

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA FARMAKOLOGIE

DIPLOMOVÁ PRÁCA

Izolácia alkaloidov druhu *Geissospermum vellosii* Alemão a
štúdium ich biologickej aktivity IV.

Vedúci diplomovej práce: PharmDr. Marcela Šafratová, PhD.

Hradec Králové, september 2020

Eliška Emrichová

Pod'akovanie

Veľmi pekne by som sa chcela poďakovať vedúcej mojej diplomovej práce PharmDr. Marcele Šafratovej, PhD. za jej vedenie pri práci v laboratóriu a pomoc či rady pri vypracovaní diplomovej práce. Zároveň ďakujem aj prof. Vincenze Andrisano a celému jej tímu na University of Bologna, Department for Life Quality Studies, Rimini Campus za príležitosť pracovať v laboratóriu a podieľať sa na testovaní biologickej aktivity. Taktiež by som sa chcela poďakovať PharmDr. Daniele Hulcovej, PhD. za tímovú spoluprácu a za každú pomoc pri meraní biologickej aktivity. Vďaka patrí aj doc. PharmDr. Jiřímu Kunešovi, CSc. za meranie a interpretáciu NMR spektier.

Táto práca bola spracovaná za podpory Špecifického vysokoškolského výskumu SVV 260 550 a programu Erasmus+.

Prehlásenie

Prehlasujem, že táto práca je mojím pôvodným autorským dielom. Všetka literatúra a ďalšie zdroje, z ktorých som pri spracovaní čerpala, sú uvedené v zozname použitej literatúry a v práci riadne citované. Práca nebola využitá k získaniu iného alebo rovnakého titulu.

V Hradci Králové, september 2020

.....

podpis

Obsah

Prehľad obrázkov a tabuliek.....	8
Zoznam skratiek	9
1. Úvod.....	10
2.Cieľ práce.....	12
3.Teoretická časť	13
3.1 Čeľad' Apocynaceae	13
3.1.1 Taxonomické zaradenie a charakteristika rodu <i>Geissospermum</i>	14
3.1.2 Charakteristika <i>Geissospermum vellosii</i> Alemão	14
3.1.3 Obsahové látky rodu <i>Geissospermum</i>	15
3.1.3.1 Alkaloidy izolované z <i>Geissospermum vellosii</i> Alemão	20
3.2 Biologická aktivita <i>Geissospermum vellosii</i> Alemão	24
3.2.1 Rakovina.....	24
3.2.1.1 Ethiopatogenéza.....	25
3.2.1.1.1 Ethiopatogenéza kolorektálneho karcinómu.....	25
3.2.1.1.2 Ethiopatogenéza rakoviny prostaty.....	25
3.2.1.1.3 Ethiopatogenéza rakoviny pankreasu	26
3.2.1.1.4 Ethiopatogenéza rakoviny prsníka.....	26
3.2.1.2 Symptómy ochorenia.....	26
3.2.1.3 Terapia rakoviny.....	26
3.2.1.3.1 Nefarmakologická terapia.....	26
3.2.1.3.2 Farmakologická terapia	27
3.2.1.4 Protinádorová aktivita	27
3.2.2 Alzheimerova choroba.....	28
3.2.2.1 Ethiopatogenéza.....	29
3.2.2.2 Symptómy ochorenia.....	29
3.2.2.4 Terapia.....	30
3.2.2.5 Inhibícia cholínesteráz.....	30
3.2.3 Malária a leishmanióza	31

3.2.3.1 Malária.....	31
3.2.3.1.2 Ethiopatogenéza- životný cyklus	31
3.2.3.1.3 Symptómy ochorenia	31
3.2.3.1.4 Terapia a chemoprofylaxia	32
3.2.3.2 Leishmanióza.....	32
3.2.3.2.1 Ethiopatogenéza- životný cyklus	32
3.2.3.2.2 Symptómy ochorenia	32
3.2.3.2.3 Terapia	33
3.2.3.2.4 Antimalarická a antiprotozoálna aktivita.....	33
3.2.4 Antinociceptívne, antiflogistické a antiamnesticke pôsobenie.....	34
4. Experimentálna časť	35
4.1. Použitý materiál	35
4.1.1. Rozpúšťadlá.....	35
4.1.2 Chemikálie.....	35
4.1.3 Detekčné činidlá	35
4.1.4 Mobilné fázy pre tenkovrstvovú chromatografiu	36
4.1.5 Adsorbenty pre tenkovrstvovú chromatografiu.....	36
4.1.6 Pomocný materiál	36
4.1.7 Rastlinný materiál.....	36
4.2 Prístroje	36
4.3 Použité metódy	37
4.3.1 Destilácia	37
4.3.2 Odparovanie	37
4.3.3 Sušenie a skladovanie.....	37
4.3.4 Príprava liatych dosiek pre preparatívnu tenkovrstvovú chromatografiu	37
4.3.5 Preparatívna tenkovrstvová chromatografia	37
4.3.5.1 Detekcia alkaloidov.....	38
4.3.6 Stĺpcová chromatografia.....	38
4.4 Izolácia alkaloidov.....	38
4.4.1 Príprava sumárneho alkaloidného extraktu	38

4.4.2	Stĺpcová chromatografia	40
4.4.3	Spracovanie frakcie GV-4	42
4.4.3.1	Separácia alkaloidov z podfrakcie GV-4-B	43
4.5	Testovanie inhibičnej aktivity GV-4-B-2-D voči cholinesterázam	43
4.5.1	Chemikálie	43
4.5.2	Činidlá	43
4.5.3	Prístroje	44
4.5.4	Podmienky merania	44
4.5.5	Použité rekombinantné enzýmy	44
4.5.6	Stanovenie cholinesterázovej inhibičnej aktivity izolovaných alkaloidov	44
4.6	Testovanie inhibičnej aktivity získaných alkaloidov voči GSK-3 β	45
4.6.1	Chemikálie	45
4.6.2	Prístroje	46
4.6.3	Stanovenie inhibičnej aktivity voči GSK-3 β	46
4.7	Testovanie permeability hematoencefalickej bariéry pre izolované alkaloidy	47
4.7.1	Chemikálie	47
4.7.2	Prístroje	47
4.7.3	Testovanie priechodnosti cez hematoencefalickú bariéru	47
4.8	Štruktúrna analýza	48
4.8.1	NMR analýza	48
4.8.2	GC-MS analýza	48
4.8.3	Optická otáčavosť	48
5.	Výsledky	49
5.1	GV-4-B-2-D – Anhydropereirín	49
5.1.1	Určenie štruktúry anhydropereirínu (GV-4-B-2-D)	49
5.1.2	NMR analýza	49
5.1.3	GC-MS analýza	49

5.1.4 Optická otáčavosť	49
5.2. Inhibičná aktivita voči AChE, BuChE, GSK-3 β a prestupnosť cez hematoencefalickú bariéru	50
6. Diskusia a záver	52
7. Abstrakt.....	54
8. Abstract	55
9. Použitá literatúra	56

Prehľad obrázkov a tabuliek

Obrázok 1 <i>Catharantus roseus(L.)</i> , <i>Vinca minor(L.)</i> , <i>Rauwolfia serpentina(L.)</i> , <i>Strophantus gratus(L.)</i>	13
Obrázok 2 <i>Geissospermum vellosii</i> Alemão (L.).....	15
Obrázok 3 <i>Geissospermum vellosii</i> Alemão (L.).....	15
Obrázok 4 základné štruktúrne typy indolových alkaloidov.....	16
Obrázok 5 biosyntéza terpenoidov.....	18
Obrázok 6 štruktúra lupeolu.....	18
Obrázok 7 štruktúra izoprénu.....	18
Obrázok 8 biosyntéza sezamínu.....	19
Obrázok 9 Súhrnné TLC pod UV lampou.....	42
Obrázok 10 Súhrnné TLC detekované Dragendorffovým činidlom.....	42
Obrázok 11 Štruktúrny vzorec Anhydropereirínu.....	49
Obrázok 12 Korelačná krivka pre porovnanie údajov získaných experimentálne a z literatúry.....	51
Tabuľka 1 Alkaloidy <i>Geissospermum vellosii</i> Alemão	24
Tabuľka 2 Podmienky stĺpcovej chromatografie	40
Tabuľka 3 Alkaloidné frakcie získané zo stĺpcovej chromatografie	41
Tabuľka 4 Výsledky merania inhibičnej aktivity	50
Tabuľka 5 Výsledky stanovenia priechodnosti cez HEB	51

Zoznam skratiek

A β	β amyloid
AD	Alzheimerova choroba
ACh	acetylcholín
AChE	acetylcholinesteráza
AKT	proteín kináza B, serín threonín kináza
BuChE	butyrylcholinesteráza
CDK5	cyklín dependentná kináza
CSCs	pankreatické kmeňové bunky
CRC	kolorektálny karcinóm
DNA	deoxyribonukleová kyselina
ERK	extracelulárnym signálom regulovaná kináza
<i>G.r.</i>	<i>Geissospermum reticulatum</i>
<i>G.s.</i>	<i>Geissospermum sericeum</i>
<i>G.v.</i>	<i>Geissospermum vellosii</i>
GSK-3 β	glykogénsyntáza kináza 3 β
HEB	hematoencefalická bariéra
MAPK	mitogénom aktivovaná proteín kináza
NFTs	neurofibrilárne kľbká
NMDA	<i>N</i> -methyl-D-aspartát
NMR	nukleárna magnetická rezonancia
PAMPA BBB	test priepustnosti cez umelú membránu, hematoencefalická bariéra
p53	transkripčný faktor/ tumor supresorový gén
TLC	tenkovrstvová chromatografia

1. Úvod

Povedomie o rastlinách a ich liečivých účinkoch siaha do dávnych dôb. Aj napriek tomu, že ľudia nemali dostatočné množstvo vedomostí o príčinách chorôb, využívali rastliny na základe skúseností a získané vedomosti si predávali tradovaním.¹ Rastliny majú nezastupiteľný význam v každom ekosystéme, pretože sú hlavnými producentami organickej hmoty. Ich dôležitosť môžeme nájsť v každodennom živote, nakoľko produkujú pre nás veľmi dôležitý kyslík, sú zdrojom potravy pre človeka, ale aj pre zvieratá a môžeme ich využívať pre ich liečebné účely. Bežne rastliny využívame pre ich hojivé, protizápalové, upokojujúce účinky, účinky zlepšujúce trávenie a to najmä vo forme čajov, odvarov, tinktúr. No nielen to. Rastliny v sebe skrývajú nespočetné množstvo účinných látok, ktoré majú využitie pre menej aj viac závažné ochorenia. Používajú sa ako čisté látky alebo ako zmesi látok, ktoré slúžia ako zdroj liečiv. Liečivá ako kodeín, morfín, chinín, galantamín a mnohé iné sú všetko látky, ktoré sú získané z rastlín a sú využívané až dodnes.

Rastliny sú bohaté na prítomnosť primárnych a sekundárnych metabolitov. Primárne metabolity tvoria základnú molekulárnu štruktúru rastlinného organizmu, vyskytujú sa v každej živej bunke a zúčastňujú sa základných metabolických pochodov bunky (primárny metabolizmus). Produktami primárneho metabolizmu sú sekundárne metabolity, ktoré sa vyskytujú náhodne a nemajú zásadný význam pre život organizmu. Rastlinné sekundárne metabolity plnia ochrannú funkciu, zabezpečujú transport kovov alebo pôsobia ako signálne molekuly. Sú to látky, ktoré z rastlín získavame a vyznačujú sa biologickou aktivitou. Typickým príkladom sekundárnych metabolitov sú alkaloidy, terpenoidy či flavonoidy.² Látky obsiahnuté v rastlinách a ich častiach v súčasnosti vieme mnohými metódami izolovať, identifikovať a využívať v terapii. Cesta prírodnej látky k liečivu je sprevádzaná rôznymi postupmi kombinujúc botanické, fytochemické, biologické a molekulárne techniky. Začiatok 19. storočia bol veľkým míľnikom pre izoláciu látok z rastlín v čistej forme a jednými z prvých boli alkaloidy, ako napríklad alkaloidy z maku, uragogy, strychnínovníku a postupne pribúdali ďalšie.¹

Alkaloidy sú zlúčeniny, ktoré vo svojej štruktúre obsahujú heterocyklicky viazaný dusík a väčšinou majú zásaditý charakter. Tieto látky sú produkované rastlinami, baktériami, hubami a zriedka živočíchmi, ako produkty sekundárneho metabolizmu, vyznačujúce sa biologickou aktivitou. Biosyntéza týchto látok je veľmi zložitá a nie u všetkých druhov je presne známa.³ Veľké množstvo alkaloidov pôsobí na nervový systém a interaguje na nervových zakončeníach. Táto aktivita vyplýva aj z toho, že mnoho alkaloidov je štruktúrne veľmi podobných

fyziologickým neurotransmitterom, ktoré sa viažu na tieto v tele sa nachádzajúce receptory. Jednou z najvýznamnejších skupín týchto látok je skupina indolových alkaloidov. Medzi najznámejšie patrí napríklad jed strychnín, skôr používaný rezerpín či dnes často používané protinádorovo pôsobiace vinka alkaloidy.⁴

V tejto práci bola venovaná pozornosť izolácii alkaloidov a štúdiu ich biologickej aktivity z kôry *Geissospermum vellosii* Alemão, ktorá sa vyznačuje vysokým obsahom indolových alkaloidov. *Geissospermum vellosii* Alemão je pôvodom z Amazonského dažďového pralesa a v minulosti bol vo veľkej miere využívaný indiánmi pre svoje antipyretické vlastnosti.⁵ Gustav Peckolt, lekárnik a vedec, ho zaradil medzi jeden z desať najviac terapeuticky využívaných brazílskych stromov.⁶ Extrakt z kôry bol dlhú dobu využívaný v komplementárnej a alternatívnej medicíne u pacientov s rakovinou a bola ňho zistená cytotoxická aktivita voči nádorom prostaty, vaječníkov a pankreasu.⁷ Ďalšou zistenou aktivitou je efektívne potlačenie proliferácie HIV a herpes vírov. Bol využívaný aj pre stimuláciu imunitného systému pri liečbe malárie a tiež sa vyznačuje antinociceptívnym pôsobením.^{5,8} Alkaloidy izolované z *Geissospermum vellosii* Alemão majú obrovský potenciál aj preto, lebo sa vyznačujú anticholinesterázovou aktivitou.⁹

Už od roku 1838 bol objektom výskumu kvôli jeho vlastnostiam z hľadiska chemického aj farmakologického.⁶ Doposiaľ však nemáme zástupcu, ktorý by sa využíval v terapii, ale pri väčšom skúmaní a štúdiu biologickej aktivity by sme z rady alkaloidov mohli nájsť potenciálne liečivo.

2.Cieľ práce

1. Spracovanie kôry, získanie sumárneho a následne alkaloidného extraktu a následná stĺpcová chromatografia Et₂O výtrepku.
2. Izolácia aspoň jedného alkaloidu v čistej forme z frakcie GV-4 v dostatočnom množstve, za pomoci preparatívnej tenkovrstvovej chromatografie a rekryštalizácie.
3. Podieľanie sa na identifikácii izolovaných látok za pomoci spektrálnych a fyzikálne chemických metód.
4. Stanovenie biologickej aktivity vybraných alkaloidov izolovaných z *G.v.* a ich testovanie v rámci projektu Erasmus+.
5. Teoretické spracovanie témy.

