

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

---

## DIPLOMOVÁ PRÁCE

**Biologická aktivita sekundárních metabolitů rostlin V. Alkaloidy**

***Vinca minor* L.**

**Biological activity of secondary plants metabolites V. Alkaloids of**

***Vinca minor* L.**

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

Vedoucí diplomové práce: Prof. RNDr. Lubomír Opletal, CSc.

Hradec Králové, 2016

Lukáš Bouz

## PROHLÁŠENÍ

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

V Hradci Králové, 2016

Podpis

## PODĚKOVÁNÍ

Děkuji vedoucímu diplomové práce prof. RNDr. Lubomíru Opletalovi, CSc. za pomoc při vypracování diplomové práce, za rady a materiály, které mi poskytl při psaní práce a také za stanovení anticholinesterasových aktivit izolovaných alkaloidů. Ing. Miroslavu Ločárkovi děkuji za změření GC/MS spekter izolovaných látek a doc. PharmDr. Jiřímu Kunešovi, CSc. z katedry anorganické a organické chemie za změření a interpretaci NMR spekter. Zároveň chci poděkovat celému kolektivu Katedry farmaceutické botaniky a ekologie za vstřícnost a příjemné pracovní prostředí. Nakonec děkuji své rodině za podporu během celého studia.

# OBSAH

1	Úvod .....	9
2	Cíl práce .....	11
3	Teoretická část.....	12
3.1	Alzheimerova nemoc .....	12
3.1.1	Klinický obraz .....	12
3.1.2	Patofyziologie.....	13
3.1.2.1	Tvorba $\beta$ -amyloidu .....	14
3.1.2.2	Tvorba neurofibrilárních klubek.....	14
3.1.2.3	Změny v metabolismu acetylcholinu.....	14
3.1.2.4	Poruchy glukózového metabolismu .....	15
3.1.2.5	Mitochondriální dysfunkce.....	16
3.1.2.6	Oxidační stres .....	16
3.1.2.7	Nedostatek neurotrofních faktorů .....	16
3.1.2.8	Prolyloligopeptidasa .....	16
3.1.3	Diagnostika.....	17
3.1.4	Terapie .....	17
3.1.4.1	Současná léčba .....	17
3.1.4.1.1	Inhibitory cholinesteras.....	18
3.1.4.1.2	Antagonisté NMDA receptorů.....	19
3.1.4.2	Antioxidanty a zametače ROS a RNS .....	20
3.1.4.3	Látky podporující metabolismus CNS.....	21
3.1.4.4	Antiamyloidní terapie a nové terapeutické přístupy .....	21
3.1.5	Butyrylcholinesterasa.....	22
3.1.5.1	Funkce BChE v těle .....	22
3.1.5.1.1	Metabolismus léčiv a exogenních látek .....	22
3.1.5.2	Význam BChE v patogenezi Alzheimerovy nemoci .....	22
3.1.5.3	Inhibitory BChE.....	23
3.2	<i>Vinca minor</i> L. (Apocynaceae).....	25
3.2.1	Botanická charakteristika.....	26
3.2.2	Rozšíření.....	26

3.2.3	Použití v lidové medicíně .....	27
3.2.4	Obsahové látky rodu <i>Vinca</i> L. a jejich biologická aktivita .....	27
3.2.4.1	Biologické účinky druhů rodu <i>Vinca</i> L. ....	29
3.2.4.2	<i>Vinca minor</i> L. ....	30
4	Experimentální část .....	36
4.1	Všeobecné postupy.....	36
4.1.1	Příprava rozpouštědel .....	36
4.1.2	Sloupcová chromatografie .....	36
4.1.3	Příprava desek pro preparativní TLC.....	36
4.1.4	Detekce alkaloidů na chromatografických deskách .....	36
4.1.5	Odpařování rozpouštědel z extraktů .....	36
4.1.6	Uchovávání vzorků .....	37
4.2	Potřeby a chemikálie pro izolaci látek .....	37
4.2.1	Rozpouštědla.....	37
4.2.2	Chemikálie a pomocné látky .....	37
4.2.3	Detekční činidla.....	37
4.2.4	Vyvíjecí soustavy pro TLC .....	38
4.2.5	Chromatografické adsorbenty .....	38
4.2.6	Použité přístroje .....	38
4.3	Postup pro stanovení cholinesterasové aktivity .....	38
4.3.1	Chemikálie.....	38
4.3.2	Pufry.....	39
4.3.3	Biologický materiál.....	39
4.4	Izolace alkaloidů.....	40
4.4.1	Rostlinný materiál pro izolaci.....	40
4.4.2	Extrakce drogy a další zpracování extraktu .....	40
4.4.2.1	Příprava sumárního extraktu a chloroformového výtřepku (CHCl <sub>3</sub> -A) .....	40
4.4.2.2	Příprava předčištěného chloroformového výtřepku CHCl <sub>3</sub> -A .....	40
4.4.2.3	Sloupcová chromatografie předčištěného výtřepku CHCl <sub>3</sub> -A .....	42
4.4.3	Sloupcová chromatografie spojených frakcí 147 – 214.....	43
4.4.4	Zpracování frakce 28-34.....	45
4.5	Obecné podmínky pro identifikaci izolovaných látek .....	48

4.5.1	Stanovení teploty tání.....	48
4.5.2	Měření optické otáčivosti .....	48
4.5.3	Měření hmotnostního spektra.....	48
4.5.4	Nukleární magnetická rezonance .....	49
4.6	Stanovení cholinesterasové inhibiční aktivity (IC <sub>50</sub> ) .....	49
5	Výsledky.....	50
5.1	Identifikace izolovaných látek.....	50
5.1.1	Struktura izolované látky LB-2 .....	50
5.1.1.1	MS analýza.....	50
5.1.1.2	<sup>1</sup> H-NMR analýza.....	51
5.1.1.3	<sup>13</sup> C-NMR analýza.....	51
5.1.2	Struktura izolované látky LB-3 .....	51
5.1.2.1	MS analýza.....	52
5.1.2.2	<sup>1</sup> H-NMR analýza.....	52
5.1.2.3	<sup>13</sup> C-NMR analýza.....	52
5.2	Stanovení inhibiční aktivity vůči AChE a BChE .....	53
6	Diskuse.....	54
7	Seznam literatury .....	56
8	Abstrakt .....	65
9	Abstract .....	66

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AN	Alzheimerova nemoc
A $\beta$	$\beta$ -amyloid
APP	amyloidový prekurzorový protein
ACh	acetylcholin
AChE	acetylcholinesterasa
ATP	adenosintrifosfát
AGEs	koncové produkty pokročilé glykace
BChE	butyrylcholinesterasa
CNS	centrální nervový systém
CDK5	cyklindependentní kinasa 5
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EBM	medicína založená na důkazech (evidence based medicine)
GSK-3 $\beta$	glykogensynthasa kinasa-3 $\beta$
GC/MS	plynová chromatografie/hmotnostní spektrometrie
HSV	herpes simplex virus
ChAT	cholinacetyltransferasa
IChe	inhibitory cholinesteras
Iso-OMPA	tetraisopropyl pyrofosforamid
KFBE	Katedra farmaceutické botaniky a ekologie
KVS	kardiovaskulární systém
MAO-A	monoaminoxidasa A
MAO-B	monoaminoxidasa B
NFTs	neurofibrilární klubka (neurofibrillary tangles)
NGF	nervový růstový faktor
NMR	spektroskopie nukleární magnetické rezonance
NMDA	<i>N</i> -methyl-D-aspartát
POP	prolylloleptidasa
RAGEs	receptory pro koncové produkty pokročilé glykace
RNA	ribonukleová kyselina

ROS	reaktivní formy kyslíku
RNS	reaktivní formy dusíku
sAPP $\alpha$	extracelulární protein vzniklý po štěpení APP $\alpha$ -sekretasou
sAPP $\beta$	extracelulární protein vzniklý po štěpení APP $\beta$ -sekretasou
SPECT	jednofotonová emisní počítačová tomografie
TLC	tenkovrstvá chromatografie
VD	vaskulární demence



# 1 ÚVOD

Světová populace stárne, pokroky ve zdravotní péči v minulém století přispěly lidem k prodloužení a zkvalitnění jejich životů. Nicméně tento trend také přinesl vyšší počet pacientů s chronickými nemocemi včetně demencí. Přestože demence postihuje především starší lidi, není přirozenou součástí stárnutí. Demence je syndrom, většinou chronické nebo progresivní povahy, způsobený onemocněním mozku různého původu<sup>1</sup>. Dle zprávy z roku 2015 se odhaduje, že na světě žije 46,8 milionu lidí s demencí a každým rokem přibude přes 9,9 milionu nových případů<sup>2</sup>. Nejčastější formou demence je Alzheimerova nemoc. Dále sem řadíme vaskulární demence (v důsledku iktu), demence s Lewyho tělísky a skupinu nemocí řazených do frontotemporálních demencí<sup>1</sup>.

V současnosti dostupná terapie zahrnuje léčbu symptomů a pomáhá tak oddálit těžší stádia nemoci. K dispozici jsou inhibitory cholinesteras (donepezil, rivastigmin a galanthamin) nebo memantin pro pacienty ve středním a těžkém stádiu AD, který je nekompetitivním antagonistou glutamátových N-methyl-D-aspartátových (NMDA) receptorů<sup>3</sup>.

Při hledání nových léčiv s komplexním působením proti rozvoji AN se pozornost věnuje mimo jiné sekundárním metabolitům léčivých rostlin. V poslední době stoupá zájem o enzym butyrylcholinesterasu (BChE) v souvislosti s AN a o možný přínos inhibitorů BChE na progresi nemoci<sup>4, 5</sup>. Na farmaceutické fakultě v Hradci Králové se studiu účinku rostlinných metabolitů na patofyziologické procesy ovlivňující rozvoj AN věnuje výzkumná skupina ADINACO z katedry farmaceutické botaniky a ekologie.

Rostlina *Vinca minor* L. neboli barvínek menší patří do čeledi Apocynaceae. Tato čeleď čítá přes 2000 rostlinných druhů převážně z tropů, z nichž se některé druhy používají v tradiční medicíně proti gastrointestinálním potížím, horečce, malárii, bolesti nebo při léčbě diabetu. Typické obsahové látky této čeledi jsou indolové alkaloidy. Nejvýznamnější jsou vinblastin a vinkristin z druhu *Catharanthus roseus* L., které se používají jako antineoplastika<sup>6, 7</sup>.

Z druhu *V. minor* bylo izolováno přes 50 indolových alkaloidů. Nejvýznamnější z nich je vinkamin. Vinkamin má hlavně vasodilatační a neuroprotektivní účinky<sup>8</sup>. V praxi se užívá jeho semisyntetický derivát vinpocetin jako nootropikum a antioxidant<sup>9</sup>.

Testování inhibiční aktivity sumárního alkaloidového extraktu z *V. minor* na lidské cholinesterasy ukázalo slibné výsledky. Zajímavá byla zejména inhibiční aktivita vůči BChE<sup>10</sup>. Klinický význam inhibice enzymu BChE při AN spočívá v několika aspektech. BChE dokáže při nedostatečné aktivitě acetylcholinesterasy (AChE) tento enzym zastoupit a snižuje tak nadále hladinu acetylcholinu v CNS, podílí se také na tvorbě deposit A $\beta$ . Inhibicí BChE lze tedy docílit zvýšení hladin acetylcholinu v CNS bez nežádoucích periferních a centrálních cholinergních účinků. Hledání selektivních inhibitorů BChE pro klinické použití dozajista pomůže lépe pochopit funkci tohoto enzymu při AN a může také přinést nové terapeutické možnosti<sup>5</sup>.

## 2 CÍL PRÁCE

Cílem mé práce bylo:

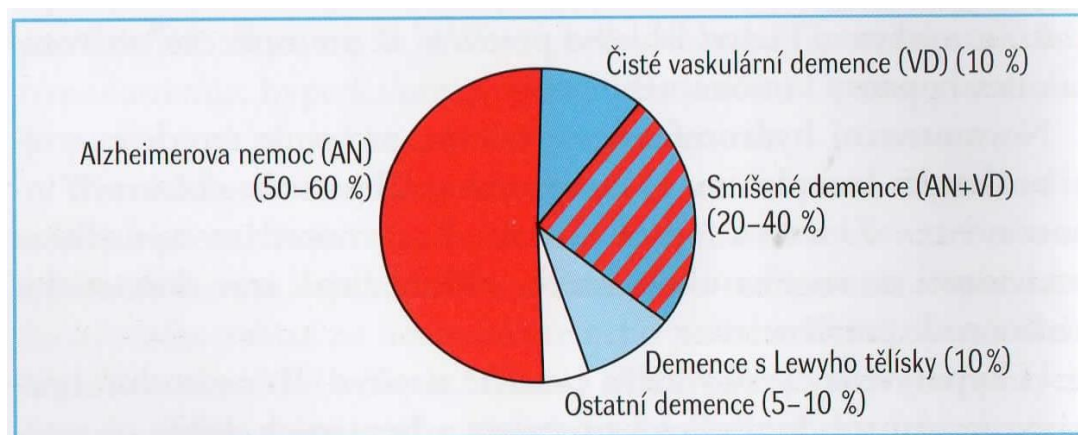
- izolace alespoň jedné látky v čistém stavu z vybrané frakce získané ze sumárního alkaloidního extraktu z nati *Vinca minor* L. za použití chromatografických metod,
- podíl na určení struktury izolovaných alkaloidů pomocí GC/MS analýzy,
- stanovení biologické aktivity izolovaných alkaloidů na lidskou acetylcholinesterasu a butyrylcholinesterasu.

