci vakua pro urychlení průtoku elučního činidla a tím urychlení celé eluce.

4.2.7. Skladování vzorků:

Vzorky byly skladovány v chladničce při teplotě 4 °C. Izolované čisté látky byly před uskladněním vysušeny v exsikátoru pod vakuem.

4.3. Strukturní analýza

4.3.1. GC-MS analýza

K analýze hmotnostních spekter byl použit plynový chromatograf Agilent 7890A GC 5975 s hmotnostním detektorem při elektronové ionizaci 70 eV a teplotním programem 100-180 °C (7 minut), 180 °C (1 minuta) a 180-300 °C (24 minut).

Byla použita kolona Hp-5 MS (30 m × 0,25 mm × 0,25 μm, Agilent Technologies, USA). Jako mobilní fáze – nosný plyn, bylo použito helium o průtokové rychlosti 1 ml/min. Nástřik vzorku byl proveden při teplotě 180 °C v objemu 1 μl methanolického roztoku (splitovací poměr 1:10).

Identifikace látek proběhla porovnáním jejich spekter se spektry komerční knihovny NIST 11 (National Institute of Standards and Technology Library USA), s daty publikovanými v odborné literatuře a také se standardy, které již byly na pracovišti dříve izolovány.

4.3.2. NMR analýza

NMR spektra (^1H - a ^{13}C - NMR spektra) byla měřena na katedře Organické a biorganické chemie na přístroji Bruker Avance DRX 500 Spectrometer. Při pracovní frekvenci 500 MHz pro ^1H a 125 MHz pro ^{13}C .

Měření probíhalo v deuteriochloroformu a deuteromethanolu při teplotě 25 °C. Chemické posuny δ byly zaznamenávány v jednotkách pars per milion (ppm). Hodnoty ^1H -NMR spektra jsou vztaženy k inertnímu standardu (tetramethylsilan; 7,26 ppm) a ^{13}C -NMR spektra k signálu rozpouštědla (77,0 ppm).

4.3.3. Měření optické otáčivosti

Optická otáčivost byla měřena na polarimetru P 3000. Izolované látky byly měřeny v chloroformu nebo methanolu. Specifická otáčivost byla následně vypočtena dle vzorce:

$$[\alpha]^t = \frac{100 \times a}{c \times l}$$

a – naměřená otáčivost [°]

c – koncentrace měřené látky [g/100 ml]

l – délka kyvety [dm]

t – teplota měření [°C]

4.4. Stanovení inhibiční aktivity vůči humánním rekombinantním cholinesterasám

4.4.1. Chemikálie

- Acetylthiocholin jodid p.a. (Sigma Aldrich, Praha), (ATChI)
- Butyrylthiocholin jodid p.a. (Sigma Aldrich, Praha), (BTChI)
- Dihydrogenfosforečnan draselný bezvodý p.a. (Lach-Ner, Neratovice), (KH_2PO_4)
- Dihydrogenfosforečnan sodný dihydrát p.a. (ing. Švec – Penta, Praha), ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)
- Dimethylsulfoxid p.a. (Sigma Aldrich, Německo), (DMSO)
- 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina $\geq 98\%$ (Sigma Aldrich, Praha), (DTNB)
- Hydrogenfosforečnan disodný bezvodý p.a. (ing. Švec – Penta, Praha), (NaH_2PO_4)
- Chlorid sodný p.a. (Lachema, Brno), (NaCl)

4.4.2. Činidla pro stanovení inhibiční aktivity vůči *hAChE* a *hBChE*

- Roztok 5mM DTNB: roztok byl připraven přímým rozpuštěním naváženého množství DTNB v takovém množství 100mM fosfátovém pufru pH 7,4, aby vznikl 5mM roztok. Roztok je slabě nažloutlý. Činidlo bylo uchováváno v chladničce při 4 °C po dobu maximálně 1 týdne.
- Roztok 10mM ATChI: roztok byl připraven rozpuštěním odpovídajícího množství látky ve vodě, aby bylo dosaženo koncentrace 10 mM a roztok zůstal čirý. Činidlo bylo uchováváno v chladničce při 4 °C po dobu maximálně 1 týdne.
- Roztok 10mM BTChI: roztok byl připraven rozpuštěním odpovídajícího množství látky ve vodě, aby bylo dosaženo koncentrace 10 mM a roztok zůstal čirý. Činidlo bylo uchováváno v chladničce při 4 °C po dobu maximálně 1 týdne.

4.4.3. Pufry

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

4.4.4. Přístroje

- Reader Synergy™ Multi-Detection Microplate Reader (BioTek, USA)
- Centrifuga Boeco U-32 R, (Boeco, Německo) s rotorem Hettich 1611, (Hettich, Německo)

4.4.5. Podmínky měření

Měření probíhalo za teploty 37 °C v prostředí fosfátového pufru o pH = 7,4.

Spektrofotometrické měření barevných produktů probíhalo při vlnové délce 412 nm pro AChE i BChE.

4.4.6. Rekombinantní enzymy

Enzymy jsou připravovány rekombinantní technologií na Katedře chemie, Přírodovědecké fakulty Univerzity Hradec Králové. Používá se médium obsahující enzymy, které se v čas potřeby naředí 100mM fosfátovým pufrům o pH 7,4 tak, aby hodnota absorbance byla pro AChE 0,08 – 0,15 a pro BChE 0,15 – 0,20. Médium je rozpipetováno dle potřeby (dle vypočítaného množství, potřebného pro následné ředění k měření) do Eppendorfek, zamraženo a uchováváno v mrazáku při teplotě -22 °C do doby použití.

4.4.7. Vlastní stanovení inhibiční aktivity izolovaných alkaloidů proti AChE a BChE

Pro stanovení hodnoty inhibiční aktivity IC_{50} bylo využito Ellmanovy spektrofotometrické metody za použití 5,5'-dithiobis-2-benzoové kyseliny (DTNB). Je sledován nárůst absorbance za 1 minutu. Z těchto hodnot jsou vypočítány hodnoty IC_{50} pro AChE a BChE metodou lineární regrese v programu GraphPad Prism (verze pro Windows; výrobce GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Získané hodnoty byly porovnány se standardy – známé inhibitory cholinesteras (galanthamin a huperzin A). Procenta inhibice (% I) jsou počítány podle vzorce:

$$\% I = 100 - \left(100 \times \frac{\Delta A_{B1}}{\Delta A_{Sa}}\right)$$

% I – procento inhibice; ΔA_{B1} - pokles absorbance slepého vzorku během 1 minuty; ΔA_{Sa} - absorbance testovaného vzorku během 1 minuty.

Metoda pracuje na principu hydrolyzy esterů thiocholinu cholinesterasou za vzniku thiocholinu a kyseliny. DTNB reaguje s -SH skupinou thiocholinu za vzniku barevného produktu 5-sulfanyl-2-nitrobenzoové kyseliny.

Stanovení aktivity enzymů: do 6 jamek mikrotitrační destičky je napipetováno 8,3 μ l plazmy, hemolyzátu nebo média a přidáno 283 μ l 5mM DTNB a 8,3 μ l DMSO, vše je po dobu 1 minuty promícháváno na mikrotřepačce a poté je směs inkubována v komoře readeru při 37 °C po dobu 5 minut. Po inkubaci je přidáno 33,3 μ l roztoku substrátu (10mM ATChI nebo 10mM BTChI) a při příslušné vlnové délce (AChE a BChE rekombinantní při 412 nm) je proměřena absorbance. Způsobem popsaným výše je vypočten rozdíl a stanovena průměrná hodnota inhibice se směrodatnou odchylkou.

Stanovení aktivity látek: do mikrotitrační destičky jsou použity stejné objemy činidel a roztoku substrátu. Shodný je též postup měření jako u stanovení aktivity enzymů, ale místo 8,3 μ l DMSO se pipetuje roztok látky příslušné koncentrace. Pro každou látku je použito 6 jamek (1 řada) a do poslední řady je pipetován DMSO (místo měřené látky) jako slepý vzorek. Nejprve se provádí screeningové měření, kdy se všechny látky měří při koncentraci 4 mM, respektive 100 μ M. U látek, které vykazují při této koncentraci inhibiční potenciál vyšší než 50 %, je stanovena IC_{50} .

Získané inhibiční aktivity IC_{50} *hAChE* a IC_{50} *hBChE* pro jednotlivé látky byly porovnávány s inhibičními aktivitami referenčních látek – galanthaminem (IC_{50} , *hAChE* = 1,710 \pm 0,065 μ M, IC_{50} , *hBuChE* = 42,301 \pm 0,065 μ M) a huperzinem A (IC_{50} *hAChE* = 0,033 \pm 0,001 μ M, IC_{50} *hBChE* > 1000 μ M).