3. Teoretická časť

3.1 Čeľad' Apocynaceae

Čeľad' Apocynaceae je jednou z najväčších a najdôležitejších čeľadí krytosemenných rastlín. Pozostáva zo 424 rádov a z viac ako 4600 druhov, ktoré sú rozdelené v podčeľadiach Rauvolfioideae, Apocynoideae, Periplocoideae, Secamonoideae a Asclepiadoideae. Niekoľko štúdií ukázalo antioxidačnú, protizápalovú, antimikrobiálnu a cytotoxickú aktivitu surového extraktu ako aj jednotlivých látok izolovaných z rôznych druhov tejto čeľade.¹⁰

Rastliny z čeľade Apocynaceae sú vytrvalé byliny, polokry, malé kry, liany alebo stromy, ktoré sa vyskytujú prevažne v trópoch. Ich plodom je najmä mechúrik, tobolka, bobuľa alebo kôstkovica. Pre čeľad' je typický výskyt kardioaktívnych glykozidov, indolových alkaloidov, sekoiridoidných a iridoidných monoterpénov a tiež kaučuky (polyterpény) rozptýlené v latexe. V čeľadi Apocynaceae sa vyskytuje niekoľko významných druhov, ako je napríklad *Catharanthus roseus* (L.), *Vinca minor* (L.), *Rauvolfia serpentina* (L.) a druhy rodu *Strophanthus*.(obr.1)¹¹ *Catharanthus roseus* (L.) produkuje indolové alkaloidy a je bohatý na vinblastín, ktorý má antimitotický účinok či vinkristín s cytostatickým účinkom.^{12,13} *Vinca minor* (L.), trvalka známa po celej Európe je poloker obsahujúci vinkamín, ktorý pôsobí ako periférne vazodilatans.¹⁴ *Rauvolfia serpentina* (L.) je ker, rastúci v tropických oblastiach Ázie a jej typickou účinnou látkou je rezerpín, ktorý má hypotenzívny účinok.^{15,11} *Strophanthus gratus* (L.) je stromovitá liana, ktorá rastie v lesoch tropickej Afriky a obsahuje hlavne alkaloidy, ale aj kardioaktívne glykozidy (strofantín), ktoré sa môžu používať pre posilnenie srdcovej činnosti.¹⁶



Obrázok 1 *Catharanthus roseus*(L.), *Vinca minor*(L.), *Rauvolfia serpentina*(L.), *Strophanthus gratus*(L.)^{17,18,19,20}

3.1.1 Taxonomické zaradenie a charakteristika rodu *Geissospermum*

Ríša:	Plantae
Podríša:	Tracheobionta
Oddelenie:	Magnoliophyta
Rád:	Gentianales
Čeľaď:	Apocynaceae
Podčeľaď:	Apocynoideae
Rod:	<i>Geissospermum</i> Alemão ²¹

Rod *Geissospermum* je rod stromov, prirodzene sa vyskytujúcich v Južnej Amerike, ktorý sa rozprestiera od Guyany až po Brazíliu.²² Vodné infúzie z kôry druhov *Geissospermum* boli rodákmi vo veľkej miere využívané za mnohými liečebnými účelmi. Užívaním týchto infúzií sa preukázal antimalarický, protinádorový, antioxidantný, nociceptívny a antibakteriálny účinok. Z tohto rodu bolo popísaných 12 druhov a päť z nich bolo toho času preskúmaných (*G. argenteum*, *G. fuscum*, *G. laeve*, *G. reticulatum*, *G. sericeum*).²³ Niekoľko druhov rodu *Geissospermum* vrátane *G. laeve* a *G. sericeum* sú známe svojimi antimalarickými vlastnosťami. Tieto sú najčastejšie užívané vo forme vodných odvarov alebo alkoholických macerátov z kôry. *G. laeve* je najviac preštudovaným druhom s asi 22 izolovanými indolovými alkaloidmi.⁹ Rastliny rodu *Geissospermum* sú známe svojou veľmi intenzívnou horkosťou. Vnútorňa kôra druhov rodu *Geissospermum* je veľmi cenná pre liečebné vlastnosti.⁵

3.1.2 Charakteristika *Geissospermum vellosii* Alemão

Geissospermum vellosii (G.v.) (obr.2, 3) alebo Pao Pereira, známy aj ako *Geissospermum laeve*, *Geissospermum martianum*, *Tabernaemontana laevis* je stredne veľký vždyzelený strom s hustou korunou, ktorý sa vyskytuje v oblasti Amazonského dažďového pralesa, pôvodom z oblasti Surinamu. Vyskytuje sa najmä v nezaplavených častiach lesa, kde dorastá do výšky 80 metrov, s priemerom 3-4 metre. Kvety sú biele, veľmi nápadné. Má svetlo hnedý až žltý kmeň. Plody predstavujú dva špicaté, zrnité segmenty, ktoré sú fúzované a žlté, keď dozrievajú. Jeho mnohopočetné semenka sú biele a ploché. Plody a koncové časti vetvičiek produkujú latex.⁵



Obrázok 2 *Geissospermum vellosii* Alemão (L.)²⁴



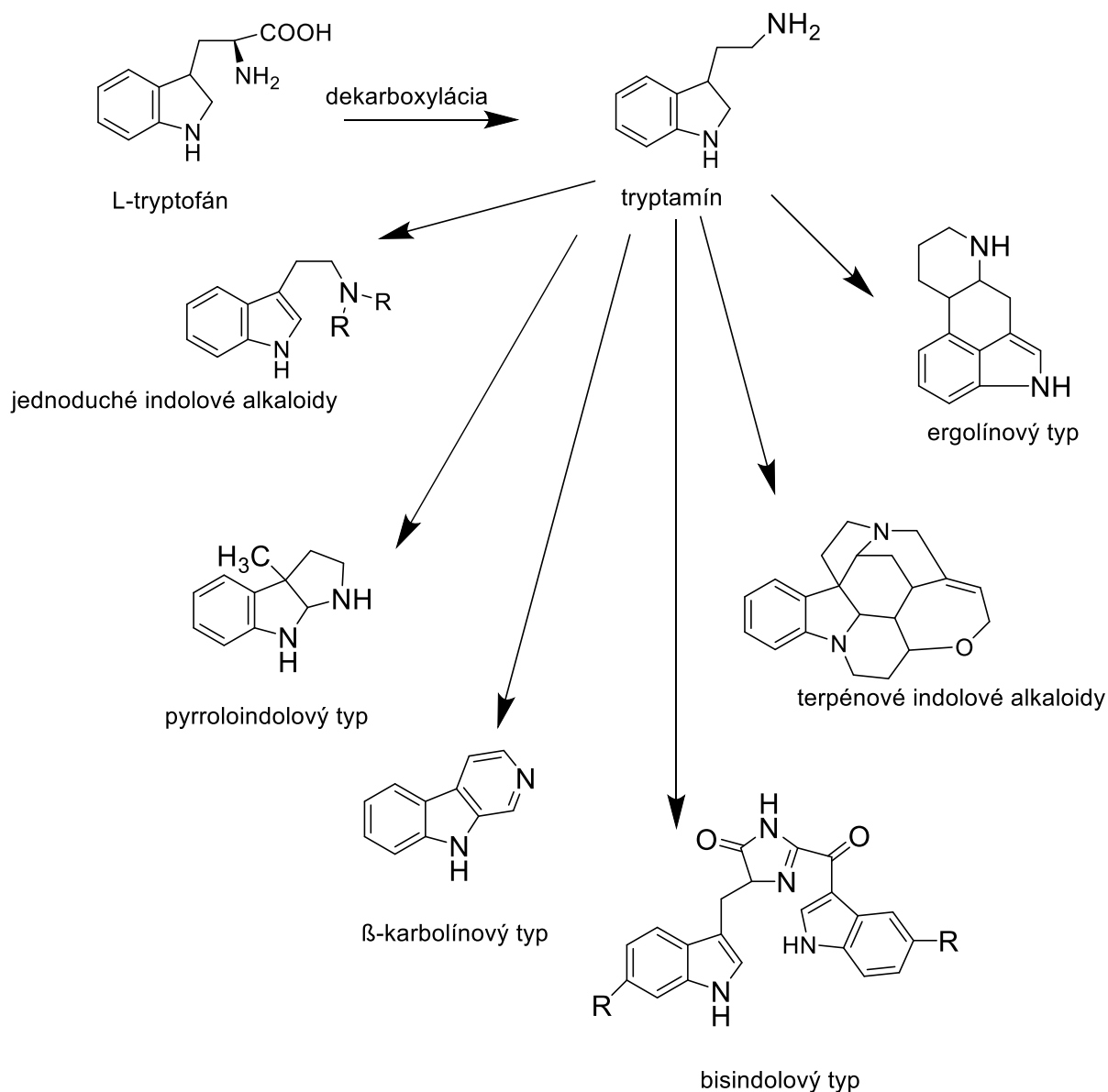
Obrázok 3 *Geissospermum vellosii* Alemão (L.)²⁵

3.1.3 Obsahové látky rodu *Geissospermum*

Rastlinné druhy rodu *Geissospermum* sú terapeuticky významné rastliny kvôli účinkom podporujúcim zdravie.²³ Najviac preskúmaným druhom z hľadiska obsahových látok je *G.v.*, no významné obsahové látky nájdeme aj v ostatných druhoch.

Hlavnými obsahovými látkami rodu *Geissospermum* sú indolové alkaloidy, ktorých základnú štruktúru tvorí indol. Tieto alkaloidy sú odvodené od aminokyseliny tryptofánu, ktorého dekarboxyláciou vzniká tryptamín (obr.č.4). Okrem základných druhov indolových alkaloidov, ktoré sú uvedené na obrázku č.4, poznáme aj mnohé ďalšie druhy ako sú napríklad jednoduché tryptamínové, chaetocínové, euodia, indolaktamové, karbazolové, indolo[2,3- A]karbazolové a indolonaftyridínové alkaloidy.²⁶ Mnoho indolových alkaloidov obsahuje vo svojej štruktúre izoprénové jednotky a takýmito alkaloidmi sú terpénové indolové alkaloidy alebo secologanín-tryptamínové alkaloidy.²⁷ Vo všeobecnosti môžeme podľa prítomnosti izoprénovej jednotky alkaloidy rozdeliť do dvoch základných skupín na izoprenoidné a neizoprenoidné alkaloidy. Alkaloidy s izoprenoidným skeletom sú terpénové indolové alkaloidy (monoterpenoidné indolové alkaloidy), bisindolové a ergolínové alkaloidy. Do skupiny neizoprenoidných alkaloidov patria jednoduché indolové alkaloidy (indolylalkylamínový typ), β -karbolínové alkaloidy, pyrroloindolové alkaloidy.²⁸ Mimoriadne dôležitou a rozmanitou skupinou, ktorá je aj výrazne obsiahnutá v *G.v* je skupina monoterpenoidných indolových alkaloidov a alkaloidov od nej odvodených, ktoré vznikajú kondenzáciou tryptofánu so secologanínom za vzniku strictosidínu, ktorý následne konvertuje

na 4,21-dehydrogeissoschizín, ktorý cyklizuje na katenamín a jeho redukciou poskytuje korynantheanové alkaloidy. Biosyntéza ostatných štruktúrnych typov prebieha premenou 4,21-dehydrogeissoschizínu na preakuamicín (korynantheanový typ), z ktorého následne vznikajú ďalšie typy ako je iboga či aspidospermanový typ. Skupina monoterpénoidných indolových alkaloidov v konečnom dôsledku disponuje niekoľkými (42) štruktúrnymi variantami alkaloidov.^{26,28}



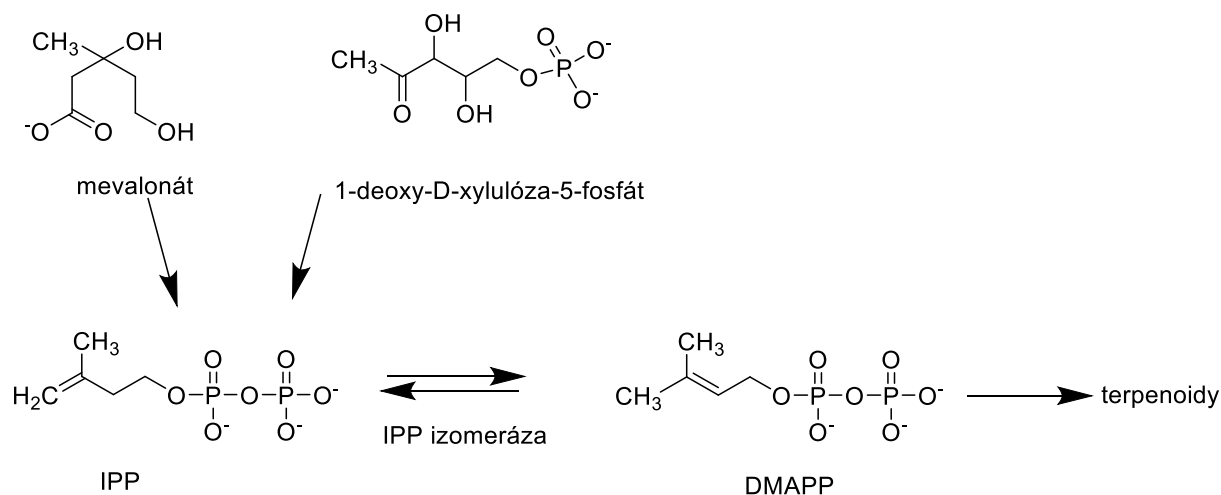
Obrázok 4 základné štruktúrne typy indolových alkaloidov^{11,28}

Druhy rodu *Geissospermum* sú bohatým zdrojom indolových alkaloidov β -karbolínového typu a indolových monoterpénoidných alkaloidov najmä strychnidínového, korynantheanového a aspidosperma nového štruktúrneho typu.²⁹ V najväčšej miere sa indolové

alkaloidy vyskytujú hlavne v kôre *G.v.*, ale aj v listoch či kôre *Geissospermum reticulatum* (*G.r.*) alebo v kôre *Geissospermum sericeum* (*G.s.*).^{30,31} Najviac preskúmaným druhom je *G.v.*, ktorého jednotlivé alkaloidy budú popísané v ďalšej kapitole.

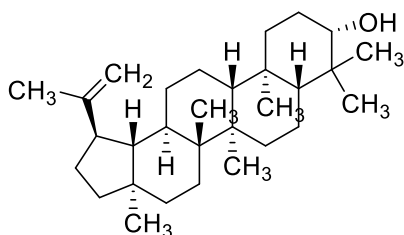
Veľmi dobre preskúmaným druhom je i *G.r.*, z ktorého bolo doposiaľ izolovaných sedem indolových alkaloidov nachádzajúcich sa v listoch a to najmä 10-Methoxygeissospermidín, geissospermidín, 10 - Demethoxy-12-hydroxy-17,19-epoxygeissovellín, (Z)-10-Demethoxy-12-hydroxygeissovellín, *O*-Demethylaspidospermín, *N*-deacetyl-*N*-butanoylgeissospermidín, (E)-10-Demethoxy-12-hydroxygeissovellín. Z kôry *G.r.* boli izolované tri indolové alkaloidy ako napríklad 11-Methoxygeissospermidín, flavopereirín a geissosretikulatín.³¹ Ďalším menej preskúmaným druhom je *G.s.*, v ktorého kôre môžeme nájsť indolový alkaloid geissoschizolín a jeho deriváty ako geissoschizolín *N*-4-oxid a 1,2-Dehydrogeissoschizolín a tiež vyššie spomínaný flavopereirín.³⁰

Okrem alkaloidov sa v *G.v.* v menšej miere vyskytujú aj iné sekundárne metabolity, ako napríklad látky zo skupiny terpenoidov a lignánov. Terpenoidy sú veľkou a rozmanitou skupinou prirodzene sa vyskytujúcich organických látok, ktoré sú odvodené od terpénov. Štruktúra týchto látok je často mnohocyklická s kyslík obsahujúcou funkčnou skupinou.³² Terpenoidy môžeme rozlišovať na základe počtu izoprénových jednotiek na hemiterpenoidy, monoterpenoidy, seskviterpenoidy, diterpenoidy, sesterpenoidy, triterpenoidy, tetraterpenoidy, polyterpenoidy. Aj napriek veľkým štruktúrnym rozdielom medzi terpenoidmi, sú tieto látky odvodené od C5 izoprénu. (obr.7) Skelet terpenoidov je syntetizovaný z dvoch prekursorov, ktorými sú isopentenyl pyrofosfát (IPP) a dimethylallyl pyrofosfát (DMAPP). Tieto prekuzory vznikajú prostredníctvom mevalonátovej biosyntetickej cesty (MVA) a prostredníctvom 2c-methyl-D-erythritol-4-fosfátovej cesty (MEP), z ktorej vzniká 1-deoxy-D-xylulóza-5-fosfát. Z týchto prekursorov vzniká terpenoidný skelet prostredníctvom rôznych preskupení a cyklizačných reakcií. (obr.5)³³

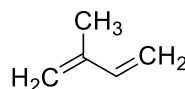


Obrázok 5 biosyntéza terpenoidov³⁴

Príkladom terpenoidu vyskytujúceho sa v *G.v.* je päťcyklický triterpenoid lupeol. (obr.6) Lupeol je prírodný triterpenoid, patriaci do skupiny fytosterolov vyznačujúci sa širokým spektrom biologických aktivít. Jeho výskyt je prevažne v ovocí (figy, mango, jahody), zelenine (biely šalát, paprika, uhorka), ale tiež je zložkou niektorých liečivých rastlín aj v čeľadi Apocynaceae (*Aspidosperma nitidum*, *Hemidesmus indicus*, *Himatanthus sucuuba*).³⁵ Lupeol je látka, u ktorej boli zistené protizápalové, antimutagénne, antibakteriálne, antidiabetické, antidiarhoické účinky, a tiež strava bohatá na fytosteroly môže znižovať riziko vzniku rakoviny hrubého čreva, prsníka, prostaty.³⁶



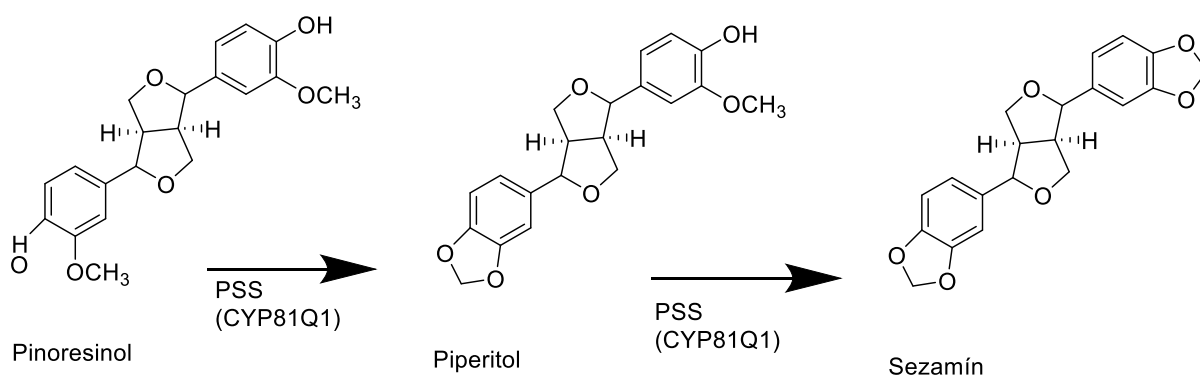
Obrázok 6 štruktúra lupeolu³⁷



Obrázok 7 štruktúra izoprénu³⁴

Ďalšou skupinou látok vyskytujúcich sa v *G.v.* sú lignány. Lignány sú polyfenolické zlúčeniny vyskytujúce sa v rastlinách.³⁸ Lignány sú odvodené od koniferylalkoholu a ďalších fenypropánov. Vznikajú spojením dvoch fenypropánových derivátov cez β-uhlíkový atóm postranného propánového reťazca.³⁹ Lignán, ktorý je hlavnou aktívnou zložkou semien rastliny *Sesamum indicum*, ale jeho prítomnosť bola potvrdená aj v *G.v.* sa nazýva sezamín. Sezamín je lignán furofuránového typu a jeho biosyntéza vychádza z koniferylalkoholu. Viacerými reakciami vzniká pinoresinol, z ktorého prostredníctvom piperitol/sezamín syntázy cez