## 3 TEORETICKÁ ČÁST

### 3.1 Alzheimerova nemoc

Alzheimerova nemoc (AN) se řadí mezi atroficko-degenerativní onemocnění mozku a celkově tvoří přibližně 60 % všech demencí (obr. 1). Jedná se o primární onemocnění šedé kůry mozku projevující se charakteristickým úbytkem kognitivních funkcí, postižena je zejména paměť nemocného. Průměrná délka nemoci je 9 let<sup>11</sup>.

V roce 1906 nemoc poprvé popsal u starší pacientky německý psychiatr Alois Alzheimer<sup>12</sup>. Odhaduje se, že v České Republice žije přes 152 000 lidí s demencí, celosvětově pak 46,8 milionu<sup>13, 2</sup>. Významným rizikovým faktorem pro výskyt AN je vysoký věk, u lidí nad 65 let dochází každých 5 let ke zdvojnásobení rizika výskytu demence<sup>11</sup>. Ženy mají přitom 3x vyšší riziko onemocnění než muži<sup>12</sup>. Dalšími faktory mohou být rodinná predispozice, genové mutace, přítomnost alely pro apolipoprotein  $\epsilon 4$  nebo poranění hlavy, kouření či vaskulární onemocnění<sup>12, 11, 14</sup>.



Obrázek 1: Přibližné rozložení všech typů demence<sup>15</sup>

#### 3.1.1 Klinický obraz

Onemocnění je zpočátku pomalé a nenápadné, má však progresivní charakter s celkovým postižením kognitivních funkcí, narušením aktivit běžného života a s příznaky behaviorálních a psychologických změn<sup>14</sup>. Prvními symptomy mohou být drobné změny osobnosti, chování a zvyků. Vyskytuje se zapomnětlivost přesahující běžné stařecké zapomínání, např. špatné vybavování si jmen, dat a událostí. Porušena je také plynulost řeči<sup>11</sup>.

S postupem onemocnění se významně snižuje slovní zásoba pacienta, řeč se stává stereotypní. Myšlení je rozbíhavé, zmatené, mohou se objevovat bludy a v těžkých stádiích i halucinace. Porušena je také časová a prostorová orientace. Dochází k narušení osobnostních rysů, typické jsou emocionální poruchy se střídavými projevy depresí nebo euforie, mohou se vyskytovat i návaly vzteku a stavy úzkosti.

Jeden z hlavních příznaků, odlišující AN od vaskulárních demencí, je změna osobnosti pacienta. Typický je egocentrismus, sobeckost, egoismus a podezíravost. Pacient ztrácí zájmy, motivaci, přestává o sebe pečovat a upouští od dřívějších aktivit.

V těžkém stadiu demence pacient téměř nekomunikuje s okolím, paměť je významně postižena, vyskytují se deliria, projevují se již také neuromotorické změny jako porucha chůze a hybnosti. V terminálním stádiu je pacient zcela imobilizovaný, paměťová funkce je téměř vymizelá, řeč nesrozumitelná a emoce téměř žádné<sup>11</sup>. Nemocný později obvykle umírá na přidružená onemocnění např. bronchopneumonie nebo na následky úrazu<sup>16</sup>.

### 3.1.2 Patofyziologie

Během stárnutí lidského organismu se snižuje hmotnost a objem mozku a to převážně po 55. roce života, snižuje se také tloušťka mozkové kůry a po 60. roce se začínají rozšiřovat mozkové komory. U pacientů s AN dochází k podobným změnám jako u normálního stárnutí, avšak úbytek neuronů je v průběhu AN vyšší než u běžného stárnutí. Postižena bývá zejména kůra mozková a oblast hippocampu. Narušení cholinergního systému se projevuje kognitivními poruchami<sup>12</sup>.

Zatím není známa přesná příčina onemocnění. Nejvýznamnější extracelulární patologickou změnou je ukládání  $\beta$ -amyloidu, ze kterého vznikají shlukování plaky. Intracelulárně lze pozorovat vznik neurálních klubek tzv. tangles, způsobený degenerací  $\tau$ -proteinu. Tyto a následné degenerativní procesy vedou k zániku neuronů<sup>11</sup>. V současnosti existuje několik dalších teorií o původu a rozvoji AN, z nichž amyloidová a cholinerní teorie jsou považovány za hlavní faktory v patologii AN<sup>17</sup>.

### 3.1.2.1 Tvorba $\beta$ -amyloidu

A $\beta$  je proteolytickým produktem transmembránového glykoproteinu APP (amyloidový prekurzorový protein). Tento glykoprotein prokazatelně přispívá k vývoji CNS. APP podléhá proteolytickému štěpení, buď amyloidogenní nebo neamyloidogenní cestou.

V rámci neamyloidogenní cesty je APP štěpen  $\alpha$ -sekretasou vážící se na membránu A $\beta$  domény tohoto glykoproteinu. Tento enzym štěpí přibližně 90 % APP za vzniku rozpustného fragmentu sAPP $\alpha$  s neuroprotektivní funkcí a fragmentu C83, který ovlivňuje aktivitu určitých genů bránících vzniku A $\beta$ .

V případě amyloidogenní cesty je APP štěpen  $\beta$ -sekretasou na rozpustný sAPP $\beta$  a fragment C99 vázaný na membráně. Postupným štěpením fragmentu C99  $\gamma$ -sekretasou vzniká intracelulární doména APP a  $\beta$ -amyloid. Amyloid je tvořen několika peptidy, z nichž nejvýznamnější podíl představuje peptid A $\beta$ 1-42. Tento peptid se hromadí především v neuronech, vyvolává oxidační stres a tím urychluje degeneraci neuronů. Hromaděním A $\beta$  vznikají polymerní senilní plaky, na jejichž povrchu dochází k tvorbě sterilního zánětu. Výsledkem je aktivace apoptotické kaskády a zánik neuronu<sup>11,17</sup>.

### 3.1.2.2 Tvorba neurofibrilárních klubek

Neurofibrilární klubka tzv. tangles (NFTs) jsou tvořeny patologicky fosforylovaným  $\tau$ -proteinem. T-protein je za normálních podmínek běžně přítomný v neuronech, podílí se na začlenění tubulinu do mikrotubulů, na jejich stabilizaci a ovlivňuje transport v axonech.

Intracelulární NFTs se skládají z párově helikálních vláken a párově helikálních filament vzniklých v průběhu AN. Hlavní složkou těchto vláken je právě hyperfosforylovaný  $\tau$ -protein, který narušuje tvorbu a strukturu tubulinu a tím způsobuje destabilizaci buňky. Jako významný faktor hyperfosforylace  $\tau$ -proteinu se ukázal vliv cyklin-dependentní kinasy 5 (CDK5) a glykogensynthasy kinasy-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ). Současné studie ukázaly, že procesy, které vedou k nadměrné tvorbě A $\beta$  také zvyšují aktivitu GSK-3 $\beta$ . Interakce mezi A $\beta$  a  $\tau$ -proteinem jsou také spojovány s mitochondriální dysfunkcí. Vzájemným působením zvyšují neurotoxicitu<sup>17</sup>.

### 3.1.2.3 Změny v metabolismu acetylcholinu

Acetylcholin (ACh) má výhradní funkci jako neuromediátor. Je zapojen v neurotransmisí a v utváření paměti, zasahuje také do produkce a sekrece ostatních neuromediátorů v CNS.

Jedna z teorií patofyziologie AN je zaměřena právě na cholinergní hypotézu. ACh je tvořen v presynaptické oblasti neuronu za pomoci enzymu cholinacetyltransferasy (ChAT), odtud je vyplaven do synaptické štěrbině. Aktivita ACh ve štěrbině je ukončena enzymem acetylcholinesterasou, která rozkládá ACh na cholin a kyselinu octovou<sup>17</sup>.

Za patologických podmínek AN je presynaptická část acetylcholinergního neuronu narušena. Dochází k ovlivnění vstupu prekurzorů ACh do neuronu a k nedostatečné syntéze a uvolňování ACh. To má za následek nedostatek ACh pro neurotransmisi a z toho vyplývající kognitivní a další poruchy. Receptory pro ACh se nacházejí v celé CNS, zejména pak v mozkové kůře, thalamu, hippokampu a bazální části předního mozku. Právě postižení těchto oblastí mozku je typické pro AN. Pokles cholinergní transmise vede k amyloidové tvorbě a přispívá ke kognitivní dysfunkci. Důležitým faktorem je aktivita cholinesteras.

AChE přirozeně štěpí ACh, zatímco druhý enzym butyrylcholinesterasa má za normálních podmínek jen nízkou afinitu k ACh. BChE je přítomna v odlišných částech mozku než AChE, například v endoteliálních buňkách, částečně v neuronech a gliových buňkách, placích a klubkách. Pokud dojde k útlumu aktivity AChE, například rozvojem AN nebo vlivem inhibitorů cholinesteras, může BChE zastoupit její funkci. Dochází tak k dalšímu úbytku ACh transmise<sup>17</sup>.

### 3.1.2.4 Poruchy glukózového metabolismu

Výsledky experimentálních prací poukazují na úzké vazby mezi inzulínovou rezistencí, diabetes mellitus II a poruchami kognitivních funkcí. Tyto vztahy spojují procesy spojené s poruchou metabolismu glukózy v mozku, i proto někteří autoři označují AN jako diabetes mellitus 3. typu<sup>18</sup>.

Vlivem hyperglykémie v určitých oblastech mozku nebo jinými patologickými stavy dochází k tvorbě tzv. produktů pokročilé glykace (AGEs). Tyto sloučeniny se vážou na své receptory (RAGEs) a tím aktivují kaskádu způsobující zánět, oxidační stres a následně buněčnou smrt. Jako ideální substráty pro glykaci se jeví i depozita intracelulárních klubek a extracelulárních plaků vznikajících v průběhu AN. Samotný A $\beta$  může být také ligandem pro RAGEs, čímž přispívá k rozvoji zánětlivé reakce<sup>17</sup>.

### 3.1.2.5 Mitochondriální dysfunkce

Metabolismu této organely se v souvislosti s patogenezí a průběhem AN věnuje značná pozornost. Během normálního buněčného dýchání vznikají spontánními reakcemi v mitochondrii reaktivní formy kyslíku a dusíku (ROS a RNS). Za běžných podmínek jsou tyto radikály redukovány systémem antioxidantů<sup>17</sup>.

Během stárnutí nebo vlivem nemoci však dochází k únikům těchto radikálů. Jejich akumulací může dojít k poškození důležitých biomolekul, zejména lipidů, proteinů a nukleových kyselin. ROS narušují také funkci samotné mitochondrie. Může dojít k poškození mitochondriální DNA, struktury organely nebo enzymů dýchacího řetězce. Narušena je také homeostáza vápníku v buňce. To vše vede k nedostatečné tvorbě ATP a zvýšené produkci ROS a RNS mající za následek spouštění apoptotických procesů a zvýšený oxidační stres<sup>19, 20</sup>.

### 3.1.2.6 Oxidační stres

Vysoké hladiny volných radikálů a dalších látek s oxidačním účinkem mají velmi negativní vliv na průběh AN. Právě mozek je díky svým nárokům na kyslík a přítomnosti polynenasycených mastných kyselin vysoce náchylný na oxidační poškození<sup>17</sup>.

### 3.1.2.7 Nedostatek neurotrofních faktorů

Neurotrofní faktory tvoří skupina malých aktivních proteinů podílejících se na udržování funkce a životnosti specifických nervových populací. Kontrolují růst axonů a mají zásadní význam v utváření paměti a při procesu poznávání. Při nervovém poškození jsou zapojeny do regeneračních procesů. Jedním z nejvýznamnějších neurotrofních faktorů je nervový růstový faktor (NGF). Při nedostatku NGF dochází k úbytku cholinergních neuronů, nedostatečná je také tvorba enzymů transmise ChAT a AChE. Následkem je pokles cholinergního přenosu<sup>17</sup>.

### 3.1.2.8 Prolyloligopeptidasa

Prolyloligopeptidasa (POP) je serinová peptidasa zapojená do syntézy a degradace peptidových hormonů a neuropeptidů, nalézajících se v extracelulárním prostoru mozkové tkáně. První průzkumy ukázaly na možné zapojení POP do zpracování APP v procesu tvorby A $\beta$ . Inhibicí POP by se docílilo snížené tvorby A $\beta$ . Po přehodnocení poznatků se objevila nová



teorie, která zkoumá zvýšenou expresi POP v hippocampální oblasti jako možný faktor kognitivního deficitu v rané fázi AN. Inhibice POP tak možná zlepší kognitivní funkce<sup>17, 21</sup>.

### 3.1.3 Diagnostika

Pro správnou diagnózu demence je zapotřebí provést sérii testů a vyšetření, jež mají zavedená kritéria. Mezi základní vyšetření při podezření na demenci se řadí klinické vyšetření, anamnéza pacienta a hodnocení kognitivních funkcí. K hodnocení kognitivních funkcí se využívají různé testy, které se zaměřují např. na paměťové funkce, řeč pacienta, exekutivní a symbolické funkce nebo na celkovou míru kognitivního deficitu. Důležitá je také analýza behaviorálních a psychiatrických symptomů, aktivit každodenního života a přidružených onemocnění<sup>22</sup>. K diferenciální diagnostice AN lze využít pomocná vyšetření. Ze zobrazovacích metod má význam magnetická rezonance, ukazující projevy AN jako atrofii mozku a jednofotonová emisní počítačová tomografie (SPECT) posuzující metabolickou aktivitu neuronů na základě prokrvení. Vyšetření mozkomíšního moku stanovuje změny hladin  $\tau$ -proteinu, fosforylovaného  $\tau$ -proteinu a  $A\beta$ <sup>15</sup>. I přes tato důkladná vyšetření lze diagnózu AN pouze předpokládat. S jistotou lze prokázat AN pouze z posmrtného vyšetření mozku<sup>23</sup>.