4.5. Stanovení hepatotoxicity

4.5.1. Použité přístroje a materiál

- Inkubátor SalvisLab BC 190 S s řízenou atmosférou CO₂
- Laminární box BioAir Aura 2000 M.A.C.
- Centrifuga Eppendorf 5702
- Inverzní mikroskop Nikon Eclipse Ts2
- Reader Synergy Neo2 Multi-Mode Reader NEO2SMALPHAB (BioTek, Vermont, USA)
- Statistický program GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, Kalifornie, USA, 2006)
- Mikrotitrační destičky 96 jamek (Techno Plastic Products, Trasadingen, Švýcarsko)
- Kultivační lahve T75 (Techno Plastic Products, Trasadingen, Švýcarsko)

4.5.2. Použitá média a chemikálie

- DMSO (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Minimum Essential Medium Eagle (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Fetální bovinní sérum (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- PBS (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Roztok L-glutaminu (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Trypsin/EDTA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyl tetrazolium bromid (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- RPMI 1640 médium bez fenolové červeni (BioTech, Prague, Czech Republic)
- Doxorubicin hydrochlorid (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

4.5.3. Vlastní stanovení hepatotoxicity

Testované látky byly rozpuštěny v DMSO tak, aby vznikly zásobní roztoky o koncentraci 10 mM, a dále byly ředěny v čas potřeby na testovanou koncentraci 50 μM, 10 μM a 1 μM tak, aby koncentrace DMSO nepřekročila 0,5 %. Jako standard byl použit doxorubicin hydrochlorid (c = 50 a 10 μg/ml).

Pro experiment byla použita buněčná linie hepatocelulárního karcinomu HepG2 (20. – 25. pasáž). Buňky byly kultivovány v Minimum Essential Eagle médiu obohaceném o 10 % fetálního bovinního séra a 1 % roztoku L-glutaminu při teplotě 37 °C v atmosféře

obsahující 5 % CO₂. Před pasážováním byly buňky opláchnuty PBS a dále byl použit roztok trypsin/EDTA a buňky byly inkubovány po dobu 5 minut při 37 °C. Pro stanovení cytotoxické aktivity byly buňky nasazeny do 96jamkové destičky s plochým dnem v hustotě 5*10⁴ buněk na jamku (V = 200 μl) a inkubovány 24 hodin při 37 °C a 5% koncentraci CO₂. Další den bylo odstraněno kultivační médium a buňky byly ovlivněny 100 μl roztoků testovaných extraktů v médiu na jamku. Všechna stanovení probíhala v triplikátech. V experimentu byla také zahrnuta negativní kontrola reprezentující 100% buněčnou viabilitu, k níž místo testovaného extraktu bylo přidáno pouze 0,5 % DMSO, a kontrola neobsahující žádné buňky. Ovlivněné destičky byly dále inkubovány 24 hodin při 37 °C a 5% koncentraci CO₂. Po inkubaci bylo odstraněno médium s testovanými látkami a k buňkám bylo pipetováno 110 μl roztoku 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyl tetrazolium bromidu v bezbarvém RPMI 1640 médiu a buňky byly inkubovány za stejných podmínek 3 hodiny. Po této době byl z buněk odstraněn roztok MTT a krystaly formazanu byly rozpuštěny ve 100 μl DMSO a byla změřena absorbance roztoků při 570 nm na readeru Synergy Neo2 Multi-Mode Reader NEO2SMALPHAB (BioTek, Vermont, USA). Míra zabarvení roztoku je přímo úměrná množství živých buněk. Aktivita testovaných extraktů byla vypočítána ze tří nezávislých experimentů a byla stanovena viabilita buněk v porovnání s negativní kontrolou, kdy k buňkám nebyla přidána žádná účinná látka, ale pouze 0,5 % DMSO, což odpovídá jeho koncentraci v ostatních jamkách.

4.6. Izolace alkaloidů frakce GV-4

Frakce GV-4 (hnědá viskózní hmota) byla rozpuštěna v chloroformu a nanášena na lité desky o rozměru 15 x 15 cm, kdy na jednu desku bylo vždy nanášeno maximálně 40 mg.

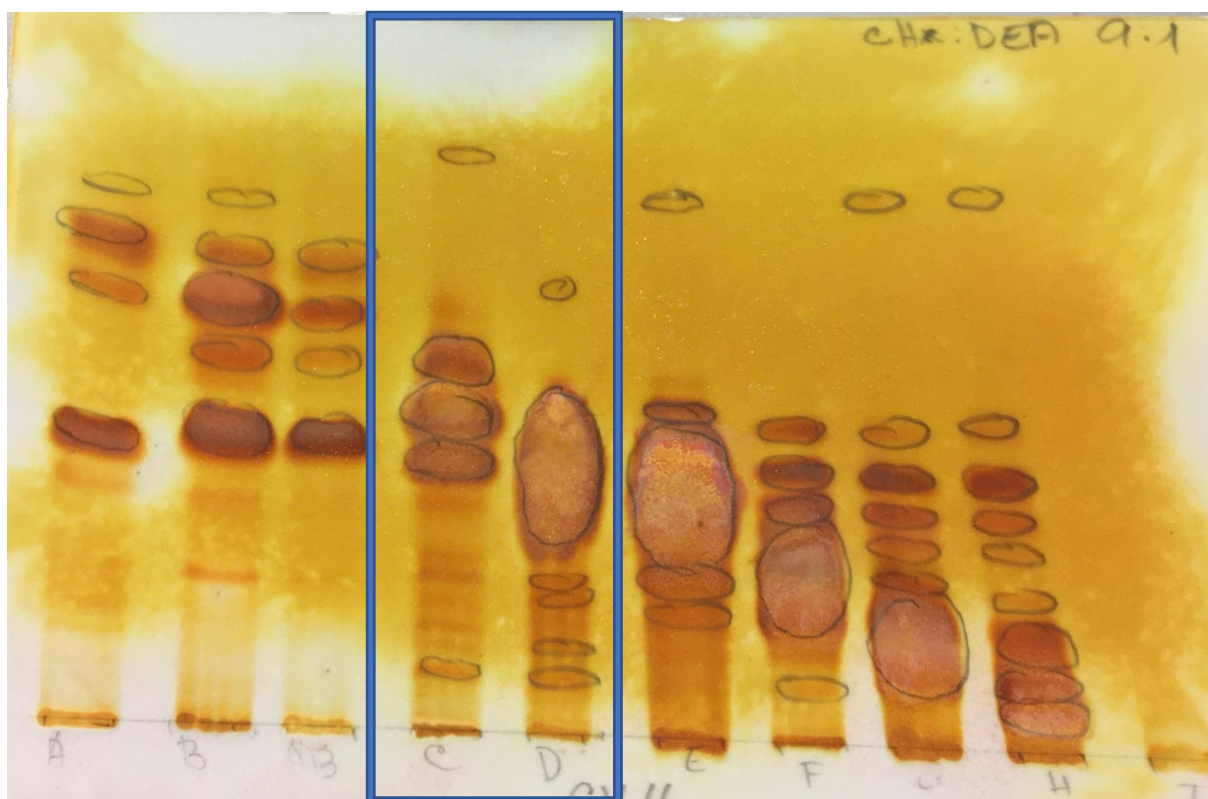
Vzhledem k množství dělené směsi 4,4 g bylo použito 120 desek. Jako mobilní fáze byla použita směs S₁. Desky se vyvíjely dvakrát. Po vysušení proudem teplého vzduchu se pomocí Dragendorffova a jodoplaticitého činidla ověřila přítomnost alkaloidů.