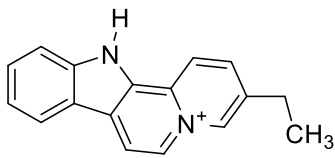
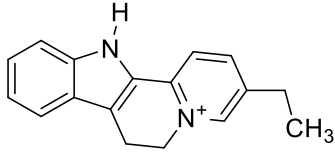
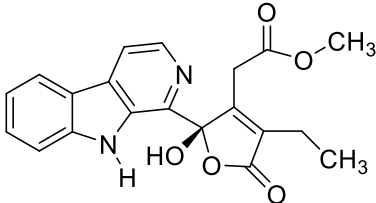
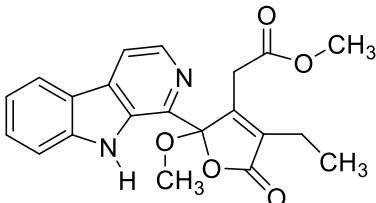
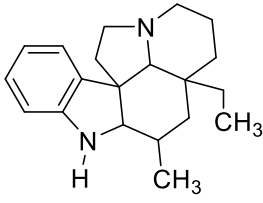
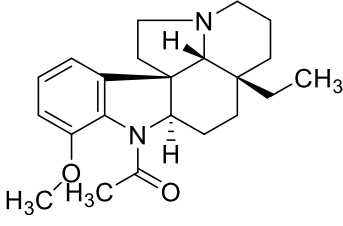
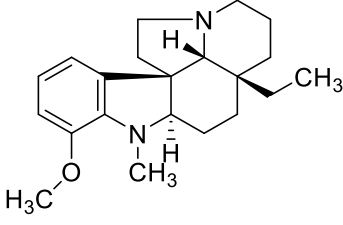
piperitol vzniká sezamín.(obr.8) Sezamín má značné pôsobenie na metabolizmus cukrov, tukov a tiež antikancerogénne či protizápalové pôsobenie.^{40,41}

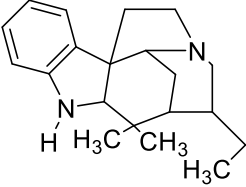
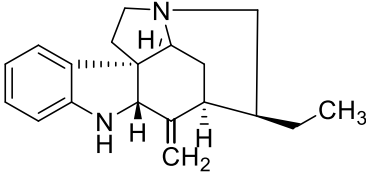
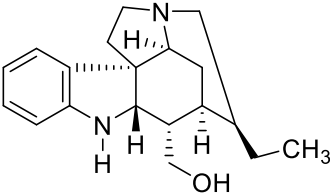
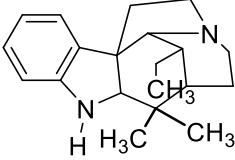
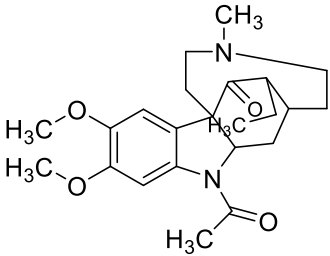
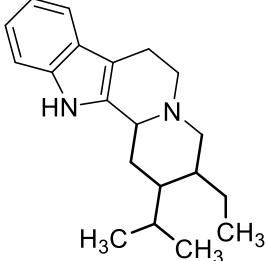
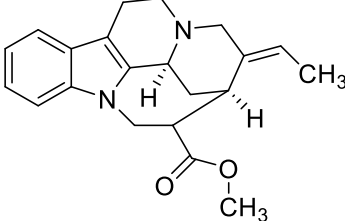


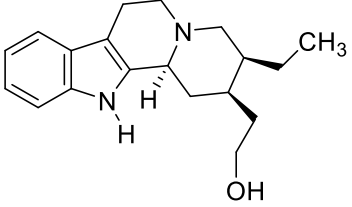
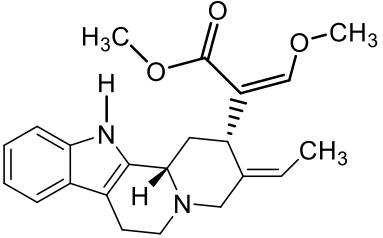
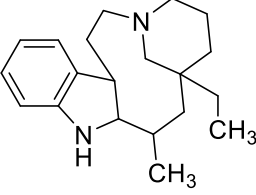
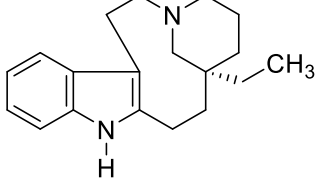
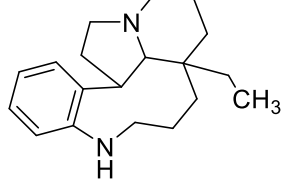
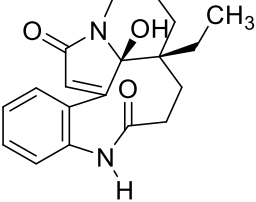
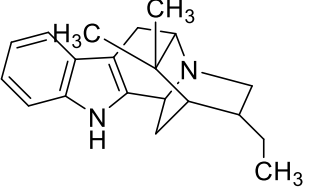
Obrázok 8 biosyntéza sezamínu⁴⁰

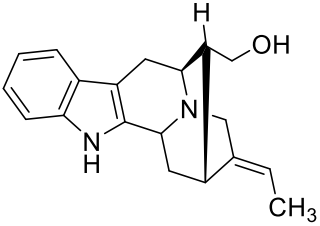
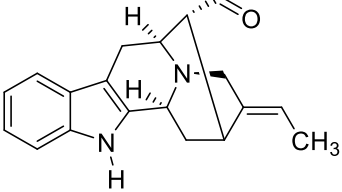
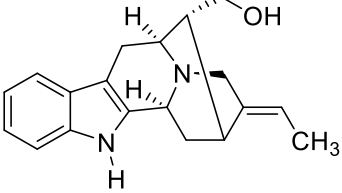
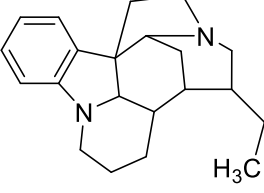
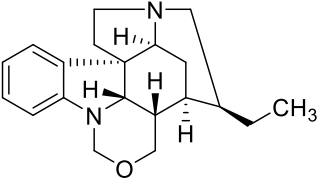
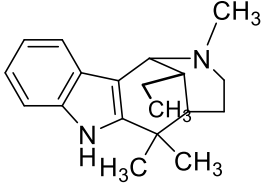
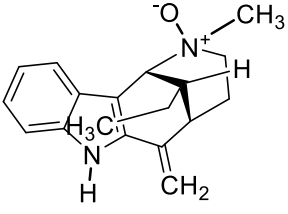
V rastlinách tohoto rodu sú obsiahnuté aj látky z rádu polyfenolických látok a flavonoidov.²³ Flavonoidy sú skupinou látok prírodného pôvodu s rozličnými fenolickými štruktúrami. Sú hojne zastúpené v ovocí, zelenine, zrnách, koreňoch, kôre, kvetoch, čaji a víne. Tieto prírodné produkty sú veľmi známe pre ich zdraviu prospešné účinky a bývajú zložkou nutraceutík, kozmetiky či liečiv. Ich využitie je pripisované najmä pre ich antioxidantívne, protizápalové, protimutagénne, protirakovinové vlastnosti.⁴² Pre použitie v terapii sú využívané vo forme čistých látok, štandardizovaných extraktov alebo vo forme drog.³⁹ Kôra *G.r.* sa vyznačuje vysokou hladinou fenolických zlúčenín, ktoré môžu byť potenciálnym zdrojom prírodných antioxidantov. Konkrétne izolované látky zo skupiny polyfenolov alebo flavonoidov neboli popísané, ale testy etanolického extraktu kôry preukázali ich vysokú prítomnosť.²³

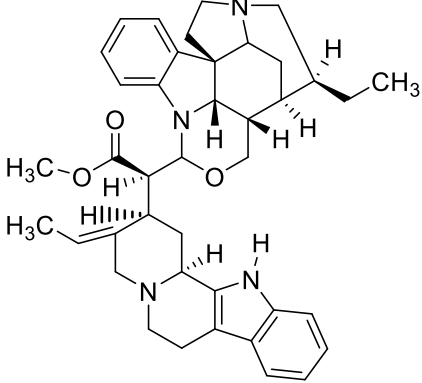
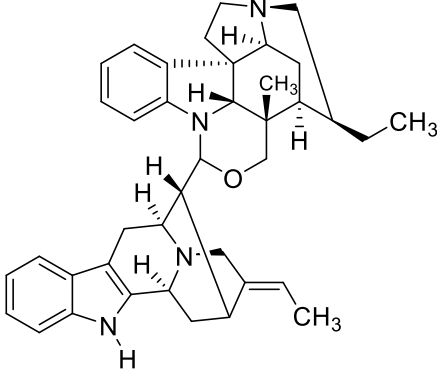
3.1.3.1 Alkaloidy izolované z *Geissospermum vellosii* Alemão

β karbolínové indolové alkaloidy	
Flavopereirín	
Dihydroflavopereirín	
Geissolaevín	
O-Methylgeissolaevín	
Monoterpenoidné indolové alkaloidy	
Aspidospermanový skelet:	
Aspidospermín	
12-Methoxy-1-methyl- aspidospermidín	

<p>Akuamicínový skelet:</p>	
<p>Anhydropereirín</p>	
<p>Geissoschizolín</p>	
<p>Condylocarpanový skelet:</p>	
<p>Geissovelín</p>	
<p>Corynantheanový skelet:</p>	
<p>Apogeissoschizín</p>	

Corynantheidol	
Geissoschizín	
Quebrachamínový skelet:	
Quebrachamín	
Rhazinilamový skelet:	
Leukonolam	
Sarpaginový skelet:	

Tombozín	
Vellosimín	
Vellosiminol	
Strychnidínový skelet:	
Geissoschizón	
Uleanový skelet:	
Pausperadín A (Uleín N-oxid)	
Bisindolové alkaloidy	
Dimér strychnidínového a corynathaenového skeletu:	

Geissospermín	
Dimér strychnidínového a sarpagínového skeletu:	
Geissolosimín	

Tabuľka 1 Alkaloidy *Geissospermum vellosii* Alemão^{26,37}

3.2 Biologická aktivita *Geissospermum vellosii* Alemão

3.2.1 Rakovina

Rakovina je ochorenie vyznačujúce sa nekontrolovateľným rastom buniek, stratou diferenciácie buniek, invazívnosťou či tvorbou metastáz. Pred vyše než sto rokmi rakovina nebola bežne sa vyskytujúcim ochorením.⁴³ V súčasnosti je známych viac ako 100 typov rakoviny, no následné riadky budú venované typom, voči ktorým *G.v.* vykazuje určitú biologickú aktivitu ako je napríklad kolorektálny karcinóm (CRC), rakovina prostaty, vaječníkov, pankreasu, prsníka.

Počas niekoľkých posledných dekád incidencia rakoviny veľmi narastá a príčinou nárastu môže byť rýchlo sa meniaci životný štýl, chronický stres, vyšší vek, predlžujúca sa dĺžka života, prekonaná rakovina, fajčenie, alkohol, nadužívanie analgetík, antibiotík, kortikosteroidov.⁴³ Pre vznik samotného CRC je vysokým rizikom práve nezdravý životný štýl (nadváha, nedostatok vlákniny, vysoký obsah tukov v strave), vyšší vek (50+), ulcerózna kolitída v anamnéze, Crohnova choroba, CRC v rodinnej anamnéze.⁴⁴ Pre vznik rakoviny prostaty je najrizikovejší vysoký vek, ale taktiež riziko narastá u pacientov s rakovinou prostaty

a prsníka v rodinnej anamnéze, strava s vysokým obsahom tukov, fajčenie či hormonálne vplyvy.⁴⁵ Ďalším z ochorení je rakovina pankreasu, na vzniku ktorej sa podieľa množstvo faktorov, ako je napríklad vek, nadváha, fajčenie, nadmerná konzumácia alkoholu, chronická pankreatitída, rodinná anamnéza a v neposlednom rade vysoké riziko je u pacientov s ochorením diabetes mellitus.⁴⁶ Ochorenie typické najmä pre ženské pohlavie, ktoré sa ale vyskytuje aj u mužov je rakovina prsníka, ktorá môže byť podmienená vekom, estrogénmi, rodinnou anamnézou či génovými mutáciami a to konkrétne najčastejšie tumor supresorových génov rakoviny prsníka (BRCA1/2).⁴⁷

3.2.1.1 Etiopatogenéza

Rakovina je považovaná za genetické ochorenie, ktoré je spôsobené zmenami génov, ktorých hlavnou úlohou je kontrolovať rast a delenie buniek. Genetické zmeny, ktoré spôsobujú rakovinu môžu byť dedičné alebo môžu byť získané počas života v dôsledku chýb, ktoré vznikajú pri delení buniek alebo v dôsledku poškodenia deoxyribonukleovej kyseliny (DNA) environmentálnymi vplyvmi (chemikálie v tabakovom dyme, UV žiarenie zo slnka).⁴⁸

3.2.1.1.1 Etiopatogenéza kolorektálneho karcinómu

Kolorektálne rakovinové ochorenie, je ochorenie, ktoré môže vznikáť buď na úrovni hrubého čreva alebo rekta. Tento typ ochorenia najčastejšie vzniká rastom buniek na vnútornej strane výstelky hrubého čreva alebo rekta. Vzniknuté bunky môžu vytvárať výrastky, ktoré nazývame polypy. Polypy sa môžu, ale aj nemusia meniť na rakovinové útvary, ktoré môžu prerásť až do najvnútornejšej vrstvy (mucosa). Najčastejším zhubným nádorom býva adenokarcinóm.⁴⁹

3.2.1.1.2 Etiopatogenéza rakoviny prostaty

Rakovina prostaty je ochorenie postihujúce mužov. Prostata je žľaza nachádzajúca sa pod močovou trubicou a oproti rektu. Príčiny vzniku tohto ochorenia nie sú presne známe, ale veľký vplyv na vznik majú faktory vonkajšieho a vnútorného prostredia. Podobne ako u CRC, najčastejším typom býva adenokarcinóm.⁴⁹ Niekoľko štúdií preukázalo, že v rakovinových bunkách prostaty dochádza k nadmernej expresii receptorov steroidných hormónov. Sú prítomné vysoké hladiny testosterónu a dihydrotestosterónu v rakovinových bunkách.⁵⁰

3.2.1.1.3 Etiopatogenéza rakoviny pankreasu

Pankreas je dôležitým orgánom nášho tela, ktorý má exokrinnú aj endokrinnú funkciu. Príčinou vzniku rakoviny pankreasu môže byť dedičnosť alebo získaná mutácia génov (onkogény, tumor supresorové gény, gény bunecného cyklu, gény pre apoptózu). Najčastejšie prípady mutácie v skupine onkogénov je pri géne nazývanom KRAS (Vírusový onkogén sarkómu potkana Kirsten), ktorého mutácia je prítomná v 90 % prípadov rakoviny pankreasu. Zo skupiny tumor supresorových génov je mutácia prítomná najviac u génu pre transkripčný faktor p53.⁴⁶

3.2.1.1.4 Etiopatogenéza rakoviny prsníka

Rakovina prsníka je nádorové ochorenie, ku ktorému zvyčajne dochádza v dôsledku spojenia genetických a environmentálnych faktorov. Dráhy MAPK/ERK (mitogénom aktivovaná proteín kináza/ extracelulárnym signálom regulovaná kináza) a PI3K/AKT (fosfatidylinositol-3-kináza/proteín kináza B) ochraňujú normálne bunky pred bunecnou smrťou. Ak dôjde k mutácii génov pre tieto ochranné dráhy a viac nepotrebné bunky nebudú schopné smrti, vedie to ku vzniku rakovinových buniek.⁵¹ Rakovina prsníka môže vznikáť na viacerých miestach v prsníku avšak najviac v rúrkach, ktoré vedú mlieko do bradaviek alebo v žľazách, ktoré vytvárajú materské mlieko.⁴⁹

3.2.1.2 Symptómy ochorenia

V počiatočných štádiách môže byť rakovina bezpríznaková a preto je dôležité, aby ľudia podstupovali pravidelný screening a tiež eliminovali rizikové faktory.⁵² Jedná sa o skupinu ochorení, ktoré môžu vyvolať akýkoľvek symptóm v závislosti od lokalizácie, veľkosti a od toho, ako veľmi je dané tkanivo alebo orgán poškodený.⁴⁹

3.2.1.3 Terapia rakoviny

3.2.1.3.1 Nefarmakologická terapia

Nefarmakologická terapia pozostáva z niekoľkých typov ako je terapia chirurgická, pri ktorej dochádza k chirurgickému odstráneniu nádoru alebo celého orgánu. Tento typ liečby nie je možný u všetkých typov ochorenia avšak najčastejšie to býva u rakoviny prsníka, prostaty či pľúc.⁵³ Ďalšou používanou metódou je rádioterapia, ktorá vysokými hladinami radiácie zabíja rakovinové bunky alebo spomaľuje ich rast zničením ich DNA. Následkom radiácie nastáva zástava bunecného delenia alebo smrť buniek.⁴⁸

3.2.1.3.2 Farmakologická terapia

Pre farmakoterapiu rakoviny existuje niekoľko skupín liečiv od alkylačných látok, antimetabolitov, cytotoxických antibiotík, derivátov cisplatiny, monoklonálnych protilátok hormonálnych liečiv až po cieleňú protinádorovú terapiu, imunoterapiu či terapiu kmeňovými bunkami. Svoje zastúpenie v terapii majú aj rastlinné alkaloidy, ako sú napríklad vinka alkaloidy a ich analógy pôvodom z *Cataranthus roseus* (vinblastín, vinkristín, vinoreblín), deriváty podofylotoxínu pôvodom z *Podophyllum peltatum* (etoposid), deriváty kolchicínu pôvodom z *Colchicum autumnale* (demekolcin), taxány pôvodom z *Taxus brevifolia* (paklitaxel, docetaxel), ktoré majú využitie až dodnes.⁵⁴