### 3.1.4 Terapie

Vzhledem ke skutečnosti, že stále neznáme jasnou příčinu vzniku AN, jsou současné terapeutické možnosti omezeny na symptomatickou léčbu kognitivních poruch způsobených postižením cholinergního systému. Cílem léčby je zpomalit progresi nemoci a oddálit tak těžká stádia spojená se zhoršenou kvalitou života a nutností odkázat se na plnou péči ošetřovatelů nebo příbuzných<sup>24</sup>.

V léčbě se také často využívá farmakoterapie nekognitivních příznaků spojených s poruchami chování a psychologickými projevy demence<sup>23</sup>.

#### 3.1.4.1 Současná léčba

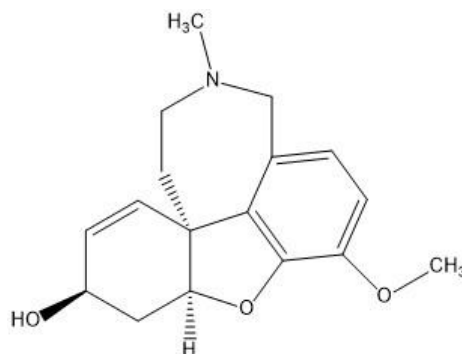
Podle medicíny založené na důkazech (EBM) jsou schválené 2 farmakoterapeutické přístupy zaměřené na zlepšení acetylcholinergní transmise<sup>24</sup>.

### 3.1.4.1.1 Inhibitory cholinesteras

Podle obecně přijímané cholinergní teorie, odpovídá míra postižení kognitivních funkcí převažujícímu nedostatku acetylcholinové neurotransmise způsobené neurodegenerací a také působením cholinesteras, acetylcholinesterasy a butyrylcholinesterasy, které ACh rozkládají. Zatímco je ACh přirozeným substrátem pro AChE, afinita BChE k ACh je za normálních podmínek poměrně nízká. S progresí nemoci ovšem aktivita AChE klesá a naopak u BChE stoupá. Navíc BChE dokáže zastoupit funkci AChE a podílí se tak na snižování hladiny ACh. Inhibicí cholinesteras tedy dochází zpomalení úbytku ACh a ke zlepšení neurotransmise<sup>11, 3</sup>. IChE také snižují tvorbu A $\beta$  a jeho toxicitu<sup>25</sup>. Terapie by měla být určena pro lehká až středně těžká stádia demence<sup>3</sup>. V klinické praxi jsou k dispozici 3 látky:

#### Galanthamin

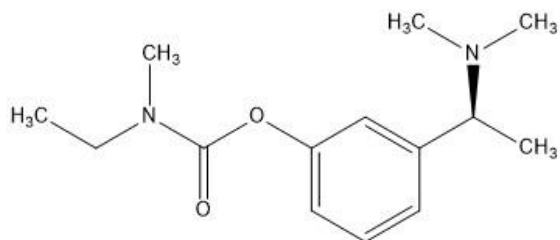
Tento alkaloid byl původně izolován v padesátých letech minulého století z rostliny *Galanthus woronowii* Losinsk. z čeledi Amaryllidaceae<sup>26</sup> (obr. 2). Jedná se o reverzibilní kompetitivní inhibitor AChE a allosterický modulátor nikotinových receptorů usnadňující transmissi ACh<sup>25</sup>.



Obrázek 2: (-)-Galanthamin

#### Rivastigmin

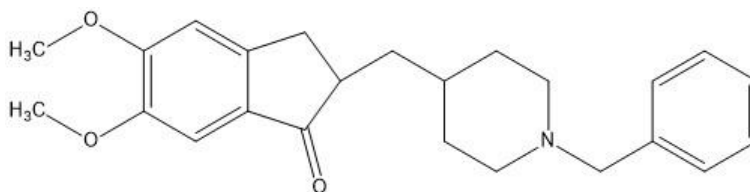
Zástupce karbamátových derivátů, který jako jediný reverzibilně inhibuje AChE i BChE<sup>25</sup> (obr. 3). Velmi dobře také ovlivňuje psychotické příznaky u AN s Lewyho tělísky<sup>24</sup>. Rivastigmin je k dispozici také ve formě transdermálních náplastí<sup>27</sup>.



Obrázek 3: (S)-Rivastigmin

### Donepezil

Donepezil je nejdéle používaným inhibítorem AChE, jedná se o piperidinový derivát (obr. 4). Působí vysoce selektivně reverzibilní nekompetitivní inhibicí AChE<sup>25</sup>. Mimo inhibice AChE brání také tvorbě A $\beta$  cestou  $\alpha$ -sekretáz, které se podílejí na odbourávání APP<sup>11</sup>.



Obrázek 4: Donepezil

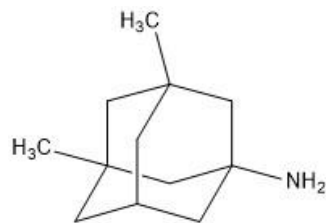
V minulosti se používal také akridinový derivát takrin. Účinkoval jako reverzibilní inhibitor AChE, byl ale z užívání stažen kvůli hepatotoxicitě. Z organofosforových sloučenin byl klinicky zkoušen metrifonát jako ireverzibilní inhibitor, z jeho použití ale sešlo pro časté nežádoucí účinky<sup>14</sup>.

#### 3.1.4.1.2 Antagonisté NMDA receptorů

N-methyl-D-aspartátové receptory jsou propojeny s otevíráním iontových kanálů pro Ca<sup>2+</sup> a Na<sup>+</sup> ionty. Tyto receptory jsou aktivovány vlivem excitačních aminokyselin glutamátu a aspartátu. V pozdějších stádiích AN dochází k nadměrnému uvolňování těchto aminokyselin vedoucímu k hyperexcitaci receptorů. To má za následek nadměrný vstup vápníkových iontů do neuronů a aktivaci kaskády procesů vedoucí k apoptóze a zániku neuronu. Z farmakologického hlediska je tedy žádoucí působit proti hyperaktivaci NMDA receptorů vhodným antagonistou. V terapii je užíván zatím jeden lék<sup>24</sup>.

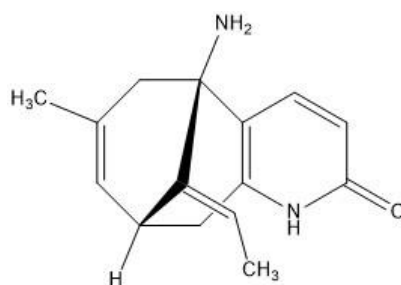
## Memantin

Jedná se o nekompetitivního antagonistu glutamátových NMDA receptorů (obr. 5). Brání chronické hyperaktivaci receptorů a tedy i následnému odumírání neuronů vlivem nadměrného vstupu vápníku do buňky. Jeho použití se doporučuje u středně těžké až těžké AN<sup>3</sup>. Memantin se může použít i v kombinaci s donepezilem, kdy významně zmírňuje poruchy chování<sup>25</sup>.



Obrázek 5: Memantin

V současné době probíhá klinické testování velmi perspektivní látky huperzinu A. Huperzin A je seskviterpenový alkaloid izolovaný z plavuně *Huperzia serrata* Thunb. z čeledi Huperziaceae (obr. 6). Účinkuje jako silný reverzibilní inhibitor AChE a současně také jako antagonist NMDA receptorů. Popsány byly též antioxidační vlastnosti<sup>28, 29, 30</sup>. V Číně se již využívá huperzin A k léčbě AN, v Evropě a USA je dostupný jako složka některých doplňků stravy<sup>25</sup>.



Obrázek 6: (-)-Huperzin A

### 3.1.4.2 Antioxidanty a zametače ROS a RNS

Oxidační stres a volné radikály se mohou podílet na patogenezi AN, obzvláště pokud přirozené antioxidační reakce nezvládají udržovat hladinu volných radikálů a dalších prooxidačních molekul v rovnováze<sup>12</sup>.

Antioxidanty lze využít spíše jako preventivní doplňkovou léčbu. Na podporu funkce tělu přirozených antioxidačních systémů lze využít suplementaci koenzym Q10. Význam mají také dva prvky jako kofaktory enzymů s antioxidační aktivitou – selen, který je součástí glutathionperoxidasy a zinek, který je důležitý pro funkci superoxiddismutasy<sup>31</sup>.

Významnější jsou antioxidanty rostlinného původu. Běžně se využívá účinek vitamínů C a E, karotenoidů nebo pyknogenolů ze semen vinné révy a z čajového prachu. Zajímavou skupinu látek zpomalujících rozvoj neurodegenerativních chorob představují kurkuminoidy pocházející z oddenku rodu *Curcuma*. Pozornost si zaslouží také flavonoidy přítomné v ovoci a zelenině<sup>31</sup>.

### 3.1.4.3 Látky podporující metabolismus CNS

Nootropika se uplatňují u funkčně poškozených částí mozku, kde dochází k projevům hypometabolismu. Jejich použitím se zlepšuje metabolismus glukózy, zvyšuje se využití kyslíku a prokrvení mozku, některé látky také zlepšují reologické vlastnosti krve nebo působí jako lapače ROS.

Nejpoužívanější je piracetam, kromě metabolického působení zlepšuje také plasticitu erytrocytů. Pyritinol účinkuje navíc i jako zametač volných radikálů. Nicergolin zlepšuje uvolňování ACh z nervových zakončení. Extrakt z *Ginkgo biloba* má antioxidační, antiagregační a neuroprotektivní efekt<sup>32</sup>.

### 3.1.4.4 Antiamyloidní terapie a nové terapeutické přístupy

Vzhledem ke komplexní povaze onemocnění a novým poznatkům o patogenezi AN se v poslední době rozvíjí nové terapeutické přístupy s cílem najít kauzální léčbu nebo alespoň efektivně zpomalit progresi nemoci. Řada studií se věnuje amyloidové teorii a možnostem zásahu do kaskády tvorby A $\beta$ . Testují se například inhibitory enzymů  $\beta$ -sekretáz a modulátory  $\gamma$ -sekretáz nebo statiny jako aktivátory  $\alpha$ -sekretáz<sup>33</sup>. Velká pozornost se věnuje studiu přírodních látek jako potencionálních léčiv v terapii AN<sup>17, 28</sup>.

### 3.1.5 Butyrylcholinesterasa

Butyrylcholinesterasa je enzym z rodiny cholinesteras. Své pojmenování dostal podle vysoké afinity k uměle vytvořenému substrátu butyrylcholinu, který se v lidském těle běžně nevyskytuje<sup>34</sup>.

Fyziologická role BChE v těle nebyla zatím kompletně objasněna, byl však zjištěn podíl enzymu v první fázi metabolismu některých léčiv a dalších exogenních látek<sup>34</sup>. BChE dokáže také chránit organismus před toxickými účinky organofosforových sloučenin<sup>35</sup>. V poslední době se věnuje pozornost zkoumání vlivu BChE na rozvoj a průběh AN<sup>4</sup>.

#### 3.1.5.1 Funkce BChE v těle

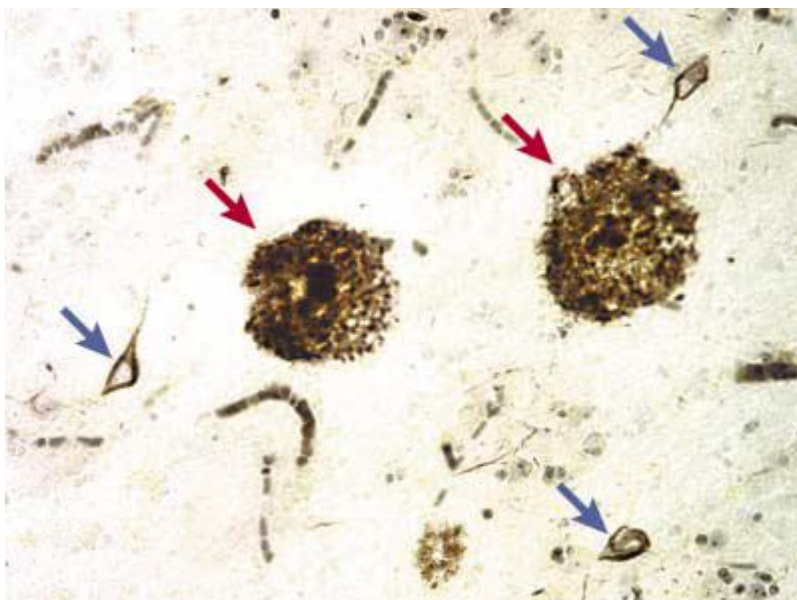
Největší zastoupení má BChE v krevní plazmě, kam je přiváděna z jater. Měření aktivity plazmatické BChE lze tak využít jako test jaterní funkce<sup>34</sup>. Dále můžeme BChE v těle nalézt ve slinivce břišní, hladkém svalu, střevní mukóze a CNS<sup>36</sup>.

##### 3.1.5.1.1 Metabolismus léčiv a exogenních látek

BChE dokáže štěpit mnoho exogenních látek, které obsahují ve své molekule esterovou vazbu. Jejimi substráty jsou například myorelaxacia sukcinylcholin nebo mivakurium<sup>34</sup>, lokální anestetika, kyselina acetylsalicylová nebo návykové látky heroin a kokain<sup>35</sup>. Důležitou roli má BChE také při ochraně organismu před toxickými účinky organofosforových sloučenin a karbamátů, které se používají jako bojové látky a pesticidy a působí jako silné inhibitory AChE<sup>37</sup>.