Alkaloidy se rozdělily do zón A až I (Tab. 5). Jednotlivé zóny byly postupně za kontroly pod UV lampou při 254 nm vyškrabány. Výškrabky jednotlivých zón ze všech desek byly spojeny. Jednotlivé zóny byly ze silikagelu (stacionární fáze) eluovány v eluční koloně. Podle množství vyškrabaného silikagelu eluce probíhala při normálním tlaku nebo pomocí vakua. Jako eluční činidlo byla použita směs CHCl₃ : EtOH (1:1). Po promytí kolony se eluční činidlo pomocí rotační vakuové odparky odpařilo. Odparky byly převedeny do menších baněk a uskladněny v lednici při 4 °C pro další separaci. Všechny zóny A až I byly nanášeny na analytickou desku a vyvinuty ve dvou mobilních fázích (Obr. 17 a 18). Také byly analyzovány

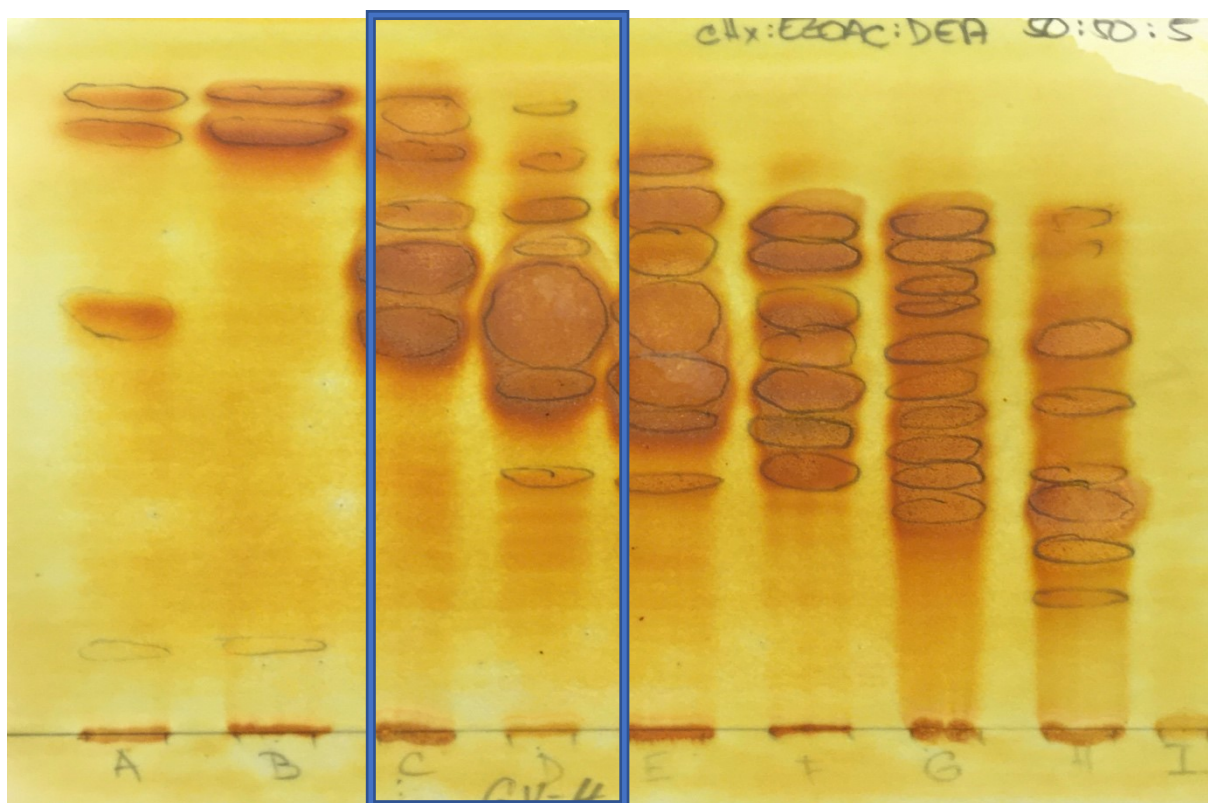
pomocí CG-MS. Stejným postupem probíhalo každé další dělení jednotlivých frakcí a podfrakcí.

Frakce	Hmotnost [g]
GV-4-A	0,0789
GV-4-B	0,0765
GV-4-AB	0,0786
GV-4-C	0,3198
GV-4-D	0,9756
GV-4-E	0,6935
GV-4-F	1,4563
GV-4-G	0,1394
GV-4-H	0,4327
GV-4-I	0,1487

Tabulka 5: hmotnosti jednotlivých frakcí A-I



Obrázek 17: kontrolní TLC – kontrolní TLC – zóny A-I ve vyvíjecí soustavě S₁

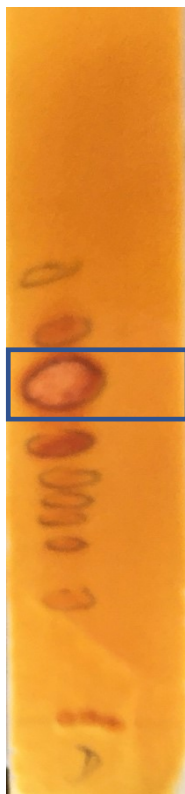


Obrázek 18: kontrolní TLC – zóny A-I ve vyvíjecí soustavě S₆

Pro další zpracování se jako nejvhodnější zdála frakce GV-4-C (320 mg) a GV-4-D (976 mg).

Frakce GV-4-D

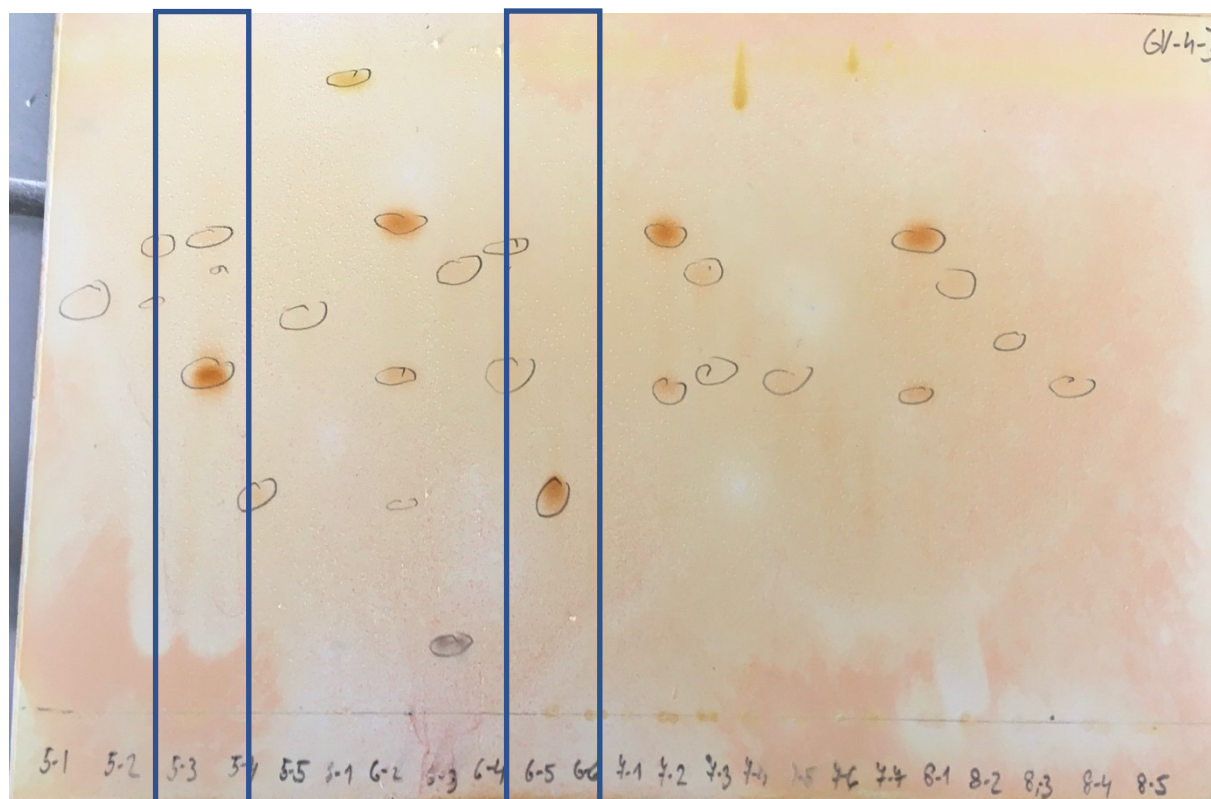
Pro frakci D byla jako mobilní fáze zvolena směs S₂. Frakci se podařilo rozdělit na podfrakce D-1 až D-8 (Obr. 19).



Obrázek 19: TLC frakce D, rozdělení na zóny D-1 až D-8

Směs S₂ byla dále použita na dělení zóny D-3, ze které byla izolována zóna D-3-A. Ta byla dále přečištěna za použití směsi S₄. Látka GV-4-D-3-A-1 po rekrystalizaci tvořila bílé krystaly. Výsledné množství čisté látky bylo 20 mg.

Jako další byly vyčištěny zóny D-5 a D-6, které byly přečištěny směsí S₄. Vzhledem k malému množství byly použity komerční desky 10 x 20 cm s tloušťkou 0,2 mm (Obr. 20).