3.2.1.4 Protinádorová aktivita

Protinádorovou aktivitou sa vyznačuje β -karbolínový alkaloid, flavopereirín, ktorého aktivita bola preukázaná voči bunkám CRC a rakoviny prostaty. Jeho presný mechanizmus účinku zatiaľ však zostáva neobjasnený.⁵⁵

CRC je celosvetovo závažnou príčinou morbidity a mortality. Flavopereirín má schopnosť znižovať životaschopnosť rozličných druhov rakovinových buniek. Táto schopnosť bola štúdiami preukázaná u viacerých bunčných typov, ale najlepšiu aktivitu preukázal u buniek HCT116 ($IC_{50} = 8,15 \mu M$). V danej štúdii bolo zistené, že bunky rezistentné voči oxaliplatine boli citlivé práve na flavopereirín. Tým pádom by sa teoreticky mohol využiť práve voči bunkám, ktoré sú voči doposiaľ poznaným liečivám rezistentné. Na základe poznatku o znižovaní životaschopnosti buniek bolo ďalej zistené a testované, že flavopereirín pôsobí tiež apopticky, zabraňuje G2/M fáze bunčného cyklu, najmä tak, že zvyšuje up-reguláciu p53, spôsobuje downreguláciu signálnej dráhy JAK/STAT (Janus kináza/ Signálne transduktory a aktivátory) a jej transkripčných faktorov, ktoré majú funkciu pri progresii CRC.⁵⁵

Protinádorová aktivita *G.v.* bola tiež testovaná *in vitro* aj *in vivo* voči bunčnej línii LNCaP ľudskej rakoviny prostaty. Bolo preukázané, že extrakt *G.v.* silno inhibuje rast kultúr bunčnej línie LNCaP o viac ako 75- 80 % v závislosti na dávke (10 a 20 mg/kg) a pôsobí apopticky a tiež redukuje proliferáciu rakovinových buniek.⁵⁶ Čiastočne inhibuje NF- κ B (nukleárny faktor), aktiváciu v rakovinových bunkách prostaty a môže pôsobiť ochranné voči vzniku kastročne rezistentného karcinómu prostaty (CRPC).⁵⁷ Aj napriek tomu, že presný mechanizmus účinku extraktu nie je úplne známy, predpokladá sa, že jeho účinok spočíva v prítomnosti β - karbolínových alkaloidov, ktoré suprimujú aktivitu cyklín dependentnej kinázy (CDK), ktorá je potrebná pre riadenie bunčného cyklu normálnych a rakovinových

buniek. Ďalším pôsobením flavopereirínu je zástava bunecného cyklu buniek rakoviny prsníka a signálnej dráhy hlavných proliferačných faktorov zahŕňajúc AKT, MAPK, ERK v bunkách.⁵⁸

Okrem čistých izolovaných látok aj samotný extrakt *G.v.* vykazuje protinádorovú aktivitu voči rakovinovým bunkám vaječníkov s výrazne nízkou toxicitou voči normálnym, zdravým bunkám. Pri porovnaní citlivosti na pôsobenie extraktu, rakovinové bunky preukazujú IC_{50} v rozmedzí 180-235 mg/ml, zatiaľ čo IC_{50} nerakovinových buniek bola takmer dvojnásobná, 537 mg/ml. Na základe zistenia nízkej toxicity boli vykonané štúdie kombinujúce *G.v.* a karboplatinu, pričom sa preukázala takmer úplná inhibičná aktivita voči nádoru (97%) a ascites, ktorý často vzniká v dôsledku malignít, bol úplne vymiznutý. *G.v.* pôsobí v kombinácii s karboplatinou synergicky.⁵⁹ Extrakt z *G.v.* je schopný inhibovať aj pankreatické kmeňové bunky (CSCs). CSCs bunky sú malou skupinou rakovinových buniek, ktoré sú rezistentné voči chemoterapii a rádioterapii a sú zodpovedné za vytváranie nových nádorov a vznik recidív.⁶⁰ Majú samo obnovujúcu schopnosť a umožňujú rast všetkým bunecným typom nachádzajúcim sa v určitej časti nádoru. Tento alkaloidný extrakt indukuje apoptózu v pankreatických kmeňových bunkách a zvyšuje citlivosť rakovinových pankreatických buniek pri liečbe gemcitabínom.⁷ Štúdiom inhibície proliferácie viacerých línii CSCs preukázalo aktivitu s hodnotou IC_{50} v rozmedzí 125-325 $\mu\text{g/ml}$ a vyznačovalo sa veľmi limitovanou cytotoxicitou pre normálne epiteliálne bunky. Populácia pankreatických CSCs buniek, identifikovaná použitím povrchových markerov CD24+ CD44+ EpCam+ alebo nádorových sféroidov bola významne redukovaná s hodnotou $IC_{50}= 100 \mu\text{g/ml}$ po 48h a pri dlhodobej terapii s hodnotou $IC_{50}= 27 \mu\text{g/ml}$. Vďaka schopnosti tvoriť nádorové sféroidy vieme zistiť seba obnovujúcu schopnosť a kapacitu tvorby nádorov *in vitro*. Pri koncentrácii 100 $\mu\text{g/ml}$ a viac, extrakt *G.v.* kompletne eliminoval nádorové sféroidy bunecnej línie PANC-1 s hodnotou $IC_{50}=27 \mu\text{g/ml}$ a sféroidy MIA PaCa-2 s hodnotou $IC_{50}= 35 \mu\text{g/ml}$.⁷

3.2.2 Alzheimerova choroba

Alzheimerova choroba (AD) je celosvetovo najbežnejšou príčinou demencie. Jedná sa o progresívne, neurodegeneratívne ochorenie, ktorého presná etiológia nie je úplne známa. Toto ochorenie je spôsobené najmä stratou cholinérgnych neurónov v mozgu a je sprevádzané úbytkom hladiny neurotransmiteru acetylcholínu (ACh). Výskyt AD je tiež sprevádzaný vznikom depozitov β -amyloidných ($A\beta$) senilných plakov a neurofibrilárných uzlov (NFTs) v mozgu.^{61,62,63}

Za najväčší rizikový faktor AD môžeme považovať vek a následne druhým hlavným rizikovým faktorom je prítomnosť jedného alebo viacerých alel apolipoproteínového génu E4 (APOE4). Medzi ďalšie by sme mohli zaradiť nízku úroveň vzdelania či povolania, AD v rodinnej anamnéze, stredne ťažké alebo ťažké mozgové príhody, kardiovaskulárne problémy.⁶¹

3.2.2.1 Ethiopatogenéza

Vznik tohoto ochorenia je sprevádzaný tvorbou extracelulárnych zhlukov A β plakov a intracelulárnych zhlukov NFTs, ktoré sú zložené z hyperfosforylovaných s mikrotubulmi asociovaných τ proteínov. A β plaky sa vyskytujú najmä v bazálnej, temporálnej, orbitofrontálnej mozgovej kôre a v neskorších štádiách progredujú až do hippocampu, amygdaly, medzimizgu a bazálnych ganglií. Vysoká prítomnosť A β je spúšťačom pre tvorbu klbiek τ proteínov. A β plaky vznikajú zmenou v štiepení prekursorového proteínu pre amyloid (APP) prostredníctvom β -sekretázy (BACE1) a γ -sekretázy. Plaky následne polymerizujú, aktivujú glykogénsyntázu kinázu-3 β (GSK-3 β) a CDK5, ktoré vedú k hyperpolarizácii τ proteínov a následne ku vzniku nerozpustných NFTs. Vzniknuté plaky a klbká vedú k aktivácii mikroglií a lokálnemu zápalu a vyúsťujú do neurotoxicity.⁶⁴

Pri AD je tiež postihnutý cholinérgny systém, u ktorého dochádza k strate neurónov v mozgu, býva prítomný nedostatok enzýmu cholinesteráztransferázy, ktorý je zodpovedný za syntézu ACh. K tomuto acetylcholinérgnemu deficitu prispieva aj zvýšená tvorba butyrylcholinesterázy (BuChE). Tento systém je dôležitý pre krátkodobú pamäť a získavanie nových vedomostí.⁶¹

Jednou z ďalších postihnutých oblastí je glutamátérgny systém, u ktorého dochádza k nadmernému uvoľneniu excitačného glutamátu a v najviac zasiahnutých oblastiach kôry dochádza k jeho zníženému spätnému vychytávaniu. V dôsledku tohoto procesu dochádza niekoľkými krokmi k neuronálnej apoptóze. Receptory pre glutamát nazývané NMDA (*N*-methyl-D-aspartát) receptory sú zodpovedné za proces učenia a pri ich hyperexcitácii je tento ich účinok narušený.⁶¹

3.2.2.2 Symptómy ochorenia

Priebeh tohoto ochorenia je spojený najmä s kognitívnym deficitom. V rannom štádiu má pacient problém s epizodickou krátkodobou pamäťou, kedy má uchované spomienky z dávnej minulosti, no nedávne spomienky chýbajú. U pacienta sú prítomné ťažkosti s hľadáním slov či

mierne problémy s priestorovou orientáciou, ktoré sa postupom času zhoršujú. Pacienti často opakujú otázky na už zodpovedané veci, nesprávne umiestňujú bežné osobné veci. Toto ochorenie so sebou nesie aj neuropsychiatrické príznaky, ktoré sa na začiatku prejavujú najmä ako apatia, úzkosť či podráždenosť a často sa aj na začiatku pridružuje mierne až stredne ťažká depresia. V neskorších štádiách sú prítomné poruchy spánku, strata chuti do jedla, zmeny vo vnímaní či myslení.⁶⁵

3.2.2.4 Terapia

V súčasnosti sú pre terapiu AD využívané dve skupiny látok a tými sú inhibítory AChE (donepezil, galantamín, rivastigmín), z ktorých rastlinným zástupcom je galanthamín získaný z *Galanthus woronovii* a inhibítory NMDA receptorov (memantín). Nakoľko nepoznáme presnú príčinu ochorenia, tieto liečivá pôsobia najmä na spomalenie progresie ochorenia a oddialenia ťažkých štádií.⁶¹

3.2.2.5 Inhibícia cholinesteráz

Cholinesterázy sú látky patriace do skupiny enzýmov, ktoré katalyzujú hlavne hydrolýzu ACh na cholín a kyselinu octovú. Tento proces je podstatný pre obnovenie cholinérgneho neurónu. Tieto enzýmy však môžeme rozdeľovať do dvoch základných skupín, ktorými sú AChE a BuChE. Expresia AChE prebieha v nervových a krvných bunkách. BuChE, ktorej fyziologická funkcia nie je veľmi preskúmaná, je známa ako plazmatická cholinesteráza alebo pseudocholinesteráza. Obidve cholinesterázy sú významnými cieľmi pre toxíny a liečivá.⁶⁶ Schopnosť inhibovať práve cholinesterázy je významná pri terapii neurodegeneratívneho ochorenia AD, ktorého prevalencia dramaticky rastie s vekom a dvojnásobne po 65 roku života.⁶³ V rastlinnej ríši bolo objavených veľa extraktov a izolovaných zlúčenín, ktoré majú inhibičnú aktivitu voči AChE, BuChE alebo voči obidvom týmto enzýmom. Spomedzi množstva rastlín je to napríklad *Huperzia serrata*, *Stephania tetraanda*, *Narcissus confusus*, *Tabernaemontana divaricata*.⁶

Alkaloidné frakcie kôry *G.v.* sa vyznačujú inhibičnou aktivitou voči AChE a tiež BuChE.⁶⁷ *In vitro* bolo preukázané, že inhibičná aktivita frakcie *G.v.* je viac selektívna pre BuChE, než pre AChE. Štúdie ukazujú inhibičné pôsobenie *G.v.* s hodnotami IC₅₀ voči AChE 2.9 µg/ml (pri c 1,1–7,8 µg/ml) a IC₅₀ voči BuChE 1.6 µg/ml (pri c 0,5–5,5 µg/ml).⁶ Významnú antiacetylcholinesterázovú aktivitu frakcie preukazuje alkaloid geissospermín, ktorý je považovaný za hlavný alkaloid izolovaný a identifikovaný z kôry *G.v.* a má schopnosť sa silno

viazať na ľudskú AChE. ⁹ Geissospermín dokáže zvrátiť kognitívny deficit v prípadoch kognitívnej hypofunkcie. Táto schopnosť môže byť využitá pre objav liečiv využívaných v symptomatickej liečbe AD.⁵⁷

3.2.3 Malária a leishmanióza

3.2.3.1 Malária

Malária je parazitárne ochorenie, ktorého pôvodcom je protozoálny parazit rodu *Plasmodium* (*Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale wallickeri*, *Plasmodium ovale curtisi*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium knowlesi*), ktorý je prenášaný na človeka prostredníctvom štípnutia komárom rodu *Anopheles*. Druhy rodu *Plasmodium* majú životný cyklus, počas ktorého prechádzajú viacerými morfológickými štádiami a delia sa z jednej bunky až na 10 000 a viac buniek.⁶⁸ Nakoľko výskyt tohoto ochorenia je typický najmä pre tropické oblasti, ako je Afrika, pobyt v týchto oblastiach môže byť veľkým rizikom. Rizikovou skupinou sú najmä deti do 5 rokov, tehotné ženy, pacienti s HIV/AIDS. Pred uštipnutím sa dá ochrániť používaním ochranných sietí v období od západu slnka až po svitanie a používaním repelentov.⁶⁹

3.2.3.1.2 Ethiopatogenéza- životný cyklus

Infikovaná samička prenáša pri uhryznutí sporozoity, ktoré prenikajú do pečeneových buniek, kde sa premenia na primárne tkanivové schizonty. Následne niekoľkými bunecnými deleniami vznikajú merozoity, ktoré vstupujú do krvi. Nastáva obdobie bez príznakov, ktoré nazývame preerytrocytárne. Následne dochádza k prenikaniu parazita do erytrocytov, kde sa ďalším delením vytvárajú nové merozoity, ktoré sa pri rozpade erytrocytov vyplavujú do krvi a spôsobujú záchvat horúčky a infikujú nové erytrocyty. Doba vývoja merozoitov určuje intervaly medzi jednotlivými záchvatmi horúčky.⁷⁰

3.2.3.1.3 Symptómy ochorenia

Prejavy ochorenia sa môžu dostaviť asi po 10-15 dňoch od uštipnutia komárom. Toto ochorenie sa môže typicky prejavovať vysokou horúčkou, únavou, zvracaním a bolesťami hlavy. V prípade neliečenia do 24 hodín môže viesť ku vzniku žltej kože, záchvatom až k smrti.⁶⁹

3.2.3.1.4 Terapia a chemoprofylaxia

Pri ceste do endemickej krajiny je vhodné užívať liečivá ako profylaxiu pred hroziacou maláriou. Výber liečiva závisí od samotnej cieľovej oblasti, dĺžky cesty, veku osoby, druhu plazmódia, ktorý sa v danej oblasti vyskytuje. Ako prevencia sa pred začiatkom cesty užívajú najmä liečivá ako doxycyklín, kombinácia atovachónu a proguanilu, hydroxychlorochín, meflochín, primachín, ktoré su odvodené od chinínu získaného z *Cinchona officinalis*.^{39,71}

Liečivá používané na liečbu a prevenciu malárie sú chlorochín, primachín, amodiachín, proguanil, chinín, meflochín, pyrimetamín, atovachón, doxycyklín, klindamycín, artemisín pôvodne získaný z *Artemisia annua* a jeho deriváty (dihydroartemisín, artesunát, artemeter, artemimol).^{39,54}

3.2.3.2 Leishmanióza

Leishmanióza je parazitárne ochorenie spôsobené prvokmi z rodu *Leishmania*, ktoré je prenášané uštipnutím bodavým hmyzom rodu *Phelobotomus* alebo *Lutzomyia*. Toto ochorenie postihuje najmä chudobnejších ľudí a zároveň súvisí s podvýživou, slabým imunitným systémom, nedostačujúcimi životnými podmienkami či presídlením obyvateľstva.⁶⁹

3.2.3.2.1 Ethiopatogenéza- životný cyklus

Leishmanióza je prenášaná na človeka prostredníctvom samičky, ktorá saje krv z kože a injikuje infekčné promastigoty v priebehu nasávania krvi z kože.^{72,73} Promastigoty nachádzajúce sa v rane sú pohlcované makrofágmi a transformujú sa do amastigotnej vývojovej formy. V závislosti od druhu leishmanie sa amastigoty množia a postihujú rôzne tkanivá. Následne sa objavujú klinické príznaky.⁷⁴

3.2.3.2.2 Symptómy ochorenia

Leishmanióza môže mať podobu viscerálnu, tiež známu ako kala-azar, podobu kožnú či mukokutánu. Inkubačná doba kožnej formy leishmaniózy môže byť od 2 týždňov až po 4 mesiace. Táto forma je charakterizovaná vredovitými léziami na koži, ktorej liečba nie je veľmi závažná, ale vzniknuté rany sa hoja dlhšiu dobu a môžu po nich zostať jazvy. Závažnou formou je viscerálna forma, ktorá napáda rôzne orgány ako je napríklad slezina, pečeň a kostná

dreň a jej inkubačná doba je zväčša od 10 dní do 2 rokov. Najčastejšími symptómami sú horúčka a strata hmotnosti, ktoré sú spojené so zväčšením veľkosti sleziny a pečene.⁶⁹