#### 3.1.5.2 Význam BChE v patogenezi Alzheimerovy nemoci

V lidském mozku je možné BChE nalézt v buňkách neuroglie, bílé hmotě a v neuronech lokalizovaných částečně v amygdale, hippokampu a thalamu, tedy strukturách podílejících se na schopnosti poznávání, učení a ovlivňující chování. Tyto funkce jsou typicky postižené v průběhu AN<sup>38</sup>. Za patologických podmínek AN lze pozorovat přítomnost BChE v senilních placích a klubkách tvořených A $\beta$ <sup>36</sup> (obr. 7).



Obrázek 7: BChE přítomná v senilních placích (červené šipky) a klubkách (modré šipky) v mozkové kůře pacienta s AN<sup>39</sup>

### 3.1.5.3 Inhibitory BChE

Studie prokázaly, že BChE má za normálních podmínek nízkou afinitu k ACh a hydrolyzuje ho tedy minimálně. Jiná situace nastává při nedostatečné aktivitě AChE (např. po podávání selektivních inhibitorů AChE), kdy BChE zastoupí funkci AChE a zvyšuje svou hydrolytickou aktivitu vůči ACh, čímž snižuje jeho hladinu v CNS<sup>40</sup>. Na základě tohoto zjištění lze předpokládat účinnější léčbu pomocí látek s inhibiční aktivitou vůči oběma enzymům nebo se selektivním působením na BChE a menšími nežádoucími účinky na cholinergní systém<sup>39, 5</sup>.

Z již schválených léčiv pro terapii AN vykazuje inhibiční aktivitu vůči oběma enzymům pouze rivastigmin ze skupiny karbamátových derivátů. Ze stejné skupiny mají podobnou aktivitu také pyridostigmin, fysostigmin a neostigmin. Slibné účinky jako duální inhibitory měly také metrifonát a takrin, od jejich testování ale bylo upuštěno kvůli nežádoucím účinkům<sup>41</sup>.

Jako silné ireverzibilní inhibitory obou enzymů působí organofosforové sloučeniny, které se využívají jako bojové látky (sarin, soman, tabun a VX) nebo jako pesticidy (paraoxon, parathion, malathion, malaoxon, dichlorvos)<sup>35,36</sup>. Tetraisopropylpyrofosforamid (iso-OMPA) je selektivním inhibitorem BChE, v praxi se využívá pouze pro diagnostické účely<sup>35,41</sup>.

Zajímavé výsledky přineslo testování isochinolinového alkaloidu berberinu jako léku proti AN. Berberin vykazuje široké farmakologické účinky, působí inhibiči AChE i BChE, inhibuje také enzymy MAO-A a MAO-B, má antioxidační aktivitu a snižuje hladinu A $\beta$ <sup>42</sup>.

Z léčivých rostlin bylo izolováno několik látek s inhibiční aktivitou vůči BChE. Většina sloučenin pochází z čeledí *Buxaceae*, *Amaryllidaceae*, *Huperziaceae*, *Lamiaceae*, *Chenopodiaceae*, *Papaveraceae* a *Apocyanaceae* a jedná se především o látky povahy alkaloidů, terpenů, sterolů, flavonoidů a glykosidů<sup>43</sup>. Příklady rostlinných druhů i konkrétních přírodních látek s cholinesterasovou inhibiční aktivitou ukazují následující dvě tabulky.

Tabulka 1: Anticholinesterasová aktivita rostlinných extraktů proti AChE a BChE<sup>44</sup>

Rostlina	Inhibice v %	
	AChE (1 mg/ml)	BChE (1 mg/ml)
<i>Corydalis solida</i> subsp. <i>solida</i>	87.56 ± 1.24	93.18 ± 0.89
<i>Glaucinum corniculatum</i>	86.55 ± 0.67	81.45 ± 0.74
<i>Rhododendron ponticum</i> subsp. <i>ponticum</i>	93.03 ± 1.12	95.23 ± 1.28
<i>Buxus sempervirens</i>	61.76 ± 0.76	93.64 ± 0.87
<i>Tribulus terrestris</i>	37.89 ± 0.77	78.32 ± 1.27
<i>Zygophyllum fabago</i>	13.25 ± 0.45	78.37 ± 0.95
<i>Lycopodium clavatum</i>	49.85 ± 1.33	71.05 ± 0.25
<i>Fumaria vaillantii</i>	94.23 ± 0.47	99.32 ± 0.25
<i>Fumaria capreolata</i>	96.89 ± 0.17	89.24 ± 0.83
<i>Fumaria asepala</i>	91.99 ± 0.70	93.12 ± 0.28
<i>Fumaria densiflora</i>	93.42 ± 0.92	85.66 ± 1.24
<i>Fumaria flabellata</i>	92.14 ± 1.01	87.91 ± 0.61
<i>Fumaria petteri</i> subsp. <i>thuretii</i>	89.45 ± 0.86	87.32 ± 0.76
<i>Fumaria macrocarpa</i>	93.43 ± 0.64	88.74 ± 0.34
<i>Fumaria parviflora</i>	87.02 ± 0.31	87.09 ± 1.45
<i>Fumaria judaica</i>	96.47 ± 0.63	98.43 ± 0.39
Galanthamin <sup>a</sup>	48.80 ± 0.31	80.31 ± 1.14

<sup>a</sup> referenční látka



Tabulka 2: Příklady přírodních látek s inhibiční aktivitou proti butyrylcholinesterase

Název látky	Typ sloučeniny	Rostlina (Čeleď)	IC <sub>50</sub> (μM)	Literatura
(+)-bulbokapnin	Isochinolonové alkaloidy	<i>Corydalis cava</i> (Fumariaceae)	67.0 ± 2.1	45
(+)-korydalin	Isochinolinové alkaloidy	<i>Corydalis cava</i> (Fumariaceae)	52.0	43
Cyklobuxophyllin	Steroidní alkaloidy	<i>Buxus hyrcana</i> (Buxaceae)	45.0	43
Sarkodin	Steroidní alkaloidy	<i>Sarcococca saligna</i> (Buxaceae)	18.31	43
Lawsaritol	Rostlinné steroly	<i>Haloxylon recurvum</i> (Chenopodiaceae)	3.9	43
(+)-chelidonin	Isochinolinové alkaloidy	<i>Chelidonium majus</i> (Papaveraceae)	31.9 ± 1.4	46
Ursolová kyselina	Triterpenová kyselina	<i>Micromeria cilicica</i> (Lamiaceae)	41.1	43

### 3.2 *Vinca minor* L. (Apocynaceae)

Český název: barvínek menší (brčál menší)<sup>7</sup>

Synonyma: *Vinca humilis* Salisb., *Vinca intermedia* Tausch, *Vinca ellipticifolia* Stokes, *Vinca acutiflora* Bertol., *Perivinca minor* Scop.<sup>47</sup>

#### Taxonomické zařazení<sup>7</sup>

Oddělení: Magnoliophyta

Třída: Magnoliopsida

Podtřída: Lamiidae

Řád: Gentianales

Čeleď: Apocynaceae

Rod: *Vinca* L.

Druh: *Vinca minor* L.



Obrázek 8: *Vinca minor* L. (barvínek menší)<sup>48</sup>

### 3.2.1 Botanická charakteristika

Barvínek je vytrvalá, dřevnatějící rostlina s plazivým až 80 cm dlouhým stonkem. Listy jsou stálezelené, krátce řapíkaté, vstřícné, elipsovitého tvaru s kožovitým povrchem. Nápadně doleva stočené pětičetné květy mají typickou modrou až modrofialovou barvu<sup>49</sup>. Rostlina kvete v období od března do června. Plodem je měchýřek, ale rozmnožuje se převážně vegetativně pomocí oddenků<sup>50</sup>.

### 3.2.2 Rozšíření

Barvínek je jediný zástupce čeledi Apocynaceae volně rostoucí u nás<sup>7</sup>. Na evropském kontinentu je rozšířen od Pyrenejského poloostrova, až po Podněpří. Severní hranici výskytu tvoří střední Německo a ČR, zavlečen byl ale i dále na sever<sup>47</sup>. U nás se vyskytuje přibližně do nadmořské výšky 800 m. Jeho stanovišti jsou listnaté i míšené lesy, kde roste převážně na vlhkých, málo kyselých půdách s dostatkem živin v polostínu až stínu. Možné je ho také najít v okolí lidských sídel jako důsledek zplanění a častého pěstování<sup>49</sup>.

### 3.2.3 Použití v lidové medicíně

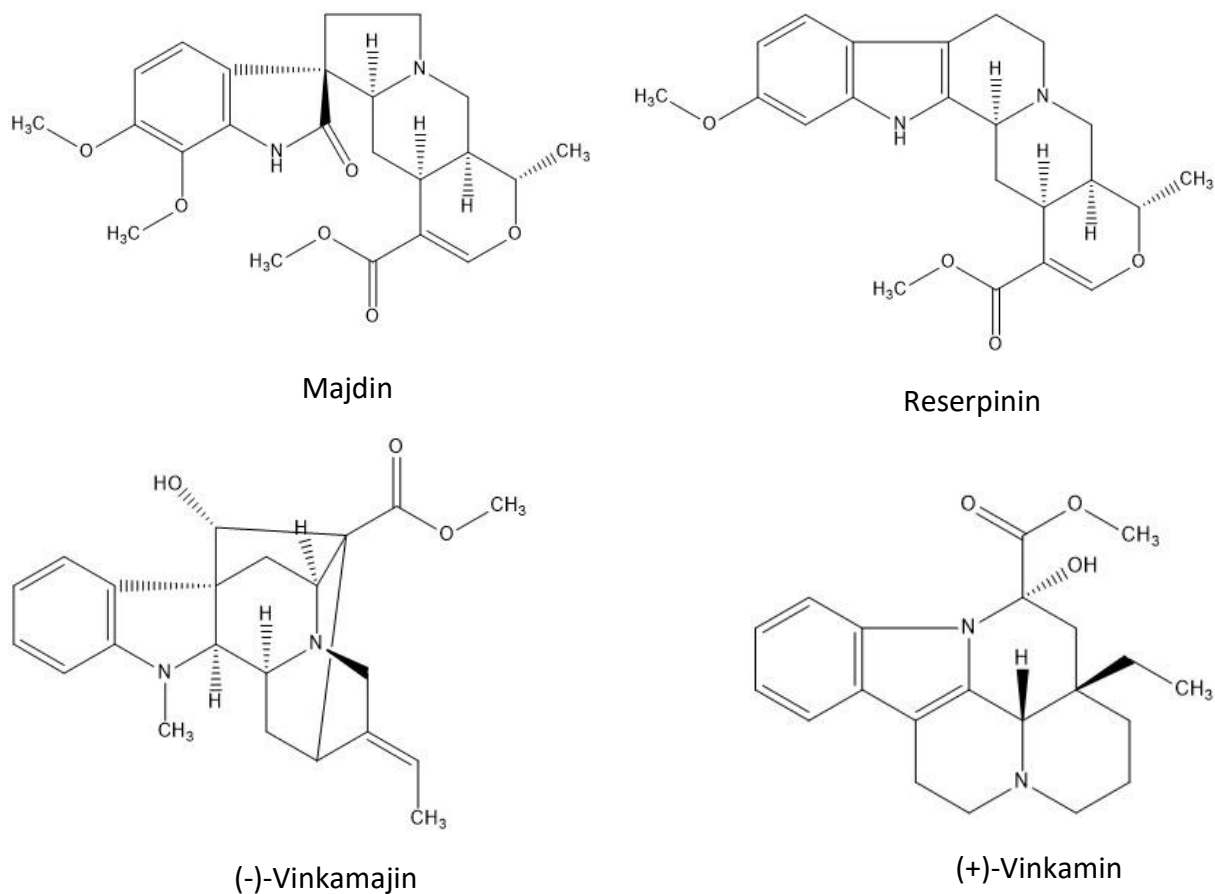
V minulosti se barvínek menší hojně využíval v lidovém léčitelství. Sbírala se kvetoucí nať – *Vincae minoris herba*, která se sušila při teplotách do 45 °C. Nejvýznamnější obsahové látky v barvínku tvoří indolové alkaloidy, dále obsahuje třísloviny, saponiny, barviva, hořčiny a flavonoidy. V léčitelství se využíval například jako stomachikum, tonikum, při léčbě různých krvácení nebo při zánětech dutiny ústní, tlustého střeva, či zánětu plic a průdušek. Nejčastěji se užíval jako odvar z nati, v poměru 1 čajová lžička na šálek s dávkováním 2 × denně 1 šálek. Ve formě masti se užíval na léčbu lupénky. Vzhledem k obsahu alkaloidů se barvínek menší řadí mezi jedovaté rostliny, žádné otravy nebyly zatím zaznamenány<sup>49, 51, 52, 53</sup>.

V současnosti se droga využívá pouze k izolaci alkaloidu vinkaminu<sup>52</sup>, který má hypotenzní účinky, používá se k léčbě poruch prokrvení mozku, sítnice a vnitřního ucha a k podpoře mozkového metabolismu<sup>54</sup>. Čerstvá kvetoucí nať našla uplatnění také v homeopatii proti slizničnímu krvácení a jako antidiabetikum a diuretikum<sup>51</sup>.