Obrázek 20: kontrolní TLC přečištěné podfrakce D-5-3 a D-6-5

Z této podfrakce byly vyizolovány dvě bílé krystalické látky pod označením GV-4-D-5-3 (v množství 15 mg) a GV-4-D-6-5 (v množství 6 mg).

Frakce GV-4-C

Pro tuto frakci se jako nejvhodnější mobilní fáze osvědčila směs S₇, kterou se podařilo rozdělit frakci na podfrakce C-1 až C-7.

Pro další separaci byla zvolena podfrakce C-3. Byla dělena směsí S₃. Pro konečné dočištění byla použita směs S₅ a probíhalo na komerčních deskách 20 x 10 cm s tloušťkou 0,2 mm. Z této podfrakce byla získána bílá krystalická látka C-3-3-1(I) v množství 15 mg.

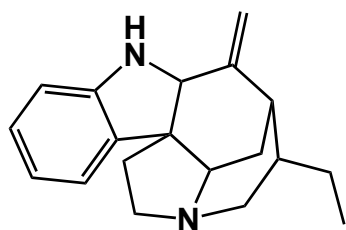
5. Výsledky

5.1. Strukturní analýza

5.1.1. GV-4-D-3-A-1: Anhydropereirin

Látka byla identifikována jako monoterpenoidní indolový alkaloid akuamicinového skeletu (Obr. 21).

Vzorec:



Obrázek 21: struktura anhydropereirinu

Sumární vzorec:

$C_{19}H_{24}N_2$

Molekulová hmotnost:

$M_r = 280$

MS analýza:

MS (EI): m/z (%) = 281 (13), 280 (65), 279 (12), 196 (11), 194 (13), 182 (13), 181 (12), 180 (16), 167 (13), 151 (12), 150 (100), 144 (30), 143 (20), 130 (28), 124 (23)

NMR analýza:

1H NMR (500MHz, $CDCl_3$) δ : 7.06 (1H, d, overlap, $J = 7.5$ Hz), 7.05 (1H, td, overlap, $J = 7.5$ Hz, $J = 1.0$ Hz), 6.77 (1H, td, $J = 7.5$ Hz, $J = 1.0$ Hz), 6.58 (1H, dd, $J = 7.5$ Hz, $J = 1.0$ Hz), 5.15 (1H, s), 4.93 (1H, s), 4.13 (1H, s), 3.26–3.15 (2H, m), 2.97 (1H, ddd, $J = 11.8$ Hz, $J = 7.8$ Hz, $J = 1.5$ Hz), 2.85 (1H, dd, $J = 11.8$ Hz, $J = 3.8$ Hz), 2.66–2.63 (1H, m), 2.39–2.25 (2H, m), 2.12–2.05 (2H, m), 1.95 (1H, td, $J = 13.3$ Hz, $J = 3.5$ Hz), 1.80–1.71 (1H, m), 1.41–1.18 (2H, m), 0.97 (3H, t, $J = 7.5$ Hz).

^{13}C NMR (125MHz, $CDCl_3$) δ : 149.0, 146.7, 135.7, 127.8, 122.4, 119.2, 115.2, 108.7, 70.9, 66.0, 54.8, 53.3, 51.4, 42.4, 41.6, 34.6, 26.9, 24.2, 11.3

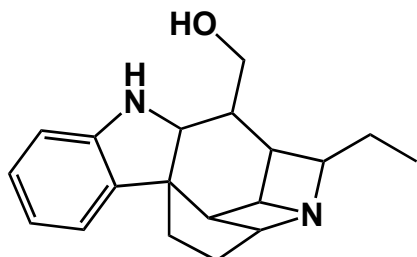
Optická otáčivost:

$[\alpha]_D^{27} = (-) 36^\circ$ ($c = 0,1$ g/100 ml, $CHCl_3$)

5.1.2. GV-4-D-5-3: diastereomer Geissoschizolinu

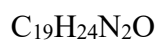
Látka byla identifikována jako monoterpenoidní indolový alkaloid akuamicinového skeletu (Obr. 22).

Vzorec:



Obrázek 22: struktura geissoschizolinu

Sumární vzorec:



Molekulová hmotnost:

$$M_r = 298$$

MS analýza:

MS (EI): m/z (%) = 341 (8,03), 281,9 (8,66), 252,7 (9,05), 208,9 (12,41), 207,9 (22,68), 190,9 (9,52), 168 (18,17), 135 (9,04), 132,9 (10,14), 95,8 (14,87), 72,9 (29,11)

NMR analýza:

Struktura izolované látky byla určena na základě interpretace ^1H - a ^{13}C -NMR spekter a jejich porovnání s literaturou.^[118]

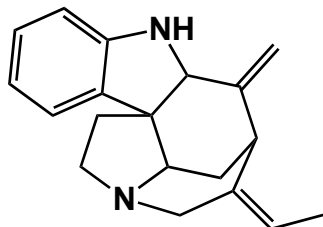
Optická otáčivost:

$$[\alpha]_D^{27} = (+) 20^\circ \text{ (c= 0,11 g/100ml, MeOH)}$$

5.1.3. GV-4-C-3-3-1(I): Deoxydihydronorfluorocurarin

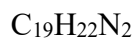
Látka byla identifikována jako monoterpenoidní indolový alkaloid akuamicinového skeletu (Obr. 23).

Vzorec:



Obrázek 23: struktura deoxydihydronorfluorocurarinu

Sumární vzorec:



Molekulová hmotnost:

$$M_r = 278$$

MS analýza:

MS (EI): m/z (%) = 279,2 (20,76), 278,2 (100), 194,1 (14,52), 143,1 (22,37), 130,1 (34,19), 122,1 (36,68), 115 (15,16), 91,1 (18,51), 77,1 (21,74)

NMR analýza:

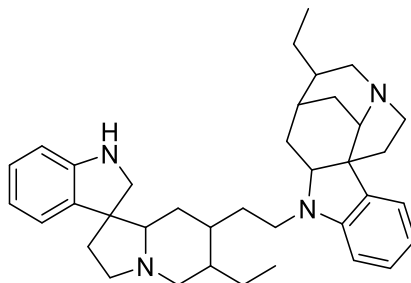
Struktura izolované látky byla určena na základě interpretace ^1H - a ^{13}C -NMR spekter a jejich porovnání s literaturou.^[119]

Optická otáčivost:

$$[\alpha]_D^{27} = (+) 148^\circ (c= 0,09 \text{ g/100ml, CHCl}_3)$$

5.1.4. GV-4-D-6-5: nová struktura

V práci je uvedena pouze hrubá struktura alkaloidu, protože se jedná o novou doposud neizolovanou látku (Obr. 24). Z důvodu dalšího publikování nejsou naměřené hodnoty a specifikace uvedeny.



Obrázek 24: hrubá struktura nové látky

5.2. Biologické aktivity izolovaných látek

5.2.1. Inhibiční aktivita izolovaných látek vůči cholinesterasám

Látka	% inhibice AChE (100 μ M)	AChE: IC ₅₀ (μ M)	% inhibice BChE (100 μ M)	BChE: IC ₅₀ (μ M)
Anhydropereirin	0	n.d.	44,30 \pm 2,75	n.d.
diastereomer Geissoschizolinu	n.d.	n.d.		n.d.
Deoxydihydronorfluorocurarin	2,49 \pm 1,25	n.d.	58,30 \pm 2,01	n.d.
nová látka	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Galanthamin	-	1,710 \pm 0,065	-	42,301 \pm 0,065
Huperzin A	-	0,033 \pm 0,001	-	> 1000

Tabulka 6: inhibiční aktivita vůči cholinesterasám

5.2.2. Hepatotoxicity

Látka, c [μ M]	Viabilita [%]
Deoxydihydronorfluorocurarin, 50	98,14 \pm 3,23
Deoxydihydronorfluorocurarin, 10	99,93 \pm 4,82
Deoxydihydronorfluorocurarin, 1	102,19 \pm 4,75

Tabulka 7: výsledky stanovení hepatotoxicity deoxydihydronorfluorocurarin

6. Diskuse

Čeď Apocynaceae je velice významným zdrojem přírodních látek. Vyskytuje se zde velké množství indolových alkaloidů, které mají mnoho farmakologických aktivit, např.: antihypertenzní, antiflogistická, antidiabetická, antibiotická, antivirotická, anticholinesterasová...