3.2.3.2.3 Terapia

Najviac využívanou látkou v liečbe leishmaniózy je polyénové širokospektrálne antibiotikum, lipozomálny amfotericín B. Stále používaným je aj paronomycín (aminosidín), aminoglykozidové antibiotikum, ktoré sa podáva obvykle jedenkrát denne intramuskulárne. Prvými používanými látkami boli zlúčeniny päťmocného antimónu, ktoré sa používajú ešte aj dnes v endemických oblastiach. Týmito látkami sú stiboglukonát sodný a meglumin antimonát.⁷⁵

3.2.3.2.4 Antimalarická a antiprotozoálna aktivita

Štúdium antiplasmodiálnej aktivity je veľmi dôležité, pretože jedným z ochorení spôsobených týmto parazitom je malária, ktorá je závažné parazitárne ochorenie vyskytujúce sa prevažne v oblasti tropického pásma. Jedná sa o ochorenie spôsobené prebiehajúcimi fázami životného cyklu protozoí z rodu *Plasmodium* v hosťujúcom človeku.⁷⁶ Počas posledných rokov sa riziko vzniku tohoto ochorenia zvýšilo z dôvodu zvýšenia rezistencie parazitov voči množstvu antimalarických liečiv, ako je napríklad chlorochín, pyrimetamín, sulfadoxín.⁷⁷

Surový metanolový extrakt, ale aj čisté látky izolované z *G.v.*, ako je napríklad geissolosimín, geissospermín, geissoschizolín, geissoschizón a vellosiminol dokážu *in vitro* pôsobiť inhibične voči bunkám chlorochín senzitívneho kmeňa (D10) rodu *Plasmodium falciparum*.⁶⁷ Štúdie preukázali *in vitro* inhibičnú aktivitu metanolového extraktu s hodnotou $IC_{50} = 2,22 \mu\text{g/ml}$. Spomedzi všetkých alkaloidov sa najväčšou antiplasmodiálnou aktivitou vyznačuje geissolosimín ($IC_{50} = 0,66 \mu\text{M}$), zatiaľ čo aktivita ostatných zlúčenín je nižšia alebo rovnaká. Vellosiminol sa spomedzi týchto alkaloidov považuje za neaktívny s hodnotou $IC_{50} = 157 \mu\text{M}$.⁵⁷ Dva alkaloidy, geissoschizolín a flavopereirín, pôsobia aj voči ďalším dvom kmeňom rodu *Plasmodium falciparum*, chlorochín rezistentnému (K1) a chlorochín senzitívnemu (T9-96). Geissoschizolín preukazuje nízku selektivitu a flavopereirín sa vyznačuje vysokou selektivitou a aj aktivitou k chlorochín senzitívnemu kmeňu (T9-96) $IC_{50} = 1,83 \mu\text{M}$.³⁷ Tieto čisté zlúčeniny boli testované proti chlorochín senzitívnemu kmeňu rodu *Plasmodium falciparum* *in vitro* a preukázali značnú antimalarickú aktivitu, ale je potrebné preukázať *in vivo* antimalarickú aktivitu.⁷⁷

Ďalším ochorením, voči ktorému je *G.v.* aktívne, je parazitárne ochorenie leishmanióza, ktoré je spôsobené prvokmi rodu *Leishmania* a vyskytuje sa najmä v rozvojových a chudobných krajinách, v ktorých má smrteľné následky a spôsobuje časté epidémie.⁷⁸ Pôsobením voči leishmanióze sa vyznačuje β -karbolínový alkaloid, flavopereirín, u ktorého bola zistená vysoká aktivita voči promastigotnej forme *Leishmania amazonensis* s hodnotou $IC_{50} = 0,23 \mu M$. Flavopereirín bol viacej selektívny než v terapii bežne používaný amfotericín B.³⁷

3.2.4 Antinociceptívne, antiflogistické a antiamnesticke pôsobenie

Bolesť a zápal sú najčastejšími symptómami, ktoré sa vyskytujú v medicíne. Antinociceptívnym pôsobením rozumieme pôsobenie, ktoré zabraňuje vzniku a prenosu signálu bolesti.

Viacero testov preukazuje, že extrakt aj frakcia z *G.v.* vykazuje antinociceptívne a protizápalové pôsobenie, ktoré je veľmi podobné pôsobeniu indometacínu, avšak táto aktivita nesúvisí s pôsobením na opioidný systém, ale pôsobí prevažne na periférii.^{9,67} Na periférii sa viaže najmä s ACh, hlavným neurotransmitterom blúdivého nervu. Mechanizmy, ktoré sú pripisované tomuto antinociceptívnemu a antiflogistickému pôsobeniu by mohli súvisieť s anticholinesterázovou aktivitou, ktorá by zosilnila protizápalové účinky cholinérgnej dráhy. U tejto frakcie je prítomná vyššia selektivita k BuChE, ktorá by mohla zvýšiť kognitívne funkcie a ovplyvniť neurologický zápal, čím by bola vhodná aj pre využitie v liečbe AD.⁹

Samotným antinociceptívnym pôsobením sa vyznačuje najmä čistý izolovaný alkaloid 12-methoxy-1-methyl-aspidospermín.⁶⁷ Toto pôsobenie je spôsobené prostredníctvom interacie so serotonínovými receptormi typu 5-HT_{1A}.⁸

Antiamnesticke pôsobenie frakcie *G.v.* bolo testované na myšiach, u ktorých bol skopolamínom vyvolaný pamäťový deficit. U myši sa sledovalo ich správanie a hľadanie ciest v uzavretom priestore. Ani vysoké dávky *G.v.* extraktu nevyvolali značné periférne či centrálné cholinérgne nežiadúce účinky a myši, ktorým bol podaný *G.v.* mali oveľa viac zlepšenú priestorovú pamäť.⁶

4. Experimentálna časť

4.1. Použitý materiál

4.1.1. Rozpúšťadlá

- Acetón (Ac) (Penta a.s.)
- Amoniak (NH₃) (Penta a.s.)
- Cyklohexán (cHex) (Penta a.s.)
- Diethylamín (Et₂NH) (Penta a.s.)
- Diethyléter (Et₂O) (Penta a.s.)
- Ethylacetát (EtOAc) (Penta a.s.)
- Ethanol (EtOH) (Penta a.s.)
- Chloroform (CHCl₃) (Penta a.s.)
- n-Hexán (n-Hex) (Penta a.s.)
- Methanol (MeOH) (Penta a.s.)
- Toluén (To) (Penta a.s.)

4.1.2 Chemikálie

- Kyselina chlorovodíková 5% (HCl) (Penta a.s.)
- Uhličitan sodný (Na₂CO₃) (Penta a.s.)
- Dusičnan bizmutitý [Bi(NO₃)₃] (Penta a.s.)
- Jodid draselný (KCl) (Penta a.s.)
- Kyselina vínna (C₄H₆O₆) (Penta a.s.)

4.1.3 Detekčné činidlá

Dragendorffovo činidlo- zásobný roztok činidla: vznikne zmiešaním roztoku A a roztoku B v pomere 1:1. Roztok A je vzniknutý rozpustením 1,7 g bazického Bi(NO₃)₃ a 20 g C₄H₆O₆ v 80 ml vody. Roztok B je vzniknutý rozpustením 16 g KCl v 40 ml vody.

Dragendorffovo činidlo- detekčné: vzniká pridaním 10 g C₄H₆O₆ a 50 ml vody k 5 ml zásobného roztoku.

Mayerovo činidlo vzniká rozpustením 5 g KI v 30 ml vody a pridaním 1,35 g HgCl₂ za stáleho miešania.

Roztoky sú skladované v chlade pri teplote 4 °C.

4.1.4 Mobilné fázy pre tenkovrstvovú a stĺpcovú chromatografiu

- S1: To : MeOH (0,1 % NH₃) (5 : 0,1)
- S2: cHex : Et₂NH (9 : 1)
- S3: To : Et₂NH (95 : 5)
- S4: To : EtOAc : NH₃ (40 : 60 : 0,3)
- S5: n-Hex : Ac : MeOH : Et₂NH (50 : 35 : 10 : 10)
- S6: cHex : EtOAc : Et₂NH (50 : 50 : 5)
- S7: cHex : To : Et₂NH (50 : 50 : 10)
- S8: To : EtOAc : Et₂NH (70 : 20 : 10)
- S9: To : EtOAc : Et₂NH (60 : 30 : 10)
- S10: To : CHCl₃ : EtOH : Et₂NH (80 : 80 : 30 : 10)

4.1.5 Adsorbenty pre tenkovrstvovú chromatografiu

- Silikagel LS 5/40 UV254; pre preparatívnu TLC
- Kieselgel 60 F254, Merck; hliníková doska s rozmermi 20 x 20 cm s 0,2 mm vrstvou silikagélu

4.1.6 Pomocný materiál

- Kremelina
- Vata

4.1.7 Rastlinný materiál

Kôra *Geissospermum vellosii* Alemão zakúpená od Amazon Herbs Surinam, dodaná 10.10.2018. Dokladná vzorka je uložená na katedre farmaceutickej botaniky pod kódom AL- 674 E. Vzorka bola pre ďalšie skúmanie vybratá na základe vysokej inhibičnej aktivity voči AChE $IC_{50} = 15,19 \pm 0,96 \mu\text{M}$ a BuChE $IC_{50} = 0,37 \pm 0,049 \mu\text{M}$.

4.2 Prístroje

- Vákuová odparka Büchi Rotavapor R- 114 (Büchi Labortechnik AG, Švajčiarsko) 45

- Ultrazvukový vodný kúpeľ Sonorex Super 10P (Bandelin, Nemecko)
- Plynový chromatograf s hmotnostným detektorom Agilent Technologies 7890 A GC 5975 inert MSD (Agilent Technologies Santa Clara, USA)
- Polarimeter P3000 (A.Krüss Optronic, Germany)
- NMR Varian Iniova 500 (Varian, USA)

4.3 Použité metódy

4.3.1 Destilácia

Všetky rozpúšťadlá, ktoré boli pri práci použité, boli najprv prečistené destiláciou. Tieto rozpúšťadlá boli následne uchovávané vo fľašiach s tmavým sklom, chránené pred svetlom.

4.3.2 Odparovanie

Rozpúšťadlá zo získaných frakcií boli odparované pomocou vákuovej odparky za zníženého tlaku vo vodnom kúpeli pri teplote 40 °C. Menšie objemy, ktoré boli v ampulkách, boli odparené pomocou vodného kúpeľa pri teplote 60-80 °C za urýchlenia prúdom vzduchu.

4.3.3 Sušenie a skladovanie

Sušenie získaných frakcií prebiehalo vo vákuovom exsíkátore nad silikagélom po dobu minimálne 24 hodín a po vysušení boli uchovávané v chladničke pri teplote do 8 °C.

4.3.4 Príprava liatych dosiek pre preparatívnu tenkovrstvovú chromatografiu

Pre preparatívnu TLC boli používané sklenené dosky s rozmermi 150 x 150 mm, ktoré musia byť pred každým použitím očistené a odmastené chloroformom. Na tieto dosky bola naliata rovnomerná vrstva suspenzie, ktorá vznikla zmiešaním 6,5 g silikagélu a 20,5 ml vody. Dosky sa následne nechali uschnúť po dobu minimálne 24 hodín.

4.3.5 Preparatívna tenkovrstvová chromatografia

Alkaloidný extrakt bol rozpustený v zmesi CHCl_3 : EtOH (1 : 1) a v tenkej rovnomernej vrstve bol nanosený na vopred pripravené sklenené dosky, prípadne hliníkové dosky. Po odparení rozpúšťadla boli dosky vyvíjané v uzatvorených komorách, nasýtených parami mobilnej fázy.

Pre nasýtenie komory mobilnou fázou, bolo potrebných aspoň 20 minút. Chromatogramy boli detekované pod UV lampou pri vlnovej dĺžke 254 nm a 366 nm. Jednotlivé zóny na doskách boli označené preparatívnou ihlou a následne vyškrašané. Pri použití viacerých dosiek boli rovnaké zóny spojené dokopy. Získané zóny boli zmiešané približne rovnakým dielom kremeliny a v kolóne boli eluované zmesou CHCl_3 a EtOH.

4.3.5.1 Detekcia alkaloidov

Pre detekciu prítomnosti alkaloidov bolo použité Dragendorffovo činidlo, ktorým bola postriekaná doska. Pri prítomnosti alkaloidov toto činidlo reaguje za vzniku oranžového až oranžovočerveného zafarbenia

4.3.6 Stĺpcová chromatografia

Kolóna pre stĺpcovú chromatografiu bola pripravená naliatím suspenzie silikagélu v mobilnej fáze. Alkaloidný extrakt bol nanesený na kolónu v podobe rozteru. Extrakt bol rozpustený v potrebnom množstve CHCl_3 a zmiešaný s adsorbentom.

4.4 Izolácia alkaloidov

4.4.1 Príprava sumárneho alkaloidného extraktu

Dodaná vysušená kôra o hmotnosti 43 kg bola rozomletá na kusy veľkosti do 5 mm a extrahovaná 95% EtOH za varu po dobu 30 minút v pomere droga : rozpúšťadlo (1 : 4). Následne bol extrakt sfiltrovaný a odparený pri zníženej teplote. Po tejto prvej extrakcii vzniklo približne 5 kg primárneho extraktu, ktorý sa vyznačoval tmavo hnedou farbou a viskóznou konzistenciou.

Ďalším krokom extrakcie bolo získavanie terciárnych bází. K primárnemu extraktu bolo pridaných asi 500 ml 95% EtOH, v ktorom bol extrakt rozpustený a následne bol prevedený do destilačnej banky. Po pridaní 1,5 l vody a zahriatí na 60 °C prebehlo oddestilovanie prítomného EtOH. Ku zbytku po destilácii bolo za poriadneho premiešania pridaných asi 5 l horúcej destilovanej vody (80 °C) a následne 5% HCl v takom množstve, aby výsledné pH filtrátu bolo 1,3-1,5. Výsledný roztok bol doplnený destilovanou vodou asi na 15 l a počas noci sa nechal sedimentovať. Po sedimentácii bol roztok opatrne dekantovaný a bol prefiltrovaný cez neutrálnu kremelinu. Zbytok bol premytý malým množstvom vody, pričom vo výsledku bolo získaných asi 17,5 l primárneho extraktu.

Následne bolo prevedené vytrepávanie alkaloidov, ktorému predchádzalo zriedenie filtrátu destilovanou vodou v pomere 1 : 1. Každý liter tohoto roztoku bol zalkalizovaný 200 ml 10% Na_2CO_3 v Erlenmayerovej banke. Do banky bolo pridaných 500 ml CHCl_3 , v ktorej bolo prevedené prvé trepanie. Roztok bol nakoniec prefiltrovaný do trepačky cez vliselin. Vytrepávanie terciárnych bází bolo prevedené celkom 5x a chloroformový výtrepok bol odparený. Výsledná hmotnosť výtrepku terciárnych bází zo 43 kg drogy bola 1530 g tmavo hnedého veľmi viskózneho odparku. Takto získané terciárne báze boli následne čistené vytrepávaním CHCl_3 a Et_2O . Odparok terciárnych bází bol rozpustený v CHCl_3 a bol rozdelený do 6 baniek po 255 g. Každá banka s 255 g odparku bola zahriata na vodnom kúpeli pri $70\text{ }^\circ\text{C}$ až do stekutenia, po ktorom bolo pridaných 200 ml 5% HCl . Po dôkladnom premiešaní bolo pridaných 300 ml vody a opätovne dôkladne premiešané. Zo vzniknutej suspenzie bol po vychladnutí kyslý hnedý roztok, ktorý bol zliaty a predchádzajúci postup bol znovu zopakovaný, ale na konci bola navyše prevedená sonikácia po dobu asi 5 minút. Všetky nerozpustené zbytky z jednotlivých baniek boli nakoniec spojené a bolo pridaných 500 ml 5% HCl . Zmes bola dôkladne pretrepaná so 600 ml vody, zahriata na $70\text{ }^\circ\text{C}$, sonikovaná a vodná vrstva bola opäť zliata. Spojené kyslé roztoky alkaloidov boli zriedené vodou a po vychladnutí bol tento roztok prefiltrovaný. Celkovo bolo získaných 12,5 l hnedého, kyslého roztoku alkaloidov.

Získané množstvo roztoku bolo po 1 litri vytrepávané v deliacom lieviku. K 1 l roztoku bolo pridaných 230 ml 10% Na_2CO_3 , 600 ml Et_2O a potom už len 4x 300 ml Et_2O . Éterová vrstva sa dobre oddeľovala a pritom bola vylučovaná hnedošedá zrazenina. Éterové vrstvy boli zliate a rozpúšťadlo oddestilované za vzniku svetlo žltého, medovitého, veľmi viskózneho odparku. Z primárneho alkaloidného éterového výtrepku o hmotnosti 1230 g sme získali 50,4 g. Zbytky vodného roztoku reagovali veľmi silno na prítomnosť alkaloidov za použitia Mayerovho činidla. Tento vodný roztok bol 1 x vytrepaný 500 ml CHCl_3 a 5 x 350 ml CHCl_3 . Jednotlivé chloroformové výtrepky boli spojené a odparené za vzniku šedo-hnedého nafúknutého odparku. Týmto ďalším vytrepaním bolo v konečnom dôsledku z 1230 g primárneho alkaloidného chloroformového extraktu celkovo získaných 53,8 g bazického extraktu vo forme terciárnych bází. Získané terciárne báze boli následne prevádzané na kvartérne báze vo forme jodidov. Extrakt bol po vytrepaní terciárnych bází prefiltrovaný cez vliselin (25 l). 1200 ml tohto roztoku bolo opatrne zneutralizovaného pomocou HCl v 2 litrovej banke v pomere 2 : 1 až pokiaľ roztok počas miešania nepení (na pH 3), následne bolo po častiach a za stáleho miešania pridaných 19,5 g roztoku KI v 30 ml vody. Došlo k vylúčeniu slabo bielej zrazeniny. Vzniknutá suspenzia bola ponechaná stáť asi 15 minút za občasného premiešania. Do banky

bolo pridaných 300 ml CHCl_3 a jej obsah bol pretrepaný. Zrazenina sa následne rozpustila a roztok vyčíril. Vzniknutá tekutina bola vliata do trepačky cez vliselin a znovu bola dôkladne pretrepaná. Vytrepánie chloroformom za týchto podmienok bolo prevedené celkom 3x. Chloroformový výtrepok bol odparený a vodný zbytok sa ďalej neuchovával. Celkovo bolo získaných 75,6 g žltého, nafúknutého odparku kvartérnych jodidov. Všetky extrakty boli uskladnené v mrazničke a ďalej sa pracovalo iba s éterovým alkaloidným extraktom.