### 3.2.4 Obsahové látky rodu *Vinca* L. a jejich biologická aktivita

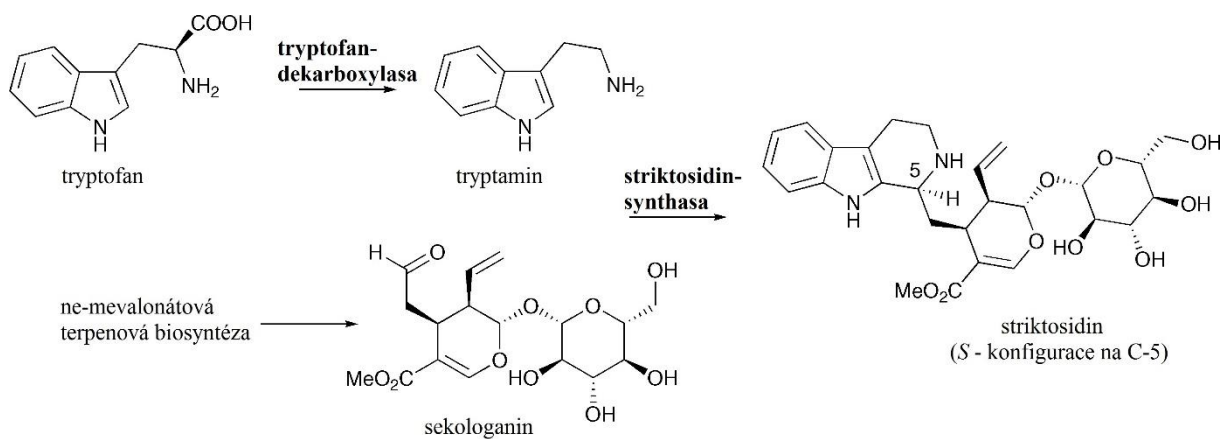
Čeleď Apocynaceae čítá okolo 2000 druhů rostlin rozdělených do přibližně 200 rodů<sup>55</sup>. Rod *Vinca* L. zahrnuje celkem 8 druhů a poddruhů rostlin<sup>56</sup>. Řadíme sem druhy *V. minor* L., *V. major* L., *V. herbacea* Waldst. et Kit., *V. erecta* Regel et Schmalh. a *V. difformis* Pourr.<sup>57</sup>

V celém rodu *Vinca* L. se vyskytují monoterpenové indolové alkaloidy z eburnamin-vinkaminové a sarpagin-ajmalinové skupiny. Nejčastěji se vyskytující alkaloidy jsou isomajdin, majdin, reserpin, vinkamajin a vinkamin (obr. 9). Další významné obsahové látky jsou triterpenová kyselina ursolová a cyklitoly<sup>56</sup>.



Obrázek 9: Příklady alkaloidů z rodu *Vinca* L.

Monoterpenové indolové alkaloidy vznikají biosyntézou z tryptofanu a iridoidního terpenu sekologaninu (obr. 10), jejichž kondenzační produkt striktosidin je výchozí sloučeninou pro další biosyntézu<sup>58</sup>. Charakteristické skupiny indolových alkaloidů rodu *Vinca* jsou: eburnaminové, sarpaginové, ajmalinové, akuamminové a oxindolové deriváty<sup>59</sup>.



Obrázek 10: Výchozí látky pro biosyntézu terpenických indolových alkaloidů<sup>58</sup>

### 3.2.4.1 Biologické účinky druhů rodu *Vinca* L.

Biologické testování sumárních alkaloidových extraktů *V. herbacea* u zvířat ukázalo následující účinky. U kočky a králíka vedlo podání extraktu k zablokování nervosvalového přenosu podobnému účinkům kurare. U abdominálního svalového preparátu z žáby vedlo podání nízké dávky ke svalovým kontrakcím. V závislosti na dávce došlo po podání sumárních alkaloidů u kočky a králíka ke snížení krevního tlaku o 10 až 40 %. Podání nízkých dávek extraktu způsobilo u králíka kontrakce hladké střešní svaloviny, naopak vyšší dávky měly spasmolytické účinky<sup>56</sup>. Testována byla také antioxidační a anticholinesterasová aktivita extraktů z *V. herbacea*. Alkaloidní extrakty projevovaly silnou inhibiční aktivitu vůči AChE a BChE (tab. 3) a také slibnou antioxidační aktivitu a inhibiční účinky proti peroxidaci lipidů. Zajímavé výsledky ukázalo i působení jako lapače volných radikálů<sup>60</sup>.

Tabulka 3: Anticholinesterasová aktivita sumárních extraktů z *V. herbacea*<sup>60</sup>

Vzorek <sup>a</sup>	Inhibice AChE v %	Inhibice BChE v %
Methanolvý ext.	24.85 ± 4.33	61.31 ± 3,22
Nealkaloidní ext.	17.26 ± 1.49	63.37 ± 5.46
<b>Alkaloidní ext.</b>	<b>78.54 ± 1.06</b>	<b>81.39 ± 2.94</b>
Galanthamin <sup>b</sup>	80.50 ± 0.52	75.03 ± 0.60

<sup>a</sup> průměrné hodnoty ze tří paralelních měření při koncentraci 200 µg/ml

<sup>b</sup> referenční látka

Laboratorní testy na zvířatech ukázaly po podání sumárního alkaloidního extraktu z *V. major* tyto účinky: snížení krevního tlaku, pozitivně inotropní účinky na srdce, dilatace cév včetně koronárních cév, anestetické účinky, zablokování střevních kontrakcí vyvolaných ACh a celkové sympatolytické a parasympatolytické účinky. Vodný extrakt z čerstvých listů snižoval *in vitro* aktivitu cholinesteras z lidského séra o 50 %<sup>56</sup>. Testování cholinesterasové inhibiční aktivity alkaloidového extraktu ukázalo slibný potenciál této rostliny (tab. 4). Stejně dobré výsledky ukázaly antioxidační aktivita a působení proti volným radikálům<sup>10</sup>.

Tabulka 4: Anticholinesterasová aktivita sumárních extraktů z *V. major*<sup>10</sup>

Vzorek <sup>a</sup>	Inhibice AChE v %	Inhibice BChE v %
Methanolvý ext. <i>V. major</i>	-10.4 ± 4.5	40.5 ± 7.7
Nealkaloidní ext. <i>V. major</i>	2.5 ± 4.3	63.1 ± 3.4
<b>Alkaloidní ext. <i>V. major</i></b>	<b>76.5 ± 1.9</b>	<b>84.5 ± 2.9</b>
Galanthamin <sup>b</sup>	80.5 ± 0.5	75.0 ± 0.6

<sup>a</sup> průměrné hodnoty ze tří paralelních měření při koncentraci 200 µg/ml

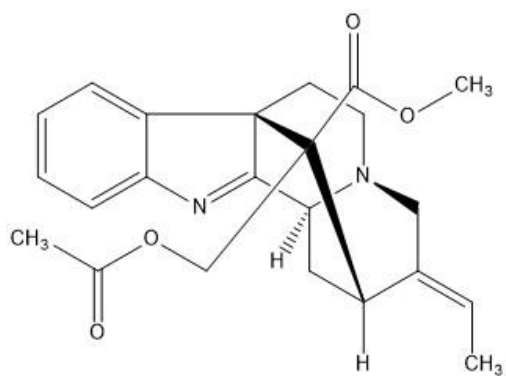
<sup>b</sup> referenční látka

### 3.2.4.2 *Vinca minor* L.

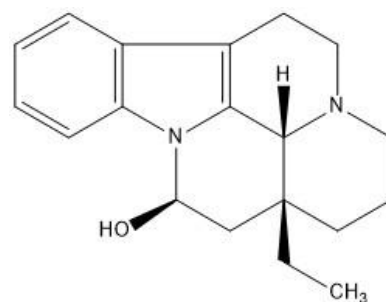
Barvínek menší obsahuje přes 50 alkaloidů<sup>8</sup>. Obsah v sušené droze se pohybuje v rozmezí 0,15 až 0,68 %. Nejvýznamnější alkaloid je (+)-vinkamin, který tvoří 25 až 65 % všech alkaloidů v droze. Z dalších alkaloidů byly izolovány: akuammilin, 11,12-dimethoxyeburnamonin, (+)-eburenin, (+)-eburnamenin, (-)-eburnamin, 19-epimonovincinin, (-)-16-epivinkamin, 19-hydroxyvinkamin, (+)-isoeburnamin, majorinin, 11-methoxyeburnamonin, 11-methoxyminovincinin, *N*-methylquebrachamin, minoricein, minovin, *N*-methylaspidospermidin, (-)-minovincin, (-)-minovincinin, nervobskurin, 1-norvinkorin, pikrinin, raufloricin, (-)-reserpin, rhazimol, striktamin (vinkamidin), (-)-vinkadiformin, vinkadin, vinkaminin, vinkaminorein, vinkaminoridin, vinkaminorin, vinkamon, vinkanorin, vinkarubin, vinkantin, vincin, vincinin, vincoridin, vinkorin, vinorin, vinoxin, vincalutin, vinkamirin, vingesin, vinkovin a vinomin<sup>56</sup>. Do klinického použití jako léčivo se dostal pouze semisyntetický derivát vinpocetin<sup>9</sup>.

Z dalších sloučenin byly izolovány: kyselina ursolová, β-sitosterol, flavonoidy a fenolové sloučeniny např. 2,3-dihydroxybenzoová kyselina, vinkosid, kaempferol, kvercetin a robinin<sup>56</sup>.

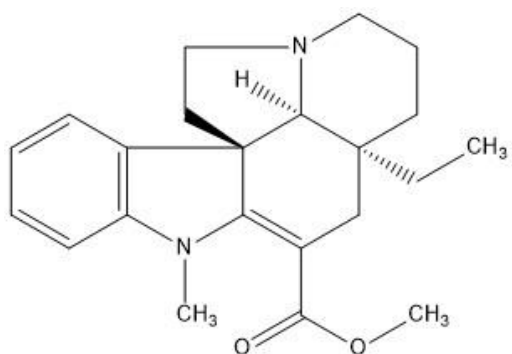
Triterpenová kyselina ursolová se vyznačuje protizánětlivými, protirevmatickými a antiulcerózními vlastnostmi, působí také analgeticky, podobně jako kyselina acetylsalicylová<sup>61</sup>. Kaempferol má široké spektrum biologických aktivit, působí antioxidantně, protimikrobiálně, kardioprotektivně, neuroprotektivně, antidiabeticky, proti rakovinnému bujení, analgeticky a také antialergicky<sup>62</sup>. Kvercetin je zejména silný antioxidant, dále má protizánětlivé, antialergické a antidiabetické účinky. Působí také proti rozvoji kardiovaskulárních onemocnění<sup>63</sup>. Přehled biologické aktivity vybraných alkaloidů a alkaloidních extraktů z *V. minor* je uveden níže (tab. 5-7).



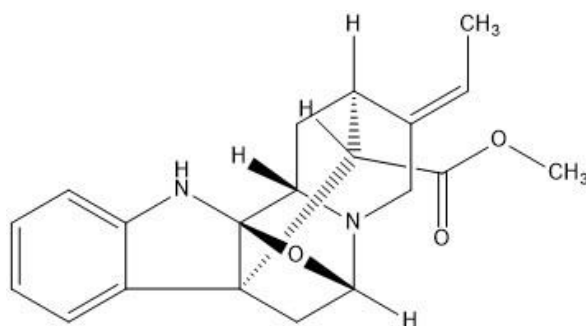
Akuammilin



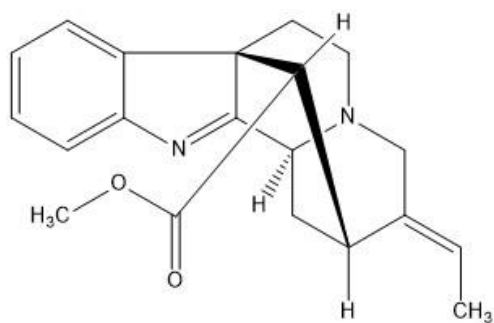
(-)-Eburnamin



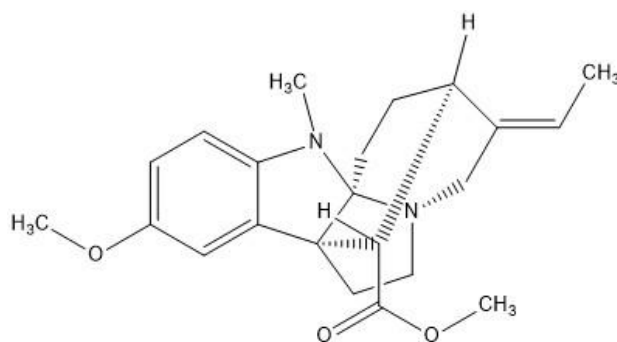
(-)-Minovin



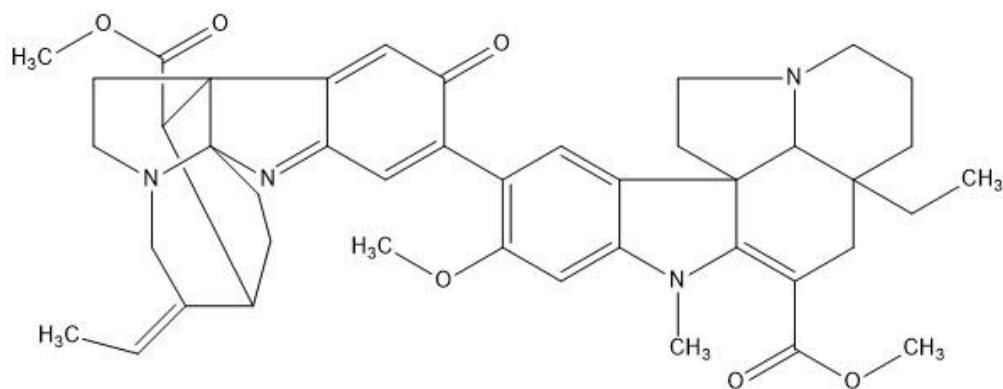
(-)-Pikrinin



(+)-Striktamin



(-)-Vinkorin



(-)-Vinkarubin

Obrázek 11: Příklad alkaloidů *Vinca minor* L.