Cílem této diplomové práce byla izolace a separace alkaloidní frakce GV-4. Frakce byla získána v předchozích diplomových pracích pomocí sloupcové chromatografie etherového výtřepku sumárního extraktu z kůry brazilského stromu *Geissospermum vellosii*. Tato rostlina byla vybrána na základě screeningu, kdy sumární extrakt prokázal inhibiční aktivitu vůči cholinesterasám ($IC_{50} = 15,19 \pm 0,96 \mu\text{g/ml}$ pro AChE a $IC_{50} = 0,37 \pm 0,049 \mu\text{g/ml}$ pro BChE). Inhibice acetylcholinesterasy je dnes hlavní cíl pro ovlivnění průběhu AD. Vzhledem k narůstající incidenci tohoto onemocnění, v důsledku prodloužení lidského života, je hledání nových zdrojů pro léčbu AD žádoucí.

Izolace a separace probíhala pomocí preparativní tenkovrstvé chromatografie. Z frakce se podařilo získat 3 již známé struktury: anhydropereirin, diastereomer geissoschizolinu, deoxydihydronorfluorocurarin a jednu novou dosud neizolovanou strukturu. Více látek se nepodařilo získat v dostatečné čistotě a množství. Důvodem byl rozklad látek vlivem rozpouštědel, zejména chloroformu a také pravděpodobně vlivem sorbentu.

U všech izolovaných látek byla provedena jejich strukturní analýza. Byla měřena hmotnostní spektra pomocí plynové chromatografie, NMR spektra a optická otáčivost. Naměřené hodnoty byly porovnány s odbornou literaturou.

Dále byly látky podrobeny *in vitro* testování inhibičních aktivit vůči AChE a BChE. K určení struktury a identifikaci byly látky podrobeny strukturní analýze NMR a GC-MS. Dále byla u látek měřena optická otáčivost a u látek získaných v dostatečném množství hepatotoxicita.

Všechny látky byly testovány na inhibiční aktivitu vůči AChE a BChE na rekombinantních enzymech. Anhydropereirin nevykazoval žádnou aktivitu vůči AChE, vůči BChE $44,30 \pm 2,75 \%$. Deoxydihydronorfluorocurarin velice nízkou aktivitu proti AChE $2,49 \pm 1,25 \%$ a $58,30 \pm 2,01 \%$ proti BChE. V porovnání s referenčními standardy galanthaminem (IC_{50} , $hAChE = 1,710 \pm 0,065 \mu\text{M}$, IC_{50} , $hBChE = 42,301 \pm 0,065 \mu\text{M}$) a huperzinem A (IC_{50} AChE = $0,033 \pm 0,001 \mu\text{M}$, IC_{50} BChE > $1000 \mu\text{M}$) vykazují látky velice nízkou biologickou aktivitu vůči AChE a BChE. Lze tedy říci, že izolované alkaloidy nejsou zdrojem aktivity sumárního extraktu a nemají potenciál pro léčbu AD.

U deoxydihydronorfluocurarinu byla měřena hepatotoxicita. Bylo zjištěno, že látka není hepatotoxická, míra viability hepatocytů byla vždy kolem 100 %.

Alkaloidy budou dále studovány na aktivitu proti prvokům rodu *Plasmodium* a také pro cytotoxickou aktivitu na nádorové buňky.

7. Závěr

Cílem této diplomové práce bylo zpracování alkaloidní frakce GV-4, která byla získána z jihoamerického stromu *Geissospermum vellosi*. Vyizolovány byly tři již známé látky (anhydropereirin, diastereomer geissoschizolinu, deoxydihydronorfluorocurarin), jejichž struktura byla ověřena pomocí strukturní analýzy GC-MS a NMR. Dále se podařilo získat jednu novou strukturu. Byla měřena optická otáčivost a také hepatotoxicita. Biologická aktivita byla otestována na rekombinantních enzimech AChE a BChE.

Látky v porovnání se standardy neprokázaly významnou aktivitu vůči AChE a BChE. Struktury jsou pro léčbu AD nevyužitelné, ale budou dále studovány na aktivitu proti prvokům rodu *Plasmodium* a také pro cytotoxickou aktivitu na nádorové buňky.

8. Zdroje

- [1] Eldahshan O A, Abdel-Daim M M. Phytochemical study, cytotoxic, analgesic, antipyretic and anti-inflammatory activities of *Strychnos nux-vomica*[J]. Cytotechnology, Kluwer Academic Publishers, 2015, 67(5): 831–844.
- [2] Islam Md S, Lucky R A. A STUDY ON DIFFERENT PLANTS OF APOCYNACEAE FAMILY AND THEIR MEDICINAL USES[J]. Universal Journal of Pharmaceutical Research, Society of Pharmaceutical Tecnocrats, 2019.
- [3] Pillay V v., Sasidharan A. Oleander and Datura poisoning: An update[J]. Indian Journal of Critical Care Medicine, Jaypee Brothers Medical Publishers (P) Ltd, 2019, 23: S250–S255.
- [4] Koel M, Kuhtinskaja M, Vaheer M. Extraction of bioactive compounds from *Catharanthus roseus* and *Vinca minor*[J]. Separation and Purification Technology, Elsevier B.V., 2020, 252.
- [5] Mohammed A E, Abdul-Hameed Z H, Alotaibi M O, et al. Chemical diversity and bioactivities of monoterpene indole alkaloids (MIAs) from six apocynaceae genera[J]. Molecules, MDPI AG, 2021, 26(2).
- [6] Jiřina Spilková. Farmakognozie[M]. Praha: Univerzita Karlova v Praze, nakladatelství Karolinum, 2016.
- [7] Luděk Jahodář. Farmakobotanika[M]. Vyd. 3., upr. a dopl. Praha: Karolinum, 2011.
- [8] Lima J A, Costa R S, Epifânio R A, et al. *Geissospermum vellosii* stem bark. Anticholinesterase activity and improvement of scopolamine-induced memory deficits[J]. Pharmacology Biochemistry and Behavior, 2009, 92(3): 508–513.
- [9] Lima J A, Costa T W R, Silva L L, et al. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of a *Geissospermum vellosii* stem bark fraction[J]. Anais da Academia Brasileira de Ciências, Academia Brasileira de Ciências, 2016, 88(1): 237–248.
- [10] Rosales P F, Bordin G S, Gower A E, et al. Indole alkaloids: 2012 until now, highlighting the new chemical structures and biological activities[J]. Fitoterapia, Elsevier B.V., 2020, 143.
- [11] El-sayed M T, Hamdy N A, Osman D A, et al. Indoles as anticancer agents[J]. Advances in Modern Oncology Research, PiscoMed Publishing Pte Ltd, 2015, 1(1): 20.
- [12] Monnerat C S, Jorgeane De Souza J, Mathias L, et al. A New Indole Alkaloid Isolated from *Tabernaemontana hystrix* Steud (Apocynaceae)[R]. 2005, 16(6B).
- [13] O'Connor S E, Maresh J J. Chemistry and biology of monoterpene indole alkaloid biosynthesis[J]. Natural Product Reports, 2006, 23(4): 532–547.
- [14] Rahman M T, Tiruveedhula V V N P B, Cook J M. Synthesis of bisindole alkaloids from the Apocynaceae which contain a macroline or sarpagine unit: A review[J]. Molecules, MDPI AG, 2016, 21(11).
- [15] Liu J, Ng T, Rui Z, et al. Unusual acetylation-dependent reaction cascade in the biosynthesis of the pyrroloindole drug physostigmine[J]. Angewandte Chemie - International Edition, 2014, 53(1): 136–139.
- [16] Lubomír Opletal, Václav Koula. Apocynaceae JUSS. – toješťovitě[EB/OL]. /2021-12-13. <https://apps.faf.cuni.cz/daidalea/PlantFamily.asp?id=6>.
- [17] Islam Md S, Lucky R A. A STUDY ON DIFFERENT PLANTS OF APOCYNACEAE FAMILY AND THEIR MEDICINAL USES[J]. Universal Journal of Pharmaceutical Research, Society of Pharmaceutical Tecnocrats, 2019.
- [18] Anand U, Nandy S, Mundhra A, et al. A review on antimicrobial botanicals, phytochemicals and natural resistance modifying agents from Apocynaceae family:

- Possible therapeutic approaches against multidrug resistance in pathogenic microorganisms[J]. *Drug Resistance Updates*, Churchill Livingstone, 2020, 51.
- [19] Khanavi M, Pourmoslemi S, Farahanikia B, et al. Cytotoxicity of *Vinca minor*[J]. *Pharmaceutical Biology*, 2010, 48(1): 96–100.
- [20] Kumar S, Singh A, Bajpai V, et al. Structural characterization of monoterpene indole alkaloids in ethanolic extracts of *Rauwolfia* species by liquid chromatography with quadrupole time-of-flight mass spectrometry[J]. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, Xi'an Jiaotong University, 2016, 6(6): 363–373.
- [21] Azmi M B, Sultana S, Naeem S, et al. In silico investigation on alkaloids of *Rauwolfia serpentina* as potential inhibitors of 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA reductase[J]. *Saudi Journal of Biological Sciences*, Elsevier B.V., 2021, 28(1): 731–737.
- [22] Pandey V P, Cherian E, Patani G. Effect of Growth Regulators and Culture Conditions on Direct Root Induction of *Rauwolfia serpentina* L. (Apocynaceae) Benth by Leaf Explants[R]. 2010, 9(1).
- [23] Khyade M S, Kasote D M, Vaikos N P. *Alstonia scholaris* (L.) R. Br. and *Alstonia macrophylla* Wall. ex G. Don: A comparative review on traditional uses, phytochemistry and pharmacology[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, Elsevier Ireland Ltd, 2014, 153(1): 1–18.
- [24] Sultana N, Saleem M. Phytochemical Studies on *Alstonia scholaris*[R]. 2010, 65.
- [25] Yang J, Fu J, Liu X, et al. Monoterpenoid indole alkaloids from the leaves of *Alstonia scholaris* and their NF- κ B inhibitory activity[J]. *Fitoterapia*, Elsevier B.V., 2018, 124: 73–79.
- [26] Cai X-H, Shang J-H, Feng T, et al. Novel Alkaloids from *Alstonia scholaris*[R]. 2010, 65.
- [27] Shang J H, Cai X H, Feng T, et al. Pharmacological evaluation of *Alstonia scholaris*: Anti-inflammatory and analgesic effects[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, Elsevier Ireland Ltd, 2010, 129(2): 174–181.
- [28] Falcão M A, Scopel R, Almeida R N, et al. Supercritical fluid extraction of vinblastine from *Catharanthus roseus*[J]. *Journal of Supercritical Fluids*, Elsevier B.V., 2017, 129: 9–15.
- [29] Almagro L, Fernández-Pérez F, Pedreño M A. Indole alkaloids from *Catharanthus roseus*: Bioproduction and their effect on human health[J]. *Molecules*, MDPI AG, 2015, 20(2): 2973–3000.
- [30] Nayak B S, Pinto Pereira L M. *Catharanthus roseus* flower extract has wound-healing activity in Sprague Dawley rats[J]. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 2006, 6.
- [31] Nejat N, Valdiani A, Cahill D, et al. Ornamental exterior versus therapeutic interior of Madagascar periwinkle (*Catharanthus roseus*): The two faces of a versatile herb[J]. *Scientific World Journal*, Hindawi Publishing Corporation, 2015, 2015.
- [32] Mustafa N R, Verpoorte R. Phenolic compounds in *Catharanthus roseus*[J]. *Phytochemistry Reviews*, 2007, 6(2–3): 243–258.
- [33] Tiong S H, Looi C Y, Hazni H, et al. Antidiabetic and antioxidant properties of alkaloids from *Catharanthus roseus* (L.) G. Don[J]. *Molecules*, 2013, 18(8): 9770–9784.
- [34] Moudi M, Go R, Yong C, et al. *Vinca* Alkaloids[R]. 1231, 4(11).
- [35] Dey P. The pharmaco-toxicological conundrum of oleander: Potential role of gut microbiome[J]. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, Elsevier Masson SAS, 2020, 129.
- [36] Mouhcine M, Amin L, Saaid A, et al. Cytotoxic, antioxidant and antimicrobial activities of *Nerium oleander* collected in Morocco[J]. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, Wolters Kluwer Medknow Publications, 2019, 12(1): 32–37.

- [37] Bandara V, Weinstein S A, White J, et al. A review of the natural history, toxinology, diagnosis and clinical management of *Nerium oleander* (common oleander) and *Thevetia peruviana* (yellow oleander) poisoning[J]. *Toxicon*, 2010, 56(3): 273–281.
- [38] Singhal K G, Gupta G D. Some central nervous system activities of *Nerium oleander* Linn (Kaner) flower extract[J]. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, University of Benin, 2011, 10(4): 455–461.
- [39] Abdou R H, Basha W A, Khalil W F. Subacute toxicity of *Nerium oleander* ethanolic extract in mice[J]. *Toxicological Research*, Korean Society of Toxicology, 2019, 35(3): 233–239.
- [40] Atay Balkan İ, Doğan H T, Zengin G, et al. Enzyme inhibitory and antioxidant activities of *Nerium oleander* L. flower extracts and activity guided isolation of the active components[J]. *Industrial Crops and Products*, Elsevier B.V., 2018, 112: 24–31.
- [41] el Sawi N M, Geweely N S, Qusti S, et al. Cytotoxicity and antimicrobial activity of *Nerium oleander* extracts[J]. *Journal of Applied Animal Research*, 2010, 37(1): 25–31.
- [42] Naidoo C M, Naidoo Y, Dewir Y H, et al. Major bioactive alkaloids and biological activities of *Tabernaemontana* species (Apocynaceae)[J]. *Plants*, MDPI AG, 2021, 10(2): 1–30.
- [43] Nakdook W, Khongsombat O, Taepavarapruk P, et al. The effects of *Tabernaemontana divaricata* root extract on amyloid β -peptide 25-35 peptides induced cognitive deficits in mice[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2010, 130(1): 122–126.
- [44] Khongsombat O, nakdook W, ingkaninan K. Inhibitory effects of *Tabernaemontana divaricata* root extract on oxidative stress and neuronal loss induced by amyloid β 25–35 peptide in mice[J]. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, National Taiwan University, 2018, 8(1): 184–189.
- [45] Demessie Z, Woolfson K N, Yu F, et al. The ATP binding cassette transporter, VmTPT2/VmABCG1, is involved in export of the monoterpene indole alkaloid, vincamine in *Vinca minor* leaves[J]. *Phytochemistry*, Elsevier Ltd, 2017, 140: 118–124.
- [46] Boa M, Kolak U, Topu G, et al. Two new indole alkaloids from *Vinca herbacea* L.[J]. *Phytochemistry Letters*, 2011, 4(4): 399–403.
- [47] Zhang Y shuai, Li J dong, Yan C. An update on vincopetine: New discoveries and clinical implications[J]. *European Journal of Pharmacology*, Elsevier B.V., 2018, 819: 30–34.
- [48] Loganiaceae[EB/OL]. 2006-12-31/2021-12-13.
<http://databaze.dendrologie.cz/index.php?menu=3&id=50>.
- [49] Rostliny čeledi Loganiaceae[EB/OL]. /2021-12-13.
<https://botanika.wendys.cz/index.php/component/tags/tag/loganiaceae>.
- [50] Zhang X, Xu Q, Xiao H, et al. Iridoid glucosides from *Strychnos nux-vomica*[J]. *Phytochemistry*, Elsevier Ltd, 2003, 64(8): 1341–1344.
- [51] Zhao N, Li L, Liu J H, et al. New alkaloids from the seeds of *Strychnos nux-vomica*[J]. *Tetrahedron*, 2012, 68(16): 3288–3294.
- [52] Opletal Lubomír, Koula Václav. Fabaceae[EB/OL]. /2021-12-13.
<https://apps.faf.cuni.cz/daidalea/PlantFamily.asp?id=35>.
- [53] Fabaceae bobovitě[EB/OL]. /2021-12-13.
<http://databaze.dendrologie.cz/index.php?menu=3&id=38>.
- [54] Zhao B, Moochhala S M, Tham S Y. Biologically active components of *Physostigma venenosum*[J]. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 2004, 812(1-2 SPEC. ISS.): 183–192.