4.4.2 Stĺpcová chromatografia

Získaný éterový výtrepok bol podrobený stĺpcovej chromatografii, vďaka ktorej sme získali jednotlivé frakcie. Z jednotlivých frakcií boli následne izolované čisté alkaloidy.

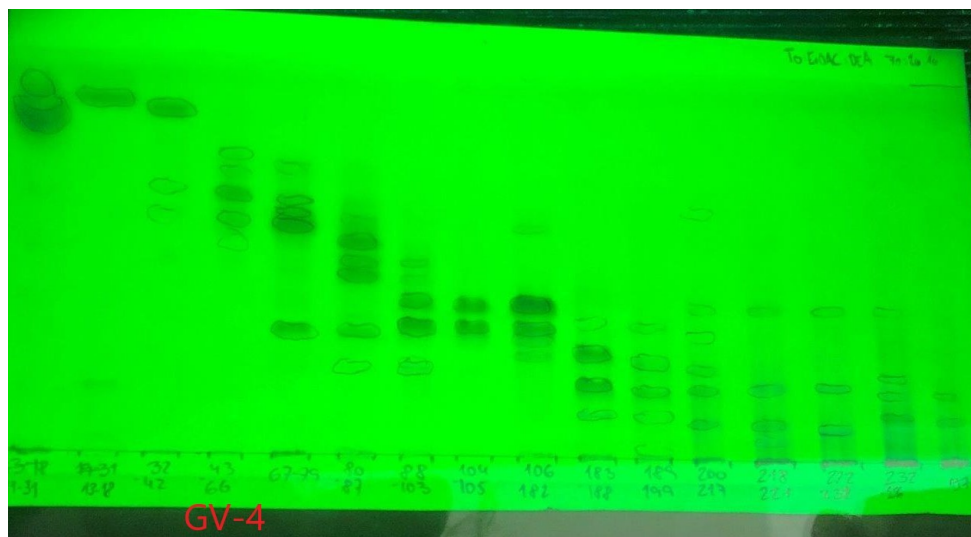
Hmotnosť odparku	50,4 g
Adsorbent na rozter	200 g
Adsorbent Al_2O_3	2,05 kg
Deliaca vrstva v stĺpci	7,2 : 50 cm
Mŕtvy objem	1600 ml
Objem frakcie	250 ml
Doba toku	20 min
Kontrolný TLC Silica gél 60 F254	S7: cHex : To : Et_2NH 50 : 50 : 10 S8: To : EtOAc : Et_2NH 70 : 20 : 10 S9: To : EtOAc : Et_2NH 60 : 30 : 10 S10: To : CHCl_3 : EtOH : Et_2NH 80 : 80 : 30 : 10

Tabuľka 2 Podmienky stĺpcovej chromatografie

Z kolóny boli po 15-20 minútovom odkapávaní získavané jednotlivé frakcie. Celkový počet získaných frakcií bol 272 a u každej bola kontrolovaná prítomnosť alkaloidov pomocou kontrolných TLC. Frakcie s podobným obsahom alkaloidov boli následne spojené. Takto spojených a získaných frakcií bolo 16, z ktorých bola následne urobená súhrnná TLC, zobrazené pod UV lampou a prítomnosť alkaloidov bola detekovaná Dragendorffovým činidlom.

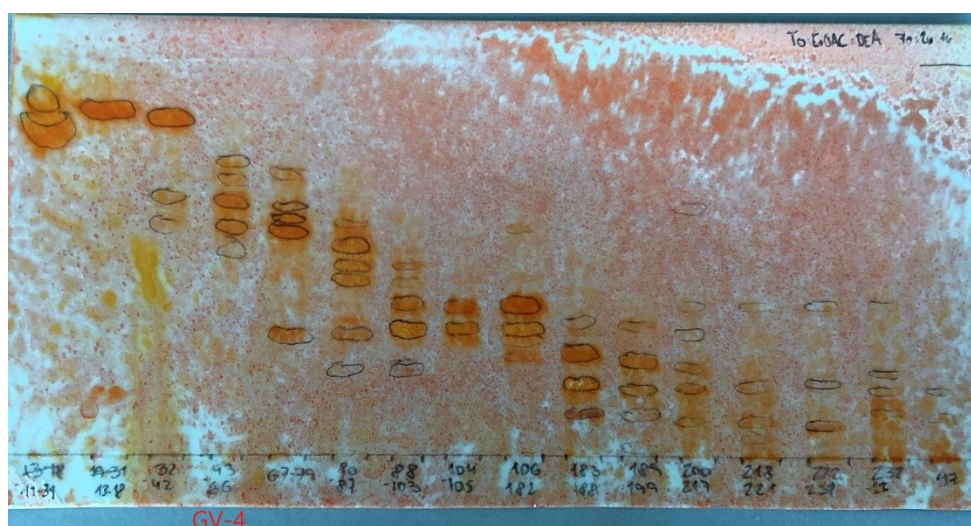
Názov frakcie	Číslo frakcie	Elučný systém	Hmotnosť odparku [g]
GV-1	13-18	CHCl ₃ : Benzín 1 : 1	0,0793
GV-2	19-27	CHCl ₃ : Benzín 1 : 1	0,0977
	28-31	CHCl ₃ : Benzín 52 : 48	
GV-3	32-36	CHCl ₃ : Benzín 52 : 48	1,3746
	37-42	CHCl ₃ : Benzín 55 : 45	
GV-4	43-56	CHCl ₃ : Benzín 55 : 45	5,1969
	57-66	CHCl ₃ : Benzín 60 : 40	
GV-5	67-72	CHCl ₃ : Benzín 60 : 40	0,7862
	73-79	CHCl ₃ : Benzín 65 : 35	
GV-6	80-87	CHCl ₃ : Benzín 65 : 35	1,5764
GV-7	88	CHCl ₃ : Benzín 65 : 35	8,2681
	89-103	CHCl ₃ : Benzín 70 : 30	
GV-8	104-105	CHCl ₃ : Benzín 75 : 25	1,0337
GV-9	106-119	CHCl ₃ : Benzín 75 : 25	17,964
	120-131	CHCl ₃ : Benzín 80 : 20	
	132-149	CHCl ₃ : Benzín 85 : 15	
	150-156	CHCl ₃ : Benzín 90 : 10	
	157-171	CHCl ₃ : Benzín 95 : 5	
	172-182	CHCl ₃ 100	
GV-10	183-188	CHCl ₃ : EtOH 99 : 1	1,2305
GV-11	189-199	CHCl ₃ : EtOH 99 : 1	3,0227
GV-12	200-214	CHCl ₃ : EtOH 99 : 1	2,2376
	215-2017	CHCl ₃ : EtOH 97 : 3	
GV-13	218-221	CHCl ₃ : EtOH 95 : 5	0,3827
GV-14	222-231	CHCl ₃ : EtOH 95 : 5	1,3326
GV-15	232-233	CHCl ₃ : EtOH 95 : 5	2,8556
	234-250	CHCl ₃ : EtOH 9 : 1	
	251-256	CHCl ₃ : EtOH 85 : 15	
GV-16	257-264	CHCl ₃ : EtOH 80 : 20	0,536
	257-272	CHCl ₃ : EtOH 50 : 50	
Celkom			47,9746

Tabuľka 3 Alkaloidné frakcie získané zo stĺpcovej chromatografie



Obrázok 9 Súhrnné TLC pod UV lampou

Frakcia GV-4 vzniknutá spojením frakcie číslo 43-66.



Obrázok 10 Súhrnné TLC detekované Dragendorffovým činidlom

4.4.3 Spracovanie frakcie GV-4

Frakcia GV-4 o hmotnosti 5,2 g bola následne rozpustená v chloroforme a nanosená na liate dosky. Dosky boli vyvíjané v komorách nasýtených mobilnou fázou S6. Pomocou preparatívnej TLC bola táto frakcia ešte ďalej separovaná a zóny s rovnakým Rf boli z jednotlivých dosiek vyškrabané, spojené a následne eluované. Elúcia prebehla pridaním kremeliny k získanej podfrakcii v pomere 1:1 a následným premytím zmesou ethanol a chloroform (1 : 1) cez vatú. Z frakcie GV-4 bolo získaných 5 podfrakcií GV-4-a až GV-4-e.

4.4.3.1 Separácia alkaloidov z podfrakcie GV-4-B

Podfrakcia GV-4-B bola následne spracovaná pomocou preparatívnej TLC liatymi doskami, ktoré boli 2x vyvíjané v komore nasýtenej sústavou S2. Po vyvinutí boli dosky vysušené a zobrazené pod UV lampou, kde boli vyznačené a zoškrabané jednotlivé zóny alkaloidov. Zóny s rovnakým Rf boli následne spojené a eluované. Táto podfrakcia bola ďalej rozdelená na podfrakcie GV-4-B-1 až GV-4-B-8. Pre získanie čistej látky bola spracovaná podfrakcia GV-4-B-2, u ktorej bola prevedená preparatívna TLC, vyvíjaná v nasýtenej komore vo fáze S1. Následne bola vykonaná separácia na zóny, elúcia a po odparení rozpúšťadla a rekryštalizácii bola získaná látka v čistej podobe, GV-4-B-2-D, o hmotnosti 20 mg, u ktorej bola následne vykonaná štruktúrna analýza a testy biologickej aktivity. Bola získaná látka vo forme bielych kryštálov.

4.5 Testovanie inhibičnej aktivity GV-4-B-2-D voči cholínesterázam

4.5.1 Chemikálie

- Acetyltiocholín jodid p.a. (ATChI) (Sigma-Aldrich, Praha)
- Butyryltiocholín jodid p.a. (BuTChI) (Sigma-Aldrich, Praha)
- Dihydrogenfosforečnan draselný bezvodý p.a. (KH_2PO_4) (Lach-Ner, Neratovice)
- Dihydrogenfosforečnan sodný dihydrát p.a. ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (Ing.Švec- Penta, Praha)
- 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoová kyselina $\geq 98\%$ (DTNB) (Sigma-Aldrich, Praha)
- Dimethylsulfoxid p.a. (DMSO) (Sigma-Aldrich, Nemecko)
- Hydrogenfosforečnan disodný bezvodý p.a. (NaH_2PO_4) (Ing. Švec- Penta, Praha)
- Chlorid sodný p.a. (NaCl) (Lachema, Brno)
- 100mM fosfátový pufor pH 7,4
- Rekombinantná AChE (Univerzita Hradec Králové)
- Rekombinantná BuChE (Univerzita Hradec Králové)

4.5.2 Činidlá

Roztok 5 mM DTNB: bol pripravený rozpustením DTNB v 100 mM fosfátovom pufrí pH 7,4 za vzniku 5 mM roztoku DTNB. Vzniknutý roztok bol slabo nažltnutý.

Roztok 10 mM ATChI: bol pripravený rozpustením požadovaného množstva látky vo vode, za vzniku roztoku o koncentrácii 10 mM. Vzniknutý roztok bol číry.

Roztok 10 mM BuTChI: bol pripravený rozpustením požadovaného množstva látky vo vode, za vzniku roztoku o koncentrácii 10 mM. Vzniknutý roztok bol číry.

Všetky pripravené činidlá boli uchovávané maximálne týždeň v chladničke pri teplote 4 °C.

4.5.3 Prístroje

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

4.5.4 Podmienky merania

Meranie bolo prevedené pri teplote 37 °C v prostredí fosfátového pufru pH 7,4. Spektrofotometrické stanovenie farebných produktov bolo prevedené pri vlnovej dĺžke 412 nm.

4.5.5 Použité rekombinantné enzýmy

Enzýmy boli pripravované rekombinantnou technológiou na Katedre chémie, Prírodovedeckej fakulty, Univerzity Hradec Králové. Pre ich prípravu bolo použité médium obsahujúce enzýmy, ktoré bolo včas potreby nariadené 100mM fosfátovým pufrom pH 7,4 tak, aby hodnota absorbcie bola pre AChE 0,08 - 0,15 a pre BuChE 0,15 - 0,20. Použitý fosfátový pufor bol pripravený zmiešaním 57 ml roztoku A, 243 ml roztoku B a 300 ml vody. Zásobný roztok A je 200mM roztok NaH₂PO₄ (1 liter roztoku obsahuje 24,0 g NaH₂PO₄). Zásobný roztok B je 200mM roztok NaH₂PO₄ (1 liter roztoku obsahuje 28,4 g NaH₂PO₄). Médium bolo napipetované podľa potreby do Eppendorfových skúmaviiek, zamrazené a uchované v mrazničke pri teplote pri -22 °C do doby použitia.

4.5.6 Stanovenie cholínesterázovej inhibičnej aktivity izolovaných alkaloidov

Pre stanovenie hodnoty IC₅₀ bola použitá Ellmanova spektrofotometrická metóda s použitím DTNB. Počas stanovenia bol sledovaný nárast absorbcie za 1 minútu. Hodnoty IC₅₀ sa vypočítajú zo získaných hodnôt poklesu aktivity AChE alebo BuChE metódou nelineárnej regresie v programe GraphPaD Prism (verzia pre Windows, výrobca GraphPaD Software, San Diego, CA, USA). Výsledky bývajú porovnávané s hodnotami IC₅₀ známych inhibítorov cholínesteráz- galantamínom a berberínom.

Percentá inhibície (% I) boli vypočítané podľa vzorca:

$$\% I = 100 - \left(100 \times \frac{\Delta ABL}{\Delta ASA} \right)$$

% I- percento inhibície

Δ ABL- pokles absorbancie slepého vzorku počas 1 minúty

Δ ASA- absorbancia testovaného vzorku počas 1 minúty

Stanovenie aktivity enzýmov bolo prevedené tak, že do 6 jamiek mikrotitračnej doštičky bolo napipetovaných 8,3 μ l média a pridaných 283 μ l 5mM DTNB a 8,3 μ l DMSO. Následne došlo k premiešaniu po dobu 1 minúty na mikrotrepačke a následne bola zmes 5 minút inkubovaná v komore prístroja pri teplote 37 °C. Po inkubácii bolo pridaných 33,3 μ l roztoku substrátu a bola premeraná absorbancia.

Pre stanovenie inhibičnej aktivity skúšaných látok bolo do 6 jamiek mikrotiračnej doštičky napipetovaných 8,3 μ l média a pridaných 283 μ l 5mM DTNB a 8,3 μ l skúšanej látky o príslušnej koncentrácii. Do poslednej rady mikrotitračnej doštičky bolo napipetované DMSO, ktoré slúžilo ako slepá vzorka. Najprv bolo prevedené screeningové meranie všetkých látok pri koncentrácii 4 mM. Látky, ktoré vykazovali pri tejto koncentrácii inhibičný potenciál vyšší než 50 %, bola stanovená IC_{50} . Získané inhibičné aktivity IC_{50} humánnej AChE a IC_{50} humánnej BuChE pre jednotlivé látky sú porovnávané s inhibičnými aktivitami referenčných látok – galantamínom a berberínom.

4.6 Testovanie inhibičnej aktivity získaných alkaloidov voči GSK- 3 β

V rámci programu Erasmus+ som sa spolupodieľala na testovaní inhibičnej aktivity doposiaľ izolovaných čistých alkaloidov GV-1-a, GV-8-3-B a GV-9-c voči GSK-3 β a tiež na meraní priechodnosti našich látok cez HEB. Meranie bolo prevedené na pôde University of Bologna, Department for Life Quality Studies, Rimini Campus pod vedením prof. Vincenzi Andrisano.

4.6.1 Chemikálie

- Dimethylsulfoxid p.a. (DMSO) (Sigma-Aldrich)
- Adenozín 5-trifosfát (ATP) (Sigma-Aldrich)
- GSM substrát (Merck Millipore, Darmstadt, Nemecko)
- Humánna rekombinantná GSK-3 β (Merck Millipore, Darmstadt, Nemecko)
- SB 415286 (Sigma-Aldrich)
- súprava činidiel Kinase-Glo Kit (Promega Biotech Iberica, S.L., Madrid, Španielsko)
- Pufor pH 7,4 zložený z :

15 mM Octan horečnatý (Sigma-Aldrich)

1 mM Kyselina etyléndiamíntetraoctová (EDTA) (Sigma-Aldrich)

1 mM Tetrasodná soľ etylén glykol-bis(-aminoetyléter)-*N,N,N',N'*-tetraoctovej kyseliny (EGTA) (Sigma-Aldrich)

50 mM 2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]etánsulfonová kyselina (HEPES) (Sigma-Aldrich)

4.6.2 Prístroje

- Multireader Victor X3

4.6.3 Stanovenie inhibičnej aktivity voči GSK-3 β

Stanovenie bolo prevedené podľa luminiscenčnej metódy Baki et al., využívajúcej súpravu činidiel Kinase-Glo systém. 1 mg každej testovanej látky bol rozpustený v 1 mL DMSO a bol zriedený pomocou DMSO na koncentráciu 1 mM a následne bol zriedený pufrom pre GSK pH 7,4 na požadovanú koncentráciu. Pre stanovenie boli používané biele 96 jamkové doštičky. Do každej jamky bolo napipetovaných 10 μ l testovanej látky, 10 μ l ATP, 10 μ l 100 μ M substrátu GSM, 10 μ l enzýmu GSK-3 β . Pre pozitívnu a negatívnu kontrolu bol namiesto testovanej látky použitý pufor alebo pozitívny štandard SB 415286. Doštička bola inkubovaná pri podmienkach 30 minút a 30°C. Priebeh enzymatickej reakcie bol zastavený pridaním 40 μ l Kinase-Glo. Po desiatich minútach bola zmeraná luminiscencia. Výsledná aktivita bola úmerná rozdielu celkovej a spotrebovanej ATP. Výsledná inhibičná aktivita bola vypočítaná na základe maximálnej aktivity zmeranej za neprítomnosti inhibítora a maximálna inhibícia bola zmeraná v prítomnosti referenčnej látky. Hodnota IC₅₀ bola vypočítaná za využitia programu GraphPad Prism. Získané hodnoty inhibičnej aktivity skúšaných látok boli porovnané s IC₅₀ štandardu SB-415286 (IC₅₀ = 70,00 nM).