Tabulka 5: Obsahové látky *Vinca minor* L. a jejich biologická aktivita

Typ sloučeniny	Název	Biologická aktivita	Literatura
Bisindolové alkaloidy	(-)-vinkarubin	<i>In vitro</i> cytostatický účinek na buněčné linie leukemie P388	8
Indolové alkaloidy	(+)-vinkaminorin	<i>In vitro</i> Cytostatický účinek na leukemické buňky linie P388 v dávce 100 µg/ml	8
Indolové alkaloidy	(+)-vinkaminorein	<i>In vitro</i> Cytostatický účinek na leukemické buňky linie P388 v dávce 100 µg/ml	8, 64
Indolinové alkaloidy	(-)-pikrinin	<i>In vitro</i> inhibice 5-lipoxygenasy v koncentraci 100 µM, <i>in vivo</i> (10 mg/kg) protizánětlivý účinek u myši, <i>in vivo</i> analgetický účinek u myši (10 mg/kg) po intra gastrickém podání	65, 66, 64
Indolové alkaloidy	(+)-vinkamin	Pozitivní účinky na metabolismus v CNS, neuroprotektivní účinky, léčba cerebrovaskulárních poruch	8, 64
Indolinové alkaloidy	(-)-akuammicin	<i>In vitro</i> zvýšené vstřebávání glukosy adipocyty, agonista na K-opioidních receptorech <i>in vivo</i> (morče)	67, 68, 64
Oxindolové alkaloidy	majdin	Proapoptická, antioxidační, chelatační a zametačová aktivita <i>in vitro</i>	69, 64
Indolové alkaloidy	reserpinin	Hypotenzní účinky <i>in vivo</i> u myši v dávce 1mg/kg	70, 71, 64
Oxindolové alkaloidy	vinerin	Hypotenzní účinky u myši, ganglioplegické účinky	72, 64
Indolinové alkaloidy	(-)-vinkadiformin	<i>In vitro</i> Cytostatický účinek na leukemické buňky linie P388 v dávce 100 µg/ml	56, 64
Oxindolové alkaloidy	vineridin	Sedativní účinky	71, 64
Indolinové alkaloidy	(-)-vinkamajin	Antiarytmické účinky <i>in vivo</i> u kočky, králíka a krysy	73, 64
Indolinové alkaloidy	(-)-vinkanin	Analeptikum pro léčbu nemocí CNS, léčba neuritid akustického nervu	71, 64
Indolinové alkaloidy	vinkanidin	Emetické účinky	71, 64
Indolové alkaloidy	vallesiachotamin	Cytostatické účinky	10, 74
3H-Indolové alkaloidy	(+)-striktamin (vinkamidin)	Účinek proti adenovirům a HSV, inhibice monoaminoxidas <i>in vitro</i> a <i>in vivo</i> u myši, selektivní inhibice COX2 <i>in vitro</i> při koncentraci 100 µM	75, 76, 65, 64



Tabulka 6: Biologické účinky extraktů ze sušené drogy<sup>56</sup>

Forma extraktu	dávka	Biologické účinky
Vodný extrakt ze sušené nati	25 – 200 mg/kg (s. c.)	Hypotenzní účinky různé intenzity v závislosti na druhu zvířete. (pes, kočka, krysa, myš) U psa a kočky negativní chronotropní účinek
Sumární alkaloidní extrakt	6 – 10 mg/kg (i. v.)	Snížení krevního tlaku o 60 – 100 mmHg během 10 – 30 minut. (pes v narkóze)
Sumární alkaloidní extrakt	1 – 3 mg/kg (i. v.)	Hypotenzní účinek (krysa, králík, kočka)
macerát (1 g drogy macerovaný ve 100 ml horké vody po dobu 30 minut)	1 ml macerátu, podání do orgánu	Vasodilatační účinek na koronární cévy (morče)
Sumární alkaloidní extrakt	5 – 10 mg/kg (i. v.)	Pozitivní inotropní účinek (pes)
Vodný extrakt ze sušené nati	Vyšší dávky	Spasmolytické účinky na cévy (pes, krysa, žába)
Vodný extrakt ze sušené nati	Vyšší dávky	Zvýšená peristaltika a svalový tonus tenkého střeva (kočka, králík)
Sumární alkaloidní extrakt	1 – 10 mg ,aplikace do orgánu	Zvýšení krevního průtoku o 100 % v izolovaném uchu (králík)
Vodný extrakt ze sušené nati	50 mg/kg (i. v.)	Snížení hladiny krevního cukru během 3 hodin o 20 % (králík)
Sumární alkaloidní extrakt	5 a 10 mg/kg (i. v.)	Sympatolytické a parasympatolytické účinky (pes)
sumární roztok alkaloidů	1 % roztok, lokální podání	Lokálně anestetické působení na oční rohovku odpovídající 0,7% roztoku kokainu (králík)

Sumární methanolové, alkaloidní a nealkaloidní extrakty z *Vinca minor* L. byly otestovány na inhibiční aktivitu proti lidským cholinesterasám. Zejména sumární alkaloidní extrakt ukázal slibné výsledky a to hlavně při účinku na BChE (tab. 7). V oblastech antioxidační aktivity a zhášení volných radikálů poskytlo testování alkaloidního extraktu také velmi zajímavé výsledky<sup>10</sup>.

Tabulka 7: Anticholinesterasová aktivita sumárních extraktů z *V. minor*<sup>10</sup>

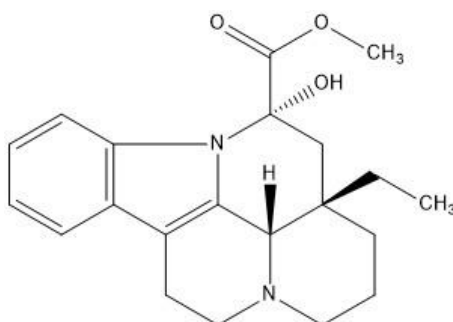
Vzorek <sup>a</sup>	Inhibice AChE v %	Inhibice BChE v %
Methanolvý ext. <i>V. minor</i>	-2.7 ± 2.5	37.9 ± 3.8
Nealkaloidní ext. <i>V. minor</i>	17.4 ± 3.0	34.1 ± 5.2
<b>Alkaloidní ext. <i>V. minor</i></b>	<b>61.1 ± 2.0</b>	<b>73.9 ± 4.4</b>
Galanthamin <sup>b</sup>	80.5 ± 0.5	75.0 ± 0.6

<sup>a</sup> průměrné hodnoty ze tří paralelních měření při koncentraci 200 µg/ml

<sup>b</sup> referenční látka

### Vinkamin

Vinkamin je eburnaminový derivát, který byl poprvé izolován z barvínku menšího v 50. letech minulého století, jeho strukturu objasnily začátkem 60. let čeští vědci (obr. 12). Studie tohoto alkaloidu ukázaly účinky na oběhový systém: snížení krevního tlaku a ovlivnění srdečního výdeje a tepu. Byl prokázán také dilatační účinek na mozkové cévy a tím zlepšená perfuze mozku<sup>77</sup>. Vinkamin a jeho syntetické deriváty (vinpocetin, vinkanol) se ukázaly jako účinné blokátory napěťově řízených Na<sup>+</sup> kanálů v mozku, čímž působí neuroprotektivně proti toxickým účinkům některých látek na CNS. Zkoumána byla také možnost využití vinkaminu a jeho derivátů jako potenciálních antikonvulsiv<sup>78</sup>. Laboratorní testování na krysách prokázalo antioxidační, neuroprotektivní a inhibiční cholinesterasovou aktivitu vinkaminu a vinpocetinu v malých dávkách (10 nebo 20 mg/kg) při neurotoxicitě navozené podáváním AlCl<sub>3</sub>. Vyšší dávky naopak účinkovaly spíše prooxidačně a prozánětlivě<sup>79</sup>. Studie se 142 pacienty s Alzheimerovou a vaskulární demencí, po podávání vinkaminu 30 mg 2 × denně 12 týdnů, prokázala lepší terapeutické účinky vinkaminu oproti kontrolní skupině s placebem<sup>80</sup>.



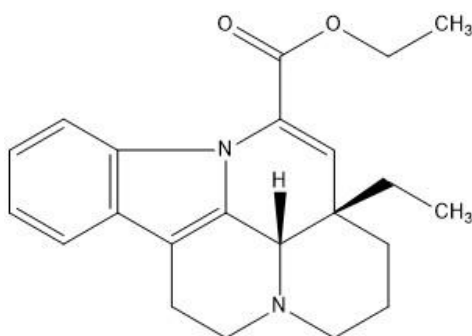
Obrázek 12: (+)-Vinkamin

## Vinpocetin

Druhou atraktivní látkou je vinpocetin (obr. 13), semisyntetický derivát, poprvé syntetizovaný z vinkaminu koncem 60. let minulého století<sup>81</sup>. Vyrábí se pod obchodní značkou Cavinton® a používá se k symptomatické léčbě cerebrovaskulárních poruch např. ischemická hypoperfuze, vaskulární demence a celkově ke snížení psychických a neurologických následků při poruše prokrvení mozku<sup>82</sup>.

Předpokládá se, že vinpocetin působí několika mechanismy, které podmiňují jeho antioxidační, vazodilatační a neuroprotektivní aktivitu. Neuronální ochrana se připisuje schopnosti inhibovat napětově řízené Na<sup>+</sup> kanály a tím chránit nervovou tkáň před následky ischemie a oxidativního stresu vycházejícího z anoxie. Další účinek předpokládá inhibici fosfodiesterasy-1 enzymu, který štěpí cAMP, což vede ke zvýšení hladin cAMP a díky snížení agregace trombocytů také ke zlepšení mozkové cirkulace a metabolismu. Vinpocetin působí i jako zametač volných radikálů a inhibitor lipidové peroxidace<sup>81</sup>.

V léčbě AN zatím vinpocetin neprokázal významnější účinek<sup>81,83</sup>. Studie z roku 2011 u 110 pacientů s mírnou kognitivní poruchou sledovala vliv cerebrolysinu a přípravku Cavinton® (vinpocetin) na progresi kognitivního deficitu a na oddálení rozvoje AN. Výsledná data dokázala oddálení diagnózy AN u skupiny pacientů léčených cerebrolysinem<sup>84</sup>.



Obrázek 13: (+)-Vinpocetin

## 4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 4.1 Všeobecné postupy

#### 4.1.1 Příprava rozpouštědel

Všechna rozpouštědla byla před použitím přečištěna frakční destilací. Prvních 5 % destilátu bylo odstraněno kvůli možnému znečištění vodou, zbytek vydestilované frakce byl uchován v hnědých nádobách chráněný před světlem.

#### 4.1.2 Sloupcová chromatografie

Chromatografický sloupec byl připraven naléváním suspenze silikagelu v mobilní fázi do kolony.

#### 4.1.3 Příprava desek pro preparativní TLC

Na skleněné desky určené pro preparativní TLC byla nalita suspenze silikagelu ve vodě a rovnoměrně rozetřena. Poté se hotové desky sušily minimálně po dobu 24 hodin. Množství použitého silikagelu na desky bylo 0,03 g v 0,1 ml vody na 1 cm<sup>2</sup>.

#### 4.1.4 Detekce alkaloidů na chromatografických deskách

Pro detekci alkaloidů na TLC deskách byla použita UV lampa při vlnových délkách 254 a 366 nm, poté byl proveden postřík Dragendorffovým činidlem – vznik oranžově zbarvených skvrn.

#### 4.1.5 Odpařování rozpouštědel z extraktů

Extrakty obsahující rozpouštědla z kapalinové chromatografie nebo z preparativní TLC byly odpařeny na rotační vakuové odparce při sníženém tlaku na vodní lázni o teplotě 40 °C. Získané roztoky alkaloidů ze sumárního extraktu byly odpařeny ve skleněných ampulkách na vodní lázni při 60 °C pomocí proudu vzduchu. Konečné dosušení bylo provedeno ve vakuovém exsikatoru za sníženého tlaku nad silikagelem po dobu 24 hodin.

#### 4.1.6 Uchovávání vzorků

Získané odparky frakcí a vzorky alkaloidů ze sumárního extraktu byly v průběhu jejich dočišťování uchovávány v lednici při 5 °C pod ochrannou atmosférou argonu. Finální vzorky byly před dalším testováním uloženy v mrazáku při -22 °C pod argonem.

### 4.2 Potřeby a chemikálie pro izolaci látek

#### 4.2.1 Rozpouštědla

benzín lékařský lékopisné kvality ČL 2009 (Penta) (Bz)

chloroform p. a. (Penta) ( $\text{CHCl}_3$ )

diethylamin p. a. (LachNer) ( $\text{Et}_2\text{NH}$ )

diethylether p. a. (LachNer) ( $\text{Et}_2\text{O}$ )

ethanol 95%, denaturovaný methanolem p. a. (Penta) ( $\text{EtOH}$ )

ethylacetat p. a. (Penta) ( $\text{EtOAc}$ )

methanol p. a. (Penta) ( $\text{MeOH}$ )

n-Hexan p. a. (Penta) (n-Hx)

toluen p. a. (Penta) (To)

#### 4.2.2 Chemikálie a pomocné látky

argon (5.0)

hydroxid sodný 5% ( $\text{NaOH}$ )

křemelina Celite 535 John's Manville (Sigma-Aldrich)

kyselina chlorovodíková p. a. (LachNer) ( $\text{HCl}$ )

uhličitan sodný, bezvodý (Penta) ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )

#### 4.2.3 Detekční činidla

D1: Dragendorffovo činidlo<sup>85</sup>

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

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

Zásobní roztok vznikl smícháním roztoků A a B v objemovém poměru 1 : 1.

Roztok pro detekci byl připraven přidáním 5 ml zásobního roztoku k roztoku 10 g kyseliny vinné v 50 ml vody. Detekční roztok byl uchováván v ledničce při 4 °C.

Detekční činidlo se používá pro detekci alkaloidů na TLC. Odvětrané desky zbavené zbytků rozpouštědel z vyvíjecí soustavy se postříkají činidlem. Na světle růžovém podkladu vznikají intenzivní oranžové skvrny. Detekce je velmi citlivá.