- [55] Witkop Bernhard. ChemInform Abstract: From the “Ordeal Bean” (*Physostigma venenosum*) to the Ordeal of Alzheimer’s Disease - Some of the Legacy of Percy Lavon Julian[J]. .
- [56] Opletal Lubomír, Koula Václav. Zygophyllaceae R. BR. – kacíbovitě[EB/OL]. /2021-12-13. <https://apps.faf.cuni.cz/daidalea/PlantFamily.asp?id=84>.
- [57] Zygophyllaceae[EB/OL]. /2021-12-13. <http://databaze.dendrologie.cz/index.php?menu=3&id=127>.
- [58] Li S, Cheng X, Wang C. A review on traditional uses, phytochemistry, pharmacology, pharmacokinetics and toxicology of the genus *Peganum*[J]. Journal of Ethnopharmacology, Elsevier Ireland Ltd, 2017, 203: 127–162.
- [59] Niroumand M C, Farzaei M H, Amin G. Medicinal properties of *Peganum harmala* L. in traditional Iranian medicine and modern phytotherapy: a review[J]. J Tradit Chin Med, 2015, 35(1): 104–109.
- [60] Behidj-Benyounes N, Dahmene T, Allouche N, et al. Phytochemical, antibacterial and antifungal activities of alkaloids extracted from *Peganum harmala* (Linn.) seeds of South of Algeria[J]. Asian Journal of Chemistry, Chemical Publishing Co., 2014, 26(10): 2960–2964.
- [61] Liu H, Jia Y. Ergot alkaloids: synthetic approaches to lysergic acid and clavine alkaloids[J]. Natural Product Reports, Royal Society of Chemistry, 2017, 34(4): 411–432.
- [62] Lorenz N, Haarmann T, Pažoutová S, et al. The ergot alkaloid gene cluster: Functional analyses and evolutionary aspects[J]. Phytochemistry, 2009, 70(15–16): 1822–1832.
- [63] Al-Omari R, Al-Enazi A, Ahmad R, et al. Clinical uses and toxicity of Ergot, *Claviceps purpurea* An evidence-based comprehensive retrospective review (2003-2017)[J]. Bioscience Biotechnology Research Communications, Society for Science and Nature, 2018, 11(3): 356–362.
- [64] Chen J J, Han M Y, Gong T, et al. Recent progress in ergot alkaloid research[J]. RSC Advances, Royal Society of Chemistry, 2017, 7(44): 27384–27396.
- [65] AFFOUARD A, JOLY A, LOMBARDO J, CHAMP J, GOEAU H, BONNET P (2020). Pl@ntNet observations. Version 1.2. Pl@ntNet. Occurrence dataset <https://doi.org/10.15468/gtebaa> accessed via GBIF.org on 2021-10-30. <https://www.gbif.org/occurrence/2643485394>[EB/OL]. /2022-01-15. https://www.gbif.org/occurrence/gallery?taxon_key=8371626.
- [66] Chemical composition, ethnopharmacology and biological activity of *Geissospermum Allemão* species (Apocynaceae Juss.). *Q u í m i C A* . 2013; 8, 73-160.[J]. .
- [67] *Geissospermum* Allemão[EB/OL]. /2021-12-13. <https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:2340-1#source-KB>.
- [68] Miers J. On the Apocynaceae of South America[J]. 1978: 84–86.
- [69] Liu J, Fang T, Li M, et al. Pao Pereira Extract Attenuates Testosterone-Induced Benign Prostatic Hyperplasia in Rats by inhibiting 5 α -Reductase[J]. Scientific Reports, Nature Research, 2019, 9(1).
- [70] *GEISSOSPERMUM VELLOSI* - PAO PEREIRA.[EB/OL]. /2021-12-13. <https://tropilab.com/bergibita.html>.
- [71] Yu J, Chen Q. The plant extract of Pao pereira potentiates carboplatin effects against ovarian cancer[J]. Pharmaceutical Biology, 2014, 52(1): 36–43.
- [72] Sajkowska-Kozielewicz J J, Gulik K, Makarova K, et al. Antioxidant properties and stability of *Geissospermum reticulatum* tinctures: Lag phase esr and chemometric analysis[A]. Acta Physica Polonica A[C]. Polish Academy of Sciences, 2017, 132(1): 68–72.

- [73] Werner J A T, Oliveira S M, Martins D F, et al. Evidence for a role of 5-HT_{1A} receptor on antinociceptive action from *Geissospermum vellosii*[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2009, 125(1): 163–169.
- [74] da Silva e Silva J V, Cordovil Brigido H P, Oliveira de Albuquerque K C, et al. Flavopereirine—an alkaloid derived from *Geissospermum vellosii*—presents leishmanicidal activity in vitro[J]. Molecules, MDPI AG, 2019, 24(4).
- [75] John Buckingham ... [et al.]. Dictionary of alkaloids[M]. .
- [76] Lima J A, Thiago T W, da Fonseca A C C, et al. Geissoschizoline, a promising alkaloid for Alzheimer’s disease: Inhibition of human cholinesterases, anti-inflammatory effects and molecular docking[J]. Bioorganic Chemistry, Academic Press Inc., 2020, 104.
- [77] Docking of the alkaloid geissospermine into acetylcholinesterase- a natural scaffold targeting the treatment of Alzheimer’s disease[J]. .
- [78] Kulichová M. Bolest’ – definícia, patofyziológia, terminológia, Paliatívna medicína a liečba bolesti 3/2008
- [79] Laishram D D, Sutton P L, Nanda N, et al. The complexities of malaria disease manifestations with a focus on asymptomatic malaria[J]. Malaria Journal, 2012, 11.
- [80] Švihovec Jan, Bultas Jan, Anzenbacher Pavel, et al. Farmakologie[M]. Praha: 2018.
- [81] Botsaris A S. Plants used traditionally to treat malaria in Brazil: The archives of Flora Medicinal[J]. Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine, 2007, 3.
- [82] Mbeunkui F, Grace M H, Lategan C, et al. In vitro antiplasmodial activity of indole alkaloids from the stem bark of *Geissospermum vellosii*[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2012, 139(2): 471–477.
- [83] Lorenzo G, Hughes T J R, Reali A, et al. A numerical simulation study of the dual role of 5 α -reductase inhibitors on tumor growth in prostates enlarged by benign prostatic hyperplasia via stress relaxation and apoptosis upregulation[J]. Computer Methods in Applied Mechanics and Engineering, Elsevier B.V., 2020, 362.
- [84] Blažejová R, Hošek J. Liečivá rastlinného pôvodu a ich využitie v terapii onkologických ochorení[J]. Česká a slovenská farmacie: časopis České farmaceutické spoločnosti a Slovenské farmaceutické spoločnosti, Praha, 2019; 68, 3–11.
- [85] VOGELSTEIN, Bert, David LANE a Arnold J. LEVINE. Surfing the p53 network. Nature [online]. 2000, 408(6810), 307-310 [cit. 2022-05-13]. ISSN 0028-0836.
- [86] Xu L, Su T, Xu X, et al. Platelets membrane camouflaged irinotecan-loaded gelatin nanogels for in vivo colorectal carcinoma therapy[J]. Journal of Drug Delivery Science and Technology, Editions de Sante, 2019, 53.
- [87] Li J M, Huang Y C, Kuo Y H, et al. Flavopereirine suppresses the growth of colorectal cancer cells through P53 signaling dependence[J]. Cancers, MDPI AG, 2019, 11(7).
- [88] Yu J, Chen Q. The plant extract of Pao pereira potentiates carboplatin effects against ovarian cancer[J]. Pharmaceutical Biology, 2014, 52(1): 36–43.
- [89] Ge R, Wang Z, Montironi R, et al. Epigenetic modulations and lineage plasticity in advanced prostate cancer[J]. Annals of Oncology, Elsevier Ltd, 2020, 31(4): 470–479.
- [90] Chang C, Zhao W, Xie B, et al. Pao Pereira extract suppresses castration-resistant prostate cancer cell growth, survival, and invasion through inhibition of NF κ B signaling[J]. Integrative Cancer Therapies, SAGE Publications Inc., 2014, 13(3): 249–258.
- [91] Meng F, Liu L, Chin P C, et al. Akt is a downstream target of NF-kappa B.[J]. The Journal of biological chemistry, 2002, 277(33): 29674–29680.
- [92] Dong R, Chen P, Chen Q. Extract of the Medicinal Plant Pao pereira Inhibits Pancreatic Cancer Stem-Like Cell In Vitro and In Vivo[J]. Integrative Cancer Therapies, SAGE Publications Inc., 2018, 17(4): 1204–1215.