4.7 Testovanie permeability hematoencefalickej bariéry pre izolované alkaloidy

4.7.1 Chemikálie

- Dimethylsulfoxid p.a.(DMSO) (Sigma-Aldrich)
- Referenčné zlúčeniny: atenolol, norfloxacin, kofeín, imipramín a testosterón
- Pufor PBS (Phosphate Buffered Saline) pH 7,4
- PBL (Porcine pollar brain lipid) v dodekáne 20 mg/ml

4.7.2 Prístroje

- Spektrofotometer JAS.CO V-630 BIO

4.7.3 Testovanie priechodnosti cez hematoencefalickú bariéru

Pred testovaním priechodnosti našich látok, bolo 3x prevedené testovanie referenčných zlúčenín. 1 mg každej referenčnej zlúčeniny bol rozpustený v 250 µl DMSO a zriedený v PBS pH 7,4 na požadovanú koncentráciu 500 µM. Pred plnením doštičiek boli zmerané ich spektrá UV spektrofotometrom. Pre samotné testovanie boli používané dve 96 jamkové doštičky. Vrchná, donorová doštička obsahovala mikrofilter a na jej povrch boli napipetované 4 µl PBL v dodekáne. Po nanesení lipidovej vrstvy bola doštička 5 minút inkubovaná pri teplote 70 °C a následne 5 minút pri izbovej teplote. Takto pripravená doštička bola následne zasunutá do spodnej, akceptorovej doštičky, plnenej len 200 µl PBS s obsahom 5 % DMSO a bola naplnená 200 µl referenčnej látky. Pre každú testovanú aj referenčnú látku boli zoskupené 3 jamky. Takto pripravený systém bol inkubovaný 18 hodín pri 37 °C za konštantného miešania 50 rpm. Po inkubácii boli doštičky oddelené a boli zmerané UV spektrá.

Experimentálne získané dáta každého štandardu, boli vypočítané podľa nasledovného vzorca:

$$Pe = \frac{VD \cdot VR}{(VD + VR) S \cdot t} \ln \left[\frac{100 \cdot VD}{100 \cdot VD - \%T (VD + VR)} \right]$$

$$\%T = 100 \times \frac{A_R \cdot v_R}{A_{Do} \cdot v_D}$$

V_D a V_R - objemy donorových a akceptorových roztokov v každej jamke (0,20 cm³)

S - plocha povrchu lipidovej membrány (0,266 cm²)

t - čas inkubácie vyjadrený v sekundách

A_R - absorbanca v akceptorovej časti po experimente

A_{D_0} - počiatočná absorbanca v donorovej časti

% T- percentuálna transmitancia

Príslušným vzorcom bola vypočítaná získaná permeabilita. Experimentálne získané dáta boli porovnané s dátami získanými z literatúry a bola vytvorená korelačná krivka, z ktorej bolo vypočítané rozmedzie pre priechodnosť testovaných nepoznaných látok. Následne bol postup opakovaný v presnom poradí aj s testovanými látkami.

4.8 Štruktúrna analýza

4.8.1 NMR analýza

^1H -NMR a ^{13}C -NMR spektrá boli merané doc.PharmDr.Jiřím Kunešom PhD., na prístroji Varian Iniova 500. Pri meraní ^1H spektra bola použitá inverzná 5mm ID PGF sonda pri pracovnej frekvencii 499,9 MHz. Pre meranie ^{13}C spektra bola použitá 5mm SW širokopásmová sonda pri pracovnej frekvencii 125,7 MHz. Meranie bolo prevedené pri teplote 25 °C v deuteriochloroforme.

4.8.2 GC-MS analýza

Analýza GV-4-B-2-D bola prevedená pomocou plynového chromatografu Agilent 7890A GC 5975 s hmotnostným detektorom pri elektrónovej ionizácii 70 eV a pri teplotnom cykle 100 - 180 °C (7 minút), 180 °C (1 minúta) a 180 -300 °C (24 minút). Bola použitá kolóna Hp-5 MS (30 m × 0,25 mm × 0,25 μm, Agilent Technologies, USA). Ako nosný plyn bolo použité hélium s prietokovou rýchlosťou 1 ml/min. Nástrek vzorku bol prevedený pri teplote 180 °C a objem bol 1 μl metanolickeho roztoku (zriedený 1 : 10). Identifikácia alkaloidov bola prevedená porovnaním ich spektier so spektrami dostupnými v komerčnej knižnici NIST 11 (National Institute of Standards and Technology Library USA), s dátami dostupnými v odbornej literatúre a so štandardami látok, ktoré už boli izolované na našom pracovisku.

4.8.3 Optická otáčavosť

Optická otáčavosť bola zistená polarimetrom P3000 pri teplote 27 °C, v prostredí chloroformu.

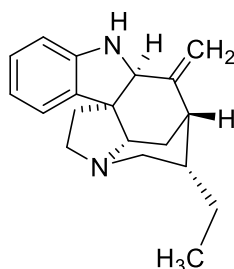
5. Výsledky

5.1 GV-4-B-2-D – Anhydropereirín

5.1.1 Určenie štruktúry anhydropereirínu (GV-4-B-2-D)

Vzorec: C₁₉H₂₄N₂

Molekulová hmotnosť: 280,42



Obrázok 11 Štruktúrny vzorec Anhydropereirínu

5.1.2 NMR analýza

¹H NMR (500MHz, CDCl₃) 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).

¹³C NMR (125MHz, CDCl₃) 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

5.1.3 GC-MS analýza

EI-MS (*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).

5.1.4 Optická otáčavosť

[α]_D²⁷ = (-) 36 ° (c = 0,1 g/100ml, CHCl₃)

5.2. Inhibičná aktivita voči AChE, BuChE, GSK-3 β a prestupnosť cez hematoencefalickú bariéru

Okrem anhydropereirínu boli vykonané testy aj u ostatných vybraných látok izolovaných z *G.v.*

Látka	Enzým			
	AChE (% inhibícia) (100 μ M)	BuChE (% inhibícia) (100 μ M)	GSK-3 β (% inhibícia) (50 μ M)	GSK-3 β (IC ₅₀ μ M)
GV-4-B-2-D (Anhydropereirín)	0	44,30 \pm 2,75	-	-
GV-1-a (Quebrachamín)	-	-	87,81 \pm 11,03	-
GV-8-3-B (Vellosimín)	-	-	100,00	7,18 \pm 1,12
GV-9-c (Geissoschizolín)	-	-	82,66 \pm 6,04	-
Štandard	Enzým			
	AChE (IC ₅₀ μ M)	BuChE (IC ₅₀ μ M)	GSK-3 β (% inhibícia)	GSK-3 β (IC ₅₀ μ M)
Galanthamín ¹	1,710 \pm 0,065	42,301 \pm 0,065	-	-
Berberín ¹	0,705 \pm 0,104	30,721 \pm 3,492	-	-
SB- 415 286 ²	-	-	-	70 nM

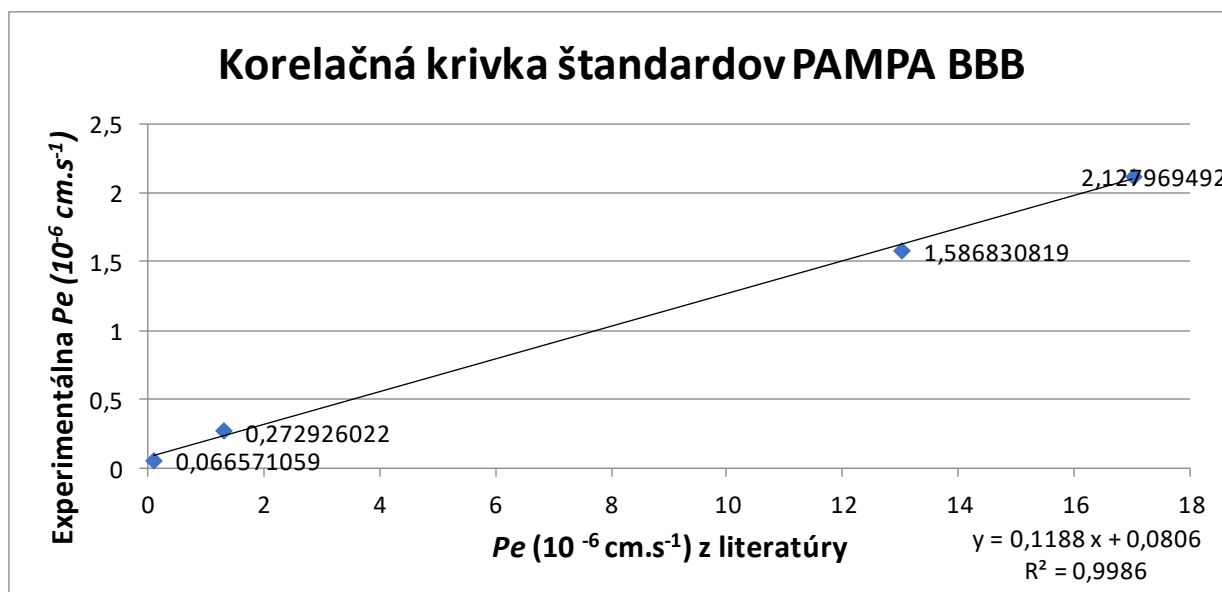
Tabuľka 4 Výsledky merania inhibičnej aktivity

¹Galanthamín a Berberín- štandardy pre AChE a BuChE

² SB- 415 286- štandard pre GSK-3 β

Štandard	Klasifikácia prestupnosti podľa literatúry	Pe z literatúry ($10^{-6} \text{ cm.s}^{-1}$)	Exp. Pe ($10^{-6} \text{ cm.s}^{-1}$)	PAMPA BBB prestupnosť
Atenolol	CNS-	0,8	-	CNS-
Norfloxacín	CNS-	0,1	0,066571059	CNS-
Kofeín	CNS±	1,3	0,272926022	CNS±
Imipramín	CNS+	13	1,586830819	CNS+
Testosterón	CNS+	17	2,127969492	CNS+
Látka				
GV-1-a (50 μM)	-	-	1,100466	CNS+
GV-8-3-B (50 μM)	-	-	0,531871	CNS±
GV-9-c (50 μM)	-	-	0,66023	CNS+

Tabuľka 5 Výsledky stanovenia priechodnosti cez HEB



Obrázok 12 Korelačná krivka pre porovnanie údajov získaných experimentálne a z literatúry

Táto krivka preukazuje, že experimentálne získané hodnoty štandardov zľava (norfloxacín, kofeín, imipramín, testosterón) sú porovnateľné s hodnotami z literatúry ($R^2 = 0,9986$). Po dosadení čísla $x=2$ a 4 do rovnice získanej z tejto krivky, bol získaný rozsah ($0,316 <y> 0,552$) priechodnosti cez HEB.

6. Diskusia a záver

Aj napriek tomu, že strom *Geissospermum vellosii* Alemão patriaci do čeľade Apocynaceae je len z časti preskúmaný, obsah alkaloidov v ňom obsiahnutých je vysoký a mnohé štúdie poukazujú na jeho značnú cytotoxickú, anticholinesterázovú a antiprotozoálnu biologickú aktivitu.

Súčasťou experimentálnej časti mojej diplomovej práce bolo spracovať kôru *Geissospermum vellosii* Alemão a cieľom bolo následne z jeho alkaloidného extraktu a jeho éterového výtrečku vyizolovať alkaloid v čistej podobe. Extrakt bol pomocou stĺpcovej chromatografie rozdelený na jednotlivé frakcie, ktoré boli ešte ďalej delené pomocou preparatívnej TLC. Alkaloid v čistej podobe bol pomocou štruktúrnej analýzy za využitia metód NMR, GC-MS analýzy a optickej otáčavosti identifikovaný ako indolový alkaloid anhydropereirín. Konkrétne môžeme anhydropereirín zaradiť do skupiny monoterpenoidných indolových alkaloidov s akuamicínovým skeletom.

Anhydropereirín bol podrobený testom na biologickú aktivitu voči cholinesterázam, AChE a BuChE. Voči AChE anhydropereirín nepreukázal žiadnu inhibičnú aktivitu a voči BuChE bola percentuálna inhibícia $\% I = 44,30 \pm 2,75 \%$, čo nepredstavuje veľmi vysokú aktivitu.

Ďalšie izolované alkaloidy GV-1-a, GV-8-3-B, GV-9-c boli otestované na inhibičnú aktivitu voči GSK-3 β a bola otestovaná ich priechodnosť cez HEB. Nakoľko výsledky ostatných inhibičných aktivít týchto látok neboli súčasťou tejto diplomovej práce, zaoberáme sa práve iba ich aktivitou voči GSK-3 β a priechodnosťou cez HEB. Všetky tieto látky vykazovali vysoké percento inhibície voči GSK-3 β až nad 80% a u najlepšej z nich, GV-8-3-B (% inhibícia = 100,00 %), bola zameraná IC₅₀ s výsledkom $7,18 \pm 1,12 \mu\text{M}$, ktorá signalizuje vysokú inhibičnú aktivitu. Referenčnou zlúčeninou pre porovnanie inhibície GSK-3 β bol použitý štandard SB- 415 286 s IC₅₀ = 70 nM. Pre testovanie priechodnosti cez HEB boli ako referenčné zlúčeniny použité atenolol a norfloxacin, ktoré cez HEB neprechádzajú. Ďalším použitým štandardom bol kofeín, ktorý bol na rozmedzí prechodnosti a imipramín s testosterónom, ktoré HEB prestupujú. Všetky tri alkaloidy ukázali miernu permeabilitu cez HEB pričom hodnota u GV-1-a sa javí ako najlepšia. Výsledky tohto testu boli porovnané aj s vypočítanými hodnotami logBB daných látok, z ktorých sme vedeli pred stanovením priepustnosti predvídať, že tieto látky neprestupujú membránou veľmi ľahko, nakoľko ich logBB je menší ako 0,3, ale zároveň väčší ako -1. Znamená to, že je prítomná mierna prestupnosť cez HEB.

Zo získaných výsledkov vyplýva, že percentuálna inhibícia čistého izolovaného alkaloidu, anhydropereirínu, bola významná iba voči BuChE. Nakoľko jeho percentuálna inhibícia nie je príliš výrazná ($44,30 \pm 2,75$ %) a jeho hodnota neprevyšuje 50 %, zmeranie IC_{50} voči AChE a BuChE nie je v budúcnosti plánované. U ostatných izolovaných zlúčenín by v budúcnosti mohla byť zmeraná ich IC_{50} voči GSK-3 β z dôvodu ich vysokej percentuálnej inhibície (GV-1-a= $87,81 \pm 11,03$ %, GV-9-c= $82,66 \pm 6,04$ %), pretože u GV-8-3-B s najvyšším % inhibície sa preukázala veľmi vysoká inhibičná aktivita. Dané látky by mohli byť potenciálne využité ako molekuly pre liečbu AD a v prípade anhydropereirínu by mohlo ísť o štruktúru použiteľnú pre prípravu viacej účinných derivátov.

7. Abstrakt

Eliška Emrichová: Izolácia alkaloidov *Geissospermum vellosii* Alemão a štúdium ich biologickej aktivity IV. Diplomová práca 2020. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra farmakognózie

Kľúčové slová: *Geissospermum vellosii*, kôra, alkaloidné extrakty, izolácia alkaloidov, GC/MS analýza, biologická aktivita, acetylcholinesteráza, butyrylcholinesteráza.

Hlavným cieľom tejto práce bolo izolovať z extraktu z kôry *Geissospermum vellosii* Alemão aspoň jeden alkaloid v čistej forme. Celý proces zahŕňal spracovanie kôry, získanie sumárneho a alkaloidného extraktu a následnú stĺpcovú chromatografiu. GV-4, jedna zo 16 získaných frakcií, bola rozdelená na ďalších 5 podfrakcií. GV-4b podfrakcia bola využitá pre izoláciu čistých alkaloidov, spracovaná preparatívnou TLC a kryštalizáciou čistej látky. Štruktúra čistej látky bola stanovená pomocou NMR, GC-MS analýzy a optickej otáčavosti. Látka bola identifikovaná ako anhydropereirín a bola podrobená testovaniu inhibičnej aktivity voči ľudským cholinesterázam, AChE a BuChE.

U alkaloidov GV-1-a, GV-8-3-B, GV-9-c, ktoré boli izolované v rámci ďalších prác na extrakte, bola testovaná ich inhibičná aktivita voči GSK-3 β a permeabilita HEB s využitím testu PAMPA BBB. Tieto zlúčeniny boli identifikované ako quebrachamín, zmes diastereomérov- vellosimín a geissoschizolín. GSK-3 β inhibičná aktivita bola stanovená využitím *in vitro* luminiscenčnej metódy podľa Bakiho et al. (2007). Najlepšiu % inhibíciu vykazovalo GV-8-3-B, u ktorého bola následne zmeraná jeho IC₅₀=7.18 \pm 1.12 μ M. Testovanie permeability HEB voči našim látkam bolo prevedené použitím referenčných a testovaných látok, u ktorých boli zmerané UV spektrá použitím UV spektrofotometra. Najlepšia prestupnosť bola zistená u GV-1-a, ktorý je spomedzi ostatných schopný prestupovať HEB mierne dobre.