#### 4.2.4 Vyvíjecí soustavy pro TLC

S 1: EtOAc + MeOH (9 : 1)

S 2: n-Hx + EtOAc + Et<sub>2</sub>NH (30 : 11 : 1)

S 3: To + Et<sub>2</sub>NH (96 : 4)

#### 4.2.5 Chromatografické adsorbenty

komerční desky Merck Silicagel 60 F<sub>254</sub> (Merck)

komerční desky Silufol UV 254 nm (Kavalier)

nalévané desky se silikagelem Kieselgel G UV 254 (Merck)

Silikagel Fluka 0,063-0,200 mm, deaktivovaný 10 % vody

#### 4.2.6 Použité přístroje

vakuová odparka Büchi Rotavapor R-114

### 4.3 Postup pro stanovení cholinesterasové aktivity

#### 4.3.1 Chemikálie

Acetylcholin jodid (10mM roztok) (Sigma-Aldrich)

Butyrylcholin jodid (10mM roztok) (Sigma-Aldrich)

Dimethylsulfoxid p. a. (Sigma-Aldrich) (DMSO)

5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina ≥ 98% (5mM roztok) (Sigma-Aldrich) (DTNB)

Galanthamin hydrobromid (Changsha Organic Hearb Inc., China)

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

### 4.3.2 Pufry

5mM Fosfátový pufr pH 7,4

*Zásobní roztok A:* 10 mM roztok  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (1 litr roztoku obsahuje 1,20 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ).

*Zásobní roztok B:* 10 mM roztok  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (1 litr roztoku obsahuje 1,42 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ).

Pufr byl připraven smícháním 57 ml roztoku A se 283 ml roztoku B a 300 ml vody.

5mM Fosfátový pufr pH 7,4 obsahující 150 mM chloridu sodného

8,766 g chloridu sodného p. a. bylo rozpuštěno v 5mM fosfátovém pufru pH 7,4 a doplněno do 1000 ml.

100mM Fosfátový pufr pH 7,4

*Zásobní roztok A:* 200 mM roztok  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (1 litr roztoku obsahuje 24,0 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ).

*Zásobní roztok B:* 200 mM roztok  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (1 litr roztoku obsahuje 28,4 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ).

Pufr byl připraven smícháním 57 ml roztoku A se 243 ml roztoku B a 300 ml vody.

### 4.3.3 Biologický materiál<sup>86</sup>

Jako zdroj AChE byl použit hemolyzát lidských erytrocytů. Zdrojem BChE byla lidská plazma. Erytrocyty a plazma jsou získány z čerstvě odebrané krve, ošetřené citrátem proti sražení. Krev rozdělená do zkumavek se podrobí centrifugaci při rychlosti 4000 rpm při 4 °C po dobu 10 minut. Plazma nad usazenými erytrocyty se odsaje a uchová k následnému stanovení aktivity BChE v ledničce při 4 °C.

Z erytrocytů se odsají zbytky přebytečné plazmy, odečte se objem erytrocytární masy a poté se sediment zředí 5 mM fosfátovým pufrům pH 7,4 s obsahem 150 mM chloridu sodného. Tato suspenze se promíchá, rozdělí do zkumavek a provede se centrifugace. Takto se erytrocyty 3 × promyjí, poté se promývací kapalina odstraní a přidá se 5 mM fosfátový pufr pH 7,4 v objemovém poměru erytrocyty : pufr (1 : 9). Směs se přelije do Erlenmayerovy baňky a erytrocyty se nechají spontánně hemolyzovat za stálého míchání. Po skončení hemolýzy se ihned provede stanovení aktivity AChE.

## 4.4 Izolace alkaloidů

### 4.4.1 Rostlinný materiál pro izolaci

Jemně řezaná sušená nať *Vinca minor* L. (Apocynaceae) komerčně dodána od firmy Megafyt s. r. o., Vrané nad Vltavou, sběr 2013 (položka číslo 15607, šarže 11062013, laboratorní protokol I0195/13, kvalita V).

### 4.4.2 Extrakce drogy a další zpracování extraktu

Tato část práce byla provedena nad rámec mé diplomové práce.

#### 4.4.2.1 Příprava sumárního extraktu a chloroformového výtřepku ( $\text{CHCl}_3$ -A)

K přípravě extraktu bylo použito 62 kg jemně řezané drogy. Extrakce byla provedena po částech, vždy 500 g drogy se 3 litry 95% EtOH bylo uvedeno k varu na vodní lázni po dobu 30 minut. Po filtraci se extrakce provedla stejným způsobem. Spojený ethanolový extrakt byl zbaven ethanolu při snížené teplotě a tlaku. K zahřátému extraktu byla za horka přidána voda. Celkový objem extraktu byl 70 litrů. Vyloučila se šedavo-zelená usazenina (chlorofyl + kyselina ursolová), která byla odfiltrována na Büchnerově nálevce přes papírový filtr. Hnědý filtrát byl alkalizován 25% amoniakem na pH 9-9,5. Vyloučená usazenina alkaloidů a dalších látek byla vyjmuta výtřepáním 5× 15 litry  $\text{CHCl}_3$  vždy po částech. Chloroformový výtřepok byl odpařen do sucha. Takto bylo získáno 454 g tmavě hnědého velmi viskózního odparku.

#### 4.4.2.2 Příprava předčištěného chloroformového výtřepku $\text{CHCl}_3$ -A

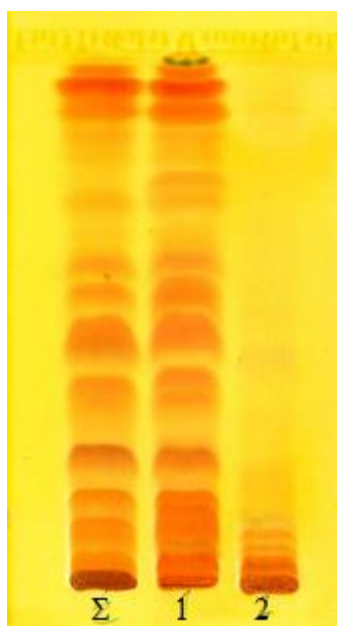
Bylo provedeno přečištění extraktu pomocí sloupcové chromatografie. Na 1 g extraktu bylo použito 10 g neutrálního  $\text{Al}_2\text{O}_3$ . Na rozpuštění 1 g extraktu bylo použito 20 ml  $\text{CHCl}_3$ . Po filtraci přes sloupec  $\text{Al}_2\text{O}_3$  byl sloupec promyt potřebným množstvím chloroformu a následně směsí  $\text{CHCl}_3$  + EtOH (9 : 1), filtráty byly odpařeny.



Tabulka 8: Předčištění chloroformového výtřepku  $\text{CHCl}_3$ -A

Množství odparku		454 g	
$\text{CHCl}_3$ na rozpuštění odparku		9,1 litru	
Adsorbent		Neutrální $\text{Al}_2\text{O}_3$ , st. aktivity III, 100-250 $\mu\text{g}$	
Rozměry adsorbentu		$\varnothing$ 18 × 45 cm	
Číslo eluce	Eluce	Hmotnost odparku	Vzhled
1	$\text{CHCl}_3$ , 10,3 litru	201 g	Tmavě hnědý, velmi viskózní odparek
2	$\text{CHCl}_3$ + EtOH 9 : 1, 10,3 litru	94 g	Hnědý, pěnovitý odparek

Výsledek chromatografie uvádí následující obrázek.



Obrázek 14: TLC chromatogram po čištění výtřepku  $\text{CHCl}_3$ -A

TLC deska Kieselgel G UV 254 nm Merck, dráha 8,5 cm, soustava EtOAc + MeOH 9 : 1, komora nasycená, vyvíjení 1×, detekce Dragendorffovým činidlem.

$\Sigma$  – původní chloroformový výtřepek alkaloidů z nati

1 – čištění na  $\text{Al}_2\text{O}_3$  – eluce sloupce  $\text{CHCl}_3$

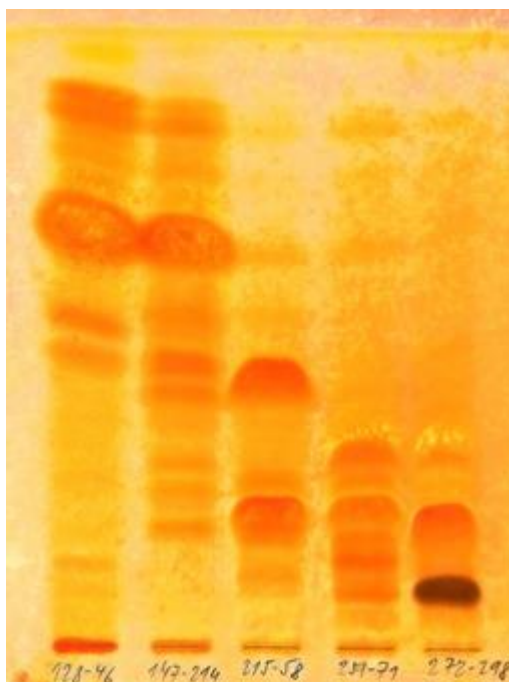
2 – čištění na  $\text{Al}_2\text{O}_3$  – eluce sloupce  $\text{CHCl}_3$  + EtOH 9 : 1

#### 4.4.2.3 Sloupcová chromatografie předčištěného výtřepku $\text{CHCl}_3$ -A

Tabulka 9: Preparativní sloupcová chromatografie předčištěného  $\text{CHCl}_3$ -A

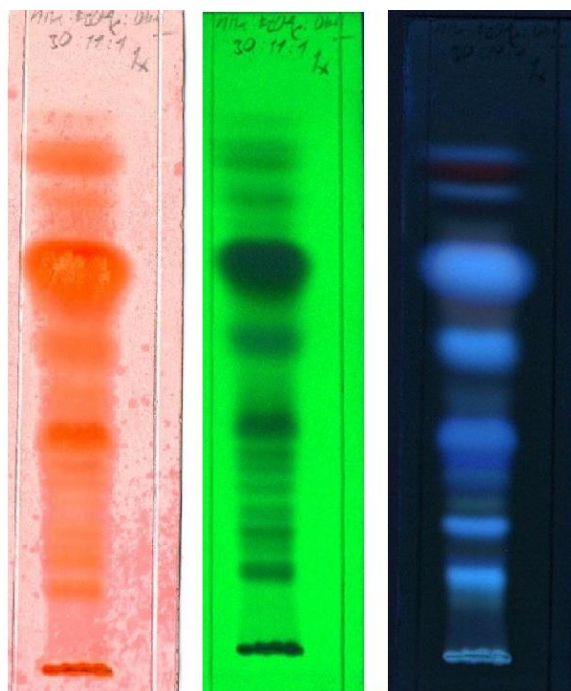
Množství odparku	200,0 g
$\text{CHCl}_3$ na rozpuštění odparku	300 ml
Adsorbent na roztěr	500 g
Adsorbent	Neutrální $\text{Al}_2\text{O}_3$ (100 $\mu\text{m}$ ) Sigma-Aldrich No. 199974-5 kg, deaktivovaný 6 % vody; 6,0 kg
Dělicí vrstva ve sloupci	$\varnothing$ 15 $\times$ 35 cm
Vrstva s extraktem	$\varnothing$ 15 $\times$ 2,9 cm
Frakce	500 ml
Počet frakcí	531
Doba toku jedné frakce	ca. 25 minut

Chromatografie byla provedena stupňovitou elucí rozpouštědly: Bz- $\text{CHCl}_3$ ,  $\text{CHCl}_3$ -EtOH a EtOH o stoupající eluční síle. Frakce byly monitorovány pomocí TLC v různých chromatografických soustavách. Pro další zpracování byly použity spojené frakce 147-214 (hnědý, velmi viskózní odparek, hmotnost 27,03 g), které byly ze sloupce eluovány směsí Bz +  $\text{CHCl}_3$  75 : 25 až 65 : 35.



Obrázek 15: Chromatogram spojených frakcí ze sloupcové chromatografie výtřepku  $\text{CHCl}_3$ -A (frakce 147-214 druhý chromatogram zleva)

TLC deska Kieselgel G UV 254 nm Merck, dráha 8,5 cm, soustava n-Hx + EtOAc +  $\text{Et}_2\text{NH}$  30 : 11 : 1, komora nasycená, vyvíjení 2 $\times$ , detekce Dragendorffovým činidlem.



Obrázek 16: Chromatogram frakce 147-214 z předčištěného výtřepku  $\text{CHCl}_3$ -A

TLC deska Kieselgel G UV 254 Merck, dráha 8,5 cm, soustava n-Hx + EtOAc +  $\text{Et}_2\text{NH}$  30 : 11 : 1, komora nasycená, vyvíjení 1x, detekce Dragendorffovo činidlo (vlevo), UV 254 nm (uprostřed) a 366 nm (vpravo).