- [93] Yu J, Drisko J, Chen Q. Inhibition of pancreatic cancer and potentiation of gemcitabine effects by the extract of Pao Pereira[J]. *Oncology Reports*, 2013, 30(1): 149–156.
- [94] Pham H N T, Vuong Q van, Bowyer M C, et al. Phytochemicals Derived from *Catharanthus roseus* and Their Health Benefits[J]. *Technologies*, MDPI AG, 2020, 8(4): 80.
- [95] Šerý O, Povová J, Míšek I, et al. Molecular mechanisms of neuropathological changes in Alzheimer's disease: A review[J]. *Folia Neuropathologica*, Termedia Publishing House Ltd., 2013, 51(1): 1–9.
- [96] Fenclová E., Albrecht J., Harsa P., Jiráček R. Rizikové faktory Alzheimerovy nemoci. *Česká a slovenská Psychiatrie* 2020; 116(2): 59–65
- [97] Jiráček Roman. Diagnostika a terapie Alzheimerovy choroby[R]. Bratislava: 2008.
- [98] Park S Y. Potential therapeutic agents against Alzheimer's disease from natural sources[J]. *Archives of Pharmacal Research*, 2010, 33(10): 1589–1609.
- [99] A " C K M A N L B, Jones S, Small & B J, et al. Multiple cognitive deficits during the transition to Alzheimer's disease[R]. 2004 Sep;256(3):195-204.
- [100] Bartoš A., Řípová D. Pokroky v diagnostice Alzheimerovy nemoci, *Psychiatr. pro Praxi*, 2007; 1:17-21
- [101] Matej R, Tesar A, Rusina R. Alzheimer's disease and other neurodegenerative dementias in comorbidity: A clinical and neuropathological overview[J]. *Clinical Biochemistry*, Elsevier Inc., 2019, 73: 26–31.
- [102] Förstl H., Kurz A. Clinical features of Alzheimer's disease, *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* (1999) 249 :288–290
- [103] Rössner P. Alzheimerova choroba – diagnostika a léčba, *Neurol. pro Praxi*, 2004; 1: 11-16
- [104] Koudelková M., Praktické zkušenosti s laboratorní diagnostikou Alzheimerovy nemoci pomocí tau proteinu, fosfo-tau proteinu a beta amyloidu v likvoru, *Neurol. pro Praxi*, 2009;10(5): 290-293
- [105] Chmátalová Z, Skoumalová A. Klinická biochemie a metabolismus 4/2014 Oxidační stres u Alzheimerovy choroby a jeho důsledky[R]. 2014, 22(43).
- [106] Tiwari S, Atluri V, Kaushik A, et al. Alzheimer's disease: Pathogenesis, diagnostics, and therapeutics[J]. *International Journal of Nanomedicine*, Dove Medical Press Ltd., 2019, 14: 5541–5554.
- [107] Hroudová J. Výzkum nových léčiv u Alzheimerovy choroby, *Psychiatr. praxi* 2017; 18(1): 7–10
- [108] Zeman M., Jiráček R. Alzheimerova choroba a diabetes mellitus typu 2, *Neurol. praxi* 2012; 13(2): 105–108
- [109] Jiráček R. Farmakoterapie Alzheimerovy choroby, *Klin Farmakol Farm* 2004; 18: 212–214
- [110] Doležal M. Farmaceutická chemie léčiv působících na centrální nervový systém[M]. 1. Praha: Karolinum, 2013.
- [111] Hroudová J. Výzkum nových léčiv u Alzheimerovy choroby, *Psychiatr. praxi* 2017; 18(1): 7–10
- [112] Vlček Jiří, Fialová Daniela, Vytřísalová Magda. Klinická farmacie I[M]. Praha: 2014.
- [113] Vališ M., Kalnická D. Novinky ve farmakoterapii demencí, *Neurol. pro praxi* 2011; 12(1): 33–36
- [114] Munier R. Separation of Alkaloids From Their N-oxies by Paper Chromatography[J]. *Bulletin de la Societe de chimie biologique*, 1953, 35(10): 1225–1231.
- [115] Munier R. BASES AZOTEES (ALCALOIDES, AMINES, VITAMINES) ET ACIDES ORGANIQUES HYDROSOLUBLES[J]. *BULLETIN DE LA SOCIETE CHIMIQUE DE FRANCE*, 1952, 19(9–10): 852–873.

- [116] Československý lékopis; 3.vydání - 1. díl.[M]. Praha: Avicenum, 1971.
- [117] Dušek J, Kašparová M, Siatka T, et al. Praktická cvičení z farmakognosie[M]. Praha: Karolinum, 2014.
- [118] Steele J C P, Veitch N C, Kite G C, et al. Indole and β -carboline alkaloids from *Geissospermum sericeum*[J]. Journal of Natural Products, 2002, 65(1): 85–88.
- [119] Boonsombat J, Zhang H, Chughtai M J, et al. A general synthetic entry to the pentacyclic *Strychnos* alkaloid family, using a [4 + 2]-cycloaddition/rearrangement cascade sequence[J]. Journal of Organic Chemistry, 2008, 73(9): 3539–3550.

9. Abstrakt

IZOLACE ALKALOIDŮ DRUHU *GEISSOSPERMUM VELLOSI* ALLEMÃO A STUDIUM JEJICH BIOLOGICKÉ AKTIVITY VIII.

PELNÁŘ T. ¹, JANOUŠEK J. ², HRADISKÁ BREITEROVÁ K. ¹, ŠAFRATOVÁ M. ¹

¹Katedra farmakognozie a farmaceutické botaniky, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Karlova Univerzita v Praze, Česká republika

²Centrum biomedicínského výzkumu, Fakultní nemocnice v Hradci Králové, Česká republika

e-mail: pehnart@faf.cuni.cz

Cílem této diplomové práce bylo zjistit aktivitu indolových alkaloidů včetně jejich separace a čištění z jihoamerického stromu *Geissospermum vellosii*, který se v tradiční medicíně používá na léčbu různých onemocnění. Vykazuje možné využití při léčbě benigní hyperplazie prostaty, léčbě nádorů, malárie, a hlavně kognitivních poruch. Izolované struktury byly podrobeny testování na inhibici lidských cholinesteras.¹ Tyto látky by mohly být použity pro léčbu Alzheimerovy choroby, což je onemocnění, jehož incidence v posledních letech stoupá. Nemoc zatím nejsme schopni zastavit, pouze zpomalit.

Výchozím produktem byl sumární alkaloidní extrakt z drcené kůry stromu, který vykazoval aktivitu vůči AChE a BChE ($IC_{50} = 15,19 \pm 0,96 \mu\text{g/ml}$ pro AChE a $IC_{50} = 0,37 \pm 0,049 \mu\text{g/ml}$ pro BChE).

V diplomové práci byla zpracovávána frakce GV-4 pomocí preparativní tenkovrstvé chromatografie. Byly získány tři již známé látky (anhydropereirin, diastereomer geissoschizolinu, deoxydihydronorfluorocurarin) a jeden nový alkaloid. Látky byly podrobeny GC-MS a NMR strukturní analýze, kvůli jejich identifikaci. Následně byly provedeny testy na inhibici cholinesteras a také byla otestována hepatotoxicita.

Reference

1 Lima J A, Thiago T W, da Fonseca A C C, et al. Geissoschizoline, a promising alkaloid for Alzheimer's disease: Inhibition of human cholinesterases, anti-inflammatory effects and molecular docking[J]. Bioorganic Chemistry, Academic Press Inc., 2020, 104.

10. Abstract

ISOLATION OF ALKALOIDS OF THE SPECIES *GEISSOSPERMUM VELLOSI* ALLEMÃO AND STUDY THEIR BIOLOGICAL ACTIVITY VIII.

PELNÁŘ T. ¹, JANOUŠEK J. ², HRADISKÁ BREITEROVÁ K. ¹, ŠAFRATOVÁ M. ¹

¹Department of Pharmacognosy and Pharmaceutical Botany, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Charles University in Prague, Czech Republic

²Biomedical Research Center, University Hospital in Hradec Králové, Czech Republic

e-mail: pelnart@faf.cuni.cz

The aim of this work was to determine the activity of indole alkaloids, including their separation and purification from the South American tree *Geissospermum vellosi*, which is used in traditional medicine to treat various diseases. It shows possible use in the treatment of benign prostatic hyperplasia, tumor treatment, plasmodial diseases, and especially cognitive disorders. The isolated structures were subsequently tested for inhibition of human cholinesterases.¹ These substances could be used to treat Alzheimer's disease, which has been increasing in recent years. We are not yet able to stop disease, just slow it down.

The starting product was a summary alkaloid extract from crushed tree bark, which showed very interesting activity against AChE and BChE ($IC_{50} = 15,19 \pm 0,96 \mu\text{g/ml}$ for AChE and $IC_{50} = 0,37 \pm 0,049 \mu\text{g/ml}$ for BChE).

The GV-4 fraction has been processed using preparative thin-layer chromatography in this work. Three already known substances (anhydropereirine, geissoschizoline diastereomer, deoxydihydronorflurocurarine) and one new alkaloid were obtained. Substances were subjected to GC-MS and NMR structure analysis for identification. Subsequently, pure compounds were tested for cholinesterase's inhibition and hepatotoxicity.

References

- 1 Lima J A, Thiago T W, da Fonseca A C C, et al. Geissoschizoline, a promising alkaloid for Alzheimer's disease: Inhibition of human cholinesterases, anti-inflammatory effects and molecular docking[J]. Bioorganic Chemistry, Academic Press Inc., 2020, 104.