Testovaním inhibičnej aktivity anhydropereirínu voči AChE a BuChE bola preukázaná veľmi nízka aktivita voči týmto enzýmom. U ostatných alkaloidov bola preukázaná zaujímavá percentuálna inhibícia a inhibičná aktivita voči GSK-3 β a bolo preukázané, že GV-1-a, GV-9-c sú schopné prestupovať HEB mierne a GV-8-3-B môže prestupovať HEB horšie alebo veľmi málo než predchádzajúce zlúčeniny.

8. Abstract

Eliška Emrichová: Isolation of alkaloids of the species *Geissospermum vellosii* Allemão and study of their biological activity IV. Diploma thesis 2020. Charles University, faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Department of Pharmacognosy.

Key words: *Geissospermum vellosii*, bark, alkaloidal extracts, isolation of alkaloids, GC/MS analysis, biological activity, acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase.

The aim of this study was to isolate at least one pure alkaloid from the extract of *Geissospermum vellosii* Alemão bark. The whole process involved bark processing, to obtain summary and alkaloid extract and subsequent column chromatography. GV-4, one of the 16 obtained fractions, was separated into 5 subfractions. The GV-4b subfraction was used to isolate pure alkaloids, processed by preparative thin layer chromatography and crystallization of pure compound. The structure of pure compound was determined by using NMR, GC-MS analysis and optical rotation. This compound was identified as anhydropereirine and was tested its inhibitory activity against human cholinesterases, AChE and BuChE.

The alkaloids GV-1-a, GV-8-3-B, GV-9-c were isolated in the course of further work on the extract. Their inhibitory activity against GSK-3 β was tested as well as their possibility to cross the blood-brain-barieer with PAMPA BBB assay. Those compounds were identified as quebrachamine, mixture of diastereomeres- vellosimine and geissoschizolline. GSK-3 β inhibitory activity was determined by using the in vitro luminescence method of Baki et al. (2007). The best % of inhibition showed GV-8-3-B and was tested its IC₅₀ with result IC₅₀ = 7.18 \pm 1.12 μ M. Testing the possibility of our compounds to cross BBB was provided by using reference and tested compounds. The results were determined by recording of UV spectra by UV spectrophotometer. The best permeability was shown in GV-1-a, which can cross the BBB slightly.

Inhibitory activity of anhydropereirine against AChE, BuChE was very low. Other tested alkaloids showed interesting % of inhibition and inhibitory activity against GSK-3 β and showed, that GV-1-a, GV-9-c can cross the BBB slightly and GV-8-3-B can cross the BBB less than previous compounds.

9. Použitá literatura

- ¹Petrovska B.B.: Historical review of medicinal plants' usage. *Pharmacognosy reviews* 6(11), 1 (2012).
- ²Thirumurugan D., Cholarajan A., Raja S.S., Vijayakumar R.: An Introductory Chapter: Secondary Metabolites, *Secondary Metabolites - Sources and Applications*, 1-21 (2018).
- ³Kishimoto S., Sato M., Tsunematsu Y., Watanabe K. Evaluation of biosynthetic pathway and engineered biosynthesis of alkaloids. *Molecules* 21(8), 1078 (2016).
- ⁴Hanson R. J.: *Natural products: The secondary metabolites*. The Royal Society of Chemistry, Cambridge 2003.
- ⁵<https://tropilab.com/bergibita.html> (**stiahnuté 17.10.2019**)
- ⁶Lima J.A., et al.: Geissospermum vellosii stem bark: anticholinesterase activity and improvement of scopolamine-induced memory deficits. *Pharmacology biochemistry and behavior* 92 (3), 508-513 (2009).
- ⁷Dong R, Chen P, Chen Q.: Extract of the medicinal plant Pao Pereira inhibits pancreatic cancer stem-like cell in vitro and in vivo. *Integrative cancer therapies* 17(4), 1204–1215 (2018).
- ⁸Werner J.A., et al.: Evidence for a role of 5-HT1A receptor on antinociceptive action from Geissospermum vellosii. *Journal of ethnopharmacology* 125(1), 163-169 (2009).
- ⁹Lima J.A., Costa T.W., Silva L.L., Miranda A.L.P., Pinto A.C.: Antinociceptive and anti-inflammatory effects of a Geissospermum vellosii stem bark fraction. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 88(1), 237-248 (2016).
- ¹⁰Bhadane B.S., Patil M.P., Maheshwari V.L., Patil R.H.: Ethnopharmacology, phytochemistry, and biotechnological advances of family Apocynaceae: A review. *Phytotherapy research*. 32(7),(2018).
- ¹¹Jahodář, L.: *Farmakobotanika: semenné rostliny*. Karolinum, Praha 2009.
- ¹²<https://www.adc.sk/databazy/produkty/spc/vincristin-liquid-richter-1-mg-439822.html> (**stiahnuté 12.10.2019**)
- ¹³Chagas C.M., Alisaraie M.: Metabolites of Vinca Alkaloid Vinblastine: Tubulin Binding and Activation of Nausea-Associated Receptors. *ACS Omega* 4(6), 9784-9799 (2019).
- ¹⁴Han J., Qu Q., Qiao J., Zhang J.: Vincamine alleviates amyloid- β 25–35 peptides-induced cytotoxicity in PC12 cells. *Pharmacognosy magazine*, 13(49), 123 (2017).
- ¹⁵Lobay D.: Rauwolfia in the treatment of hypertension. *Integrative Medicine: A Clinician's Journal (Encinitas)* 14(3), 40 (2015).
- ¹⁶<http://www.biotox.cz/naturstoff/biologie/bi-2d-29-tojkle.html> (**stiahnuté 7.1.2020**)

- ¹⁷[https://www.prota4u.org/database/protav8.asp?g=pe&p=Catharanthus+roseus+\(L.\)+G.Don](https://www.prota4u.org/database/protav8.asp?g=pe&p=Catharanthus+roseus+(L.)+G.Don) **(stiahnuté 7.1.2020)**
- ¹⁸<http://snaturou2000.sk/rastliny/zimozelen-mensia> **(stiahnuté 7.1.2020)**
- ¹⁹<https://pfaf.org/user/Plant.aspx?LatinName=Rauvolfia+serpentina> **(stiahnuté 7.1.2020)**
- ²⁰<https://www.faim.org/ouabain-natures-perfect-but-forgotten-remedy-for-heart-disease> **(stiahnuté 7.1.2020)**
- ²¹<https://www.gbif.org/en/species/3616313> **(stiahnuté 12.10.2019)**
- ²²Fox Ramos A.E., Alcover C., Evanno L., Maciuk A., Litaudon M., Duplais C., Grellier P.: Revisiting previously investigated plants: A molecular networking-based study of *Geissospermum laeve*. *Journal of natural products* 80(4), 1007-1014 (2017).
- ²³Sajkowska-Kozielewicz J. J., Kozielewicz P., Barnes N.M., Wawer I., Paradowska, K.: Antioxidant, cytotoxic, and antiproliferative activities and total polyphenol contents of the extracts of *Geissospermum reticulatum* bark. *Oxidative medicine and cellular longevity* (2016).
- ²⁴www.plantsystematics.org/imgs/shimizu/r/Apocynaceae_Geissospermum_laeve_45020.html **(stiahnuté 18.2.2020)**
- ²⁵<https://bonsainatal.blogspot.com/2016/04/pau-pereira-geissospermum-laeve.html> **(stiahnuté 18.2.2020)**
- ²⁶Buckingham J., Baggaley K.H., Roberts A.D., Szabó L.F.: *Dictionary of Alkaloids*. Taylor & Francis Group, New York 2010.
- ²⁷Seigler D.S.: *Plant secondary metabolism*. Springer, New York, 628, 2001.
- ²⁸Dewick M.P.: *Medicinal natural products: a biosynthetic approach*. John Wiley & Sons, Chichester 2002.
- ²⁹Gordillo-Román B., Reina M., Ruiz-Mesia L., Ruiz Mesia W., Joseph-Nathan P.: Absolute configuration of indoline alkaloids from *Geissospermum reticulatum*. *Tetrahedron Letters* 54(13), 1693-1696 (2013).
- ³⁰Steele J.C.P., Veitch N.C., Kite G.C., Simmonds M.S., Warhurst D.C.: Indole and β -Carboline Alkaloids from *Geissospermum sericeum*. *Journal of natural products* 65(1), 85-88 (2002).
- ³¹Reina, M., Ruiz-Mesia W., López-Rodríguez M., Ruiz-Mesia L., González-Coloma A., Martínez-Díaz R.: Indole alkaloids from *Geissospermum reticulatum*. *Journal of natural products* 75(5), 928-934 (2012).
- ³²Firn R.: *Nature's chemicals: the natural products that shaped our world*. Oxford University Press on Demand, 2010.
- ³³Abdallah I.I., Quax W.J.: A Glimpse into the Biosynthesis of Terpenoids. *KnE Life Sciences* 81-98 (2017).

- ³⁴[https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Organic_Chemistry/Map%3A_Organic_Chemistry_\(McMurry\)/27%3A_Biomolecules_-_Lipids/27.06%3A_Terpenoids](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Organic_Chemistry/Map%3A_Organic_Chemistry_(McMurry)/27%3A_Biomolecules_-_Lipids/27.06%3A_Terpenoids) (**stiahnuté 19.2.2020**)
- ³⁵Tsai F.S., Lin, L.W., Wu, C.R.: Lupeol and its role in chronic diseases. *Drug Discovery from Mother Nature* 145–175 (2016).
- ³⁶Saleem M.: Lupeol, a novel anti-inflammatory and anti-cancer dietary triterpene. *Cancer letters* 285(2), 109-115 (2009).
- ³⁷Silva J.V et al.: Flavopereirine- An alkaloid derived from *geissospermum vellosii*- Presents leishmanicidal activity in vitro. *Molecules* 24(4), 785 (2019).
- ³⁸<https://lpi.oregonstate.edu> (**stiahnuté 19.2.2020**)
- ³⁹Spilková J., Martin J., Siatka T., Tůmová L., Kašparová M.: *Farmakognozie*. Karolinum, Praha 2016.
- ⁴⁰Suzuki S., Umezawa T.: Biosynthesis of lignans and norlignans. *Journal of Wood Science* 53(4), 273-284 (2007).
- ⁴¹Majdalawieh A.F., Massri M., Nasrallah G.K.: A comprehensive review on the anti-cancer properties and mechanisms of action of sesamin, a lignan in sesame seeds (*Sesamum indicum*). *European journal of pharmacology* 815, 512-521 (2017).
- ⁴²Panche A.N., Diwan A.D., Chandra S.R.: Flavonoids: an overview. *Journal of nutritional science* 5 (2016).
- ⁴³Roy P.S., Saikia B.J.: Cancer and cure: A critical analysis. *Indian journal of cancer* 53(3), 441-2 (2016).
- ⁴⁴https://www.cdc.gov/cancer/colorectal/basic_info/risk_factors.htm (**stiahnuté 26.3.2020**)
- ⁴⁵Daniyal, Muhammad, et al.: Epidemiology, etiology, diagnosis and treatment of prostate cancer. *Asian Pac J Cancer Prev* 15(22), 9575-8 (2014).
- ⁴⁶Goral V.: Pancreatic cancer: Pathogenesis and diagnosis. *Asian Pac J Cancer Prev* 16(14), 5619-24 (2015).
- ⁴⁷Sun Y.S., Zhao Z., Yang Z.N., Xu F., Lu H.J., Zhu Z.Y., Zhu H.P.: Risk factors and preventions of breast cancer. *International journal of biological sciences* 13(11), 1387 (2017).
- ⁴⁸<https://www.cancer.gov/about-cancer/causes-prevention/genetics> (**stiahnuté 28.2.2020**)
- ⁴⁹<https://www.cancer.org/cancer/colon-rectal-cancer/about/what-is-colorectal-cancer.html> (**stiahnuté 28.2.2020**)
- ⁵⁰Grozescu T., Popa F.: Prostate cancer between prognosis and adequate/proper therapy. *Journal of medicine and life* 10(1), 5 (2017).

- ⁵¹Akram M., Iqbal M., Daniyal M., Khan A.U.: Awareness and current knowledge of breast cancer. *Biological research* 50(1), 33 (2017).
- ⁵²https://www.emedicinehealth.com/cancer_symptoms/article_em.htm#what_should_i_know_about_cancer(**stiahnuté 28.2.2020**)
- ⁵³Subotic S., Wyler S., Bachmann A.: Surgical treatment of localised renal cancer. *European Urology Supplements*. 11 (3), 60-65 (2012).
- ⁵⁴http://www.sukl.cz/modules/medication/atc_tree.php?current=L01#L01(**stiahnuté 2.3.2020**)
- ⁵⁵Li J.M., Huang Y.C., Kuo Y.H., Cheng C.C., Kuan F.C., Chang S.F., Shi C.S.: Flavopereirine suppresses the growth of colorectal cancer cells through p53 signaling dependence. *Cancers* 11(7), 1034 (2019).
- ⁵⁶Bemis D.L., Capodice J. L., Desai M., Katz A.E., Buttyan R.: β -Carboline alkaloid- enriched extract from the Amazonian rain forest tree pao Pereira suppresses prostate cancer cells. *Journal of the Society for Integrative Oncology*, 7(2), 59 (2009).
- ⁵⁷Vital M.J.S., Carneiro A.L.B., et al: Chemical composition, ethnopharmacology and biological activity of *Geissospermum Allemão* species (Apocynaceae Juss.). *Revista Fitos*, 8(2), 137-146 (2013).
- ⁵⁸Yeh H.T., Tsai Y.S., Chen M.S., Li Y.Z., Lin W.C., Lee Y.R., Sheu S.M.: Flavopereirine induces cell cycle arrest and apoptosis via the AKT/p38 MAPK/ERK1/2 signaling pathway in human breast cancer cells. *European journal of pharmacology* 863, 172658 (2019).
- ⁵⁹Yu J., Chen Q.: The plant extract of Pao pereira potentiates carboplatin effects against ovarian cancer. *Pharmaceutical biology* 52(1), 36-43 (2014).
- ⁶⁰Vinogradov S., Wei X.: Cancer stem cells and drug resistance: the potential of nanomedicine. *Nanomedicine* 7(4), 597-615 (2012).
- ⁶¹Jiráček R.: Farmakoterapie Alzheimerovy choroby. *Praktické lékařství* 5(4), 176-178 (2009).
- ⁶²Weller J., Budson A.: Current understanding of Alzheimer's disease diagnosis and treatment. *F1000Research* 7 (2018).
- ⁶³Araújo J.Q., Lima J.A., da Cunha Pinto A., De Alencastro R.B., Albuquerque M.G.: Docking of the alkaloid geissospermine into acetylcholinesterase: a natural scaffold targeting the treatment of Alzheimer's disease. *Journal of molecular modeling* 17(6), 1401-1412 (2011).
- ⁶⁴Tiwari S., Atluri V., Kaushik A., Yndart A., Nair M.: Alzheimer's disease: pathogenesis, diagnostics, and therapeutics. *International Journal of Nanomedicine* 14, 5541 (2019).
- ⁶⁵Apostolova L.G.: Alzheimer disease. *Continuum: Lifelong Learning in Neurology* 22(2 Dementia), 419 (2016).

- ⁶⁶Pohanka M.: Cholinesterases, a target of pharmacology and toxicology. *Biomedical Papers of the Medical Faculty of Palacky University in Olomouc* 155(3) (2011).
- ⁶⁷Dey A., Mukherjee A., Chaudhury M.: Alkaloids from apocynaceae: origin, pharmacotherapeutic properties, and structure-activity studies. *Studies in Natural Products Chemistry*. Vol. 52. Elsevier, 373-488 (2017).
- ⁶⁸Miller L.H., Good M.F., Milon G.: Malaria pathogenesis. *Science* 264(5167), 1878-1883 (1994).
- ⁶⁹<https://www.who.int/malaria/en/>(**stiahnuté 24.2.2020**)
- ⁷⁰Lüllmann H., Mohr K., Hein L.: *Barevný atlas farmakologie*. Grada Publishing as, Praha 2007.
- ⁷¹White N., Breman J.: Malaria. In: Harrison's principles of internal medicine. New York: McGraw-Hill, 1688–1705 (2012).
- ⁷²Singh S., Sivakumar R.: Challenges and new discoveries in the treatment of leishmaniasis. *Journal of infection and chemotherapy* 10(6), 307–315 (2004).
- ⁷³Sundar S., Jha T.K., Sindermann H., Junge K., Bachmann P., Berman J.: Oral miltefosine treatment in children with mild to moderate Indian visceral leishmaniasis. *The Pediatric infectious disease journal* 22(5), 434–438 (2003).
- ⁷⁴Sindermann H, Croft S.L., Engel K.R., Bommer W., Eibl H.J., Unger C., Engel J.: Miltefosine (Impavido): the first oral treatment against leishmaniasis. *Medical microbiology and immunology* 193(4), 173–180 (2004).
- ⁷⁵Rosenthal E., Marty P.: Recent understanding in the treatment of visceral leishmaniasis. *Journal of postgraduate medicine* 49(1), 61–68 (2003).
- ⁷⁶<https://www.klinickafarmakologie.cz/pdfs/far/2018/02/04.pdf>
- ⁷⁷Mbeunkui F., Grace M.H., Lategan C., Smith P.J., Raskin I., Lila M.A.: In vitro antiplasmodial activity of indole alkaloids from the stem bark of *Geissospermum vellosii*. *Journal of ethnopharmacology* 139(2), 471-477 (2012).
- ⁷⁸<http://www.stopleishmania.org/leishmaniosis.php> (**stiahnuté 10.2.2020**)