#### 4.4.3 Sloupcová chromatografie spojených frakcí 147 – 214

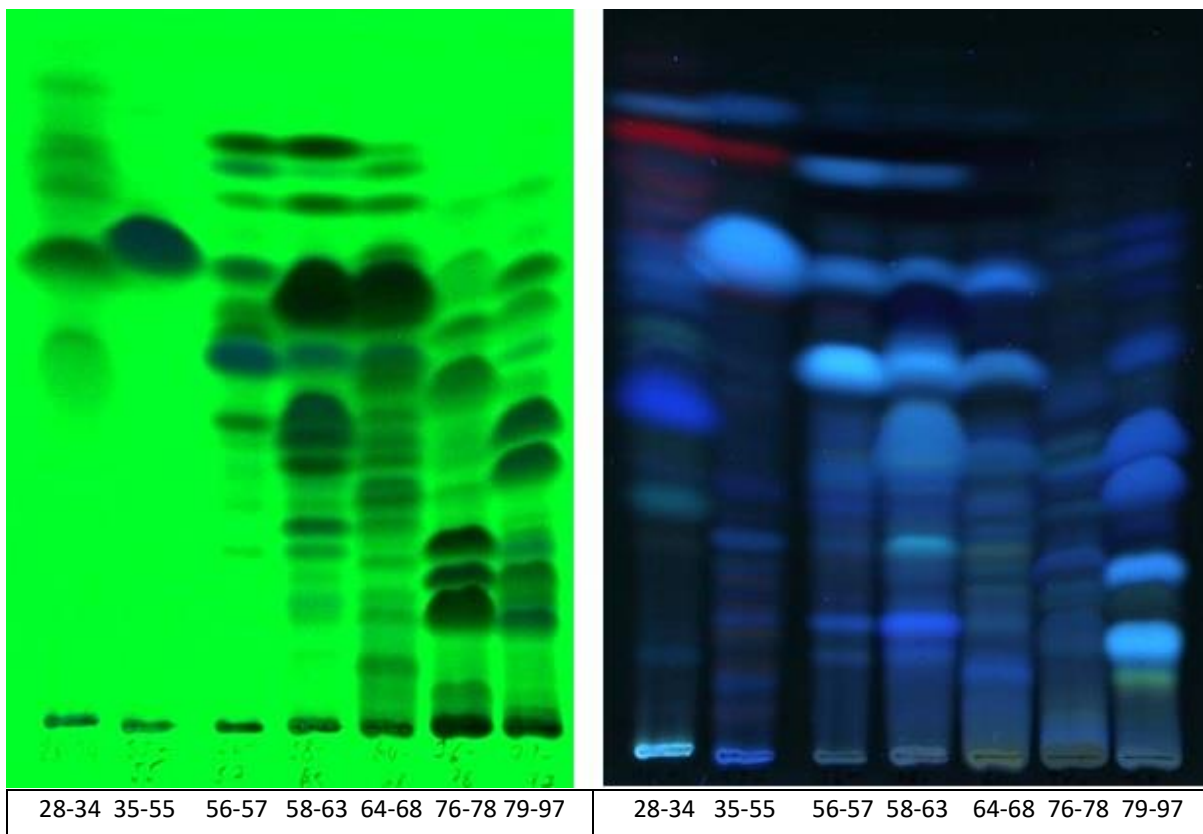
Chromatografie byla provedena stupňovitou elucí rozpouštědly Bz- $\text{CHCl}_3$ ,  $\text{CHCl}_3$ , a  $\text{CHCl}_3$ -EtOH o stoupající eluční síle. Frakce byly monitorovány za pomoci TLC v soustavě n-Hx + EtOAc +  $\text{Et}_2\text{NH}$  30 : 11 : 1. Pro další zpracování byly použity spojené frakce 28-34 (hnědý krystalický odparek, hmotnost 0,59 g), která byla ze sloupce eluována chloroformem (tab. 10-11).

Tabulka 10: Sloupcová chromatografie spojených frakcí 147-214

Množství odparku	26,9 g
Adsorbent na roztěr	83 g
Adsorbent	Silikagel Fluka 0,063-200 mm deaktivovaný 10 % vody
Dělicí vrstva ve sloupci	Ø 7 × 63 cm
Vrstva s extraktem	Ø 7 × 2,5 cm
Mrtvý objem	2200 ml
Frakce	500 ml
Počet frakcí	97
Doba toku jedné frakce	ca. 35-40 minut
Kontrolní TLC	Silikagel Merck UV 254 nm, dráha 60 mm, n-Hx + EtOAc + Et <sub>2</sub> NH 30 : 11 : 1, vyvíjení 2×, detekce UV 254 nm a Dragendorffovo činidlo

Tabulka 11: Sloupcová chromatografie spojených frakcí 147-214 – průběh chromatografie

Spojené frakce	Frakce	Eluční systém	Odparek (g)	Popis
1-27	1-21	CHCl <sub>3</sub> + Bz 80 : 20	0	0
	22-27	CHCl <sub>3</sub>	0	0
28-34	28-34	CHCl <sub>3</sub>	0,59	Hnědý, krystalický
35-55	35-37	CHCl <sub>3</sub>	11,82	Světle zeleno-hnědý, velmi viskózní, nafouklý
	38-53	CHCl <sub>3</sub> + 1 % EtOH		
	54-55	CHCl <sub>3</sub> + 2 % EtOH		
56-57	56-57	CHCl <sub>3</sub> + 2 % EtOH	1,36	Světle hnědý, řídký
58-63	58-63	CHCl <sub>3</sub> + 2 % EtOH	3,13	Světle hnědý, olejovitý
64-68	64-67	CHCl <sub>3</sub> + 2 % EtOH	1,02	Světle hnědý, hrubě krystalický
	68	CHCl <sub>3</sub> + 5 % EtOH		
69-75	69-75	CHCl <sub>3</sub> + 5 % EtOH	0,87	Světle hnědý, viskózní, drobně kryst.
76-78	76-78	CHCl <sub>3</sub> + 5 % EtOH	0,41	Světle hnědý, velmi viskózní
79-97	79-83	CHCl <sub>3</sub> + 5 % EtOH	2,38	Světle hnědý, velmi viskózní
	83-97	CHCl <sub>3</sub> + 10 % EtOH		
Celkem			21,58	



Obrázek 17: Kontrolní TLC spojených frakcí ze sumární alkaloidové frakce 147-214 ze sušené nati *Vinca minor* L.

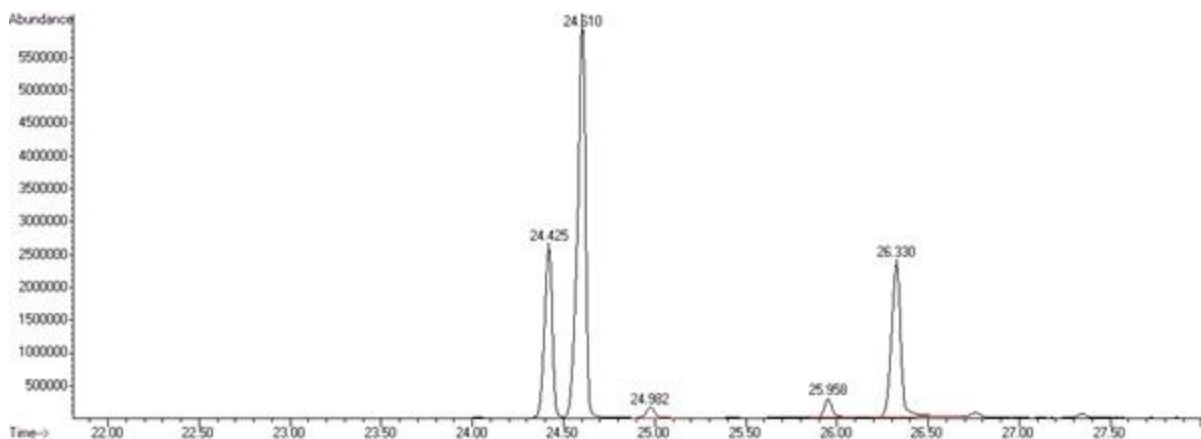
TLC deska Kieselgel G UV 254 Merck, dráha 8,5 cm, soustava n-Hx + EtOAc + Et<sub>2</sub>NH 30 : 11 : 1, komora nasycená, vyvíjení 2×, detekce UV 254 nm (vlevo) a 366 nm (vpravo).

Experimentální část popsaná výše byla provedena mimo rámec mé diplomové práce.

#### 4.4.4 Zpracování frakce 28-34

Z předchozí sloupcové chromatografie bylo získáno spojením frakcí 28-34 0,59 g hnědého odparku, který obsahoval široké spektrum látek (Obr. 17). K odparku bylo přidáno ca 0,4 ml 95% EtOH, roztok byl zahřán a ponechán krystalizovat. Vyloučila se světle okrová práškovitá látka. Suspenze byla zfiltrována přes mikro-Büchnerovu nálevku, zbytek na filtru byl promyt 95% EtOH a vysušen. Filtráty byly spojeny s matečným louhem.

Bylo získáno 29,3 mg bílé práškovité látky, označené LB-1 nealkaloidní látky (detekce Dragendorffovým činidlem byla negativní). Tato látka nebyla alkaloidní povahy a byla proto odložena pro pozdější řešení struktury. Po odpaření EtOH bylo získáno 540 mg viskózního nekystalizujícího odparku hnědočervené barvy. Výsledek je na obrázku 18.



Obrázek 18: GC/MS analýza matečného louhu spojených frakcí 28-34

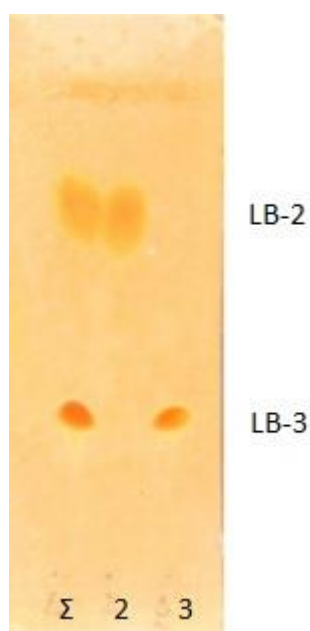
(Plynový chromatograf Agilent Technologies 7890A s Triple-Axis hmotnostním detektorem Agilent Technologies 5975C, nástřik při 280°C, V = 1 µl, split v poměru 15:1, kolona Agilent Technologies HP-5MS, 30 m × 0.250 mm při teplotním programu 15°C/min ze 100°C na 180°C, 1 min na 180°C, 5°C/min ze 180°C na 300°C, 40 min na 300°C, nosný plyn He 5.0 (Linde), průtok 0,8 ml/min. Ionizace proběhla při 230°C elektrony 70 eV, detekovány fragmenty v rozmezí 40-600 *m/z*). LB-2: *t<sub>r</sub>* = 24,51 min; LB-3: *t<sub>r</sub>* = 26,33 min. (tyto hodnoty byly potvrzeny po opětovné analýze čistých látek).

Tento odparek byl rozpuštěn v 11 ml chloroformu a roztok byl zfiltrován přes malou chromatografickou kolonu (průměr × výška = 1 × 5 cm) obsahující 5,5 g neutrálního Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, st. Aktivity III (deaktivovaný 6 % vody) a po této sorpci byla chromatografická kolona následně promyta ještě 8 ml chloroformu (kontrola eluce alkaloidů na papíře Dragendorffovým činidlem). Spojené filtráty byly zahuštěny obvyklým způsobem a vysušeny v exsikátoru. Vzniklo 465 mg světle hnědého nekystalujícího odparku.

Odparek byl rozpuštěn v 11 ml směsi CHCl<sub>3</sub> + EtOH 1 : 1 a separován pomocí TLC za následujících podmínek:

Tabulka 12: Podmínky TLC matečného louhu ze spojených frakcí 28-34

Adsorbent	Silufol UV 254 nm, 15 × 15 cm
Počet desek	65
Vyvíjecí dráha	13 cm
Soustava	To + Et <sub>2</sub> NH 96 : 4
Komora	Nasycená, 30 minut po nalití eluční soustavy
Vyvíjení	1×
Detekce	UV 254 nm (na odstřiženém proužku při okraji také Dragendorffovým činidlem)



Obrázek 19: TLC vyčištěné směsi látek ( $\Sigma$ ) a jednotlivých izolovaných sloučenin LB-2 a LB-3

TLC deska Kieselgel G UV 254 nm Merck, dráha 8,5 cm, soustava To + Et<sub>2</sub>NH 96 : 4, komora nasycená, vyvíjení 1×, detekce UV 254 nm, Dragendorffovo činidlo.

Jednotlivé zóny s látkami byly vyškrabány, adsorbent vsypán s příměsí křemeliny do Pasteurových pipet odpovídajících velikostí a promyt 20násobným množstvím elučního rozpouštědla (CHCl<sub>3</sub> + EtOH 1 : 1). Eluáty byly odpařeny a monitorovány pomocí TLC (Kieselgel G UV 254 Merck, dráha 8,5 cm, soustava To + Et<sub>2</sub>NH 96 : 4, komora nasycená, vyvíjení 1×, detekce UV 254 nm). Každý z odparků byl ještě jednou přečištěn za použití jmenované soustavy a výše uvedeného způsobu (postup jako při použití desek Silufol UV 254 nm) tak, že na 1 cm chromatografické desky bylo nanášeno maximálně 0,5 mg odparku. Výsledek ukazuje následující tabulka:

Tabulka 13: Výsledek preparativního dělení směsi alkaloidů z frakce 28-34

Látka	Hmotnost (mg)	Popis	Rekrystalizace	Hmotnost (mg)	Popis
LB-2	162	světle béžový	z MeOH	91	Bílý, práškový
LB-3	181	světle béžový	z MeOH	108	Bezbarvý, drobně krystalický

## 4.5 Obecné podmínky pro identifikaci izolovaných látek

### 4.5.1 Stanovení teploty tání

Teplota tání (t. t.) byla korigovaná a byla stanovena na přístroji Boëtius.

### 4.5.2 Měření optické otáčivosti

Optická otáčivost byla měřena ve 2 cm kyvetách na přístroji Perkin-Elmer 142 Automatic Spectropolarimeter a je uváděna při příslušné teplotě a koncentraci.

### 4.5.3 Měření hmotnostního spektra

Hmotnostní spektra pro předběžnou identifikaci alkaloidů byla zjištěna s použitím plynového chromatografu Agilent Technologies 7890A s Triple-Axis hmotnostním detektorem Agilent Technologies 5975C. Nástřik byl při 280°C, v objemu 1 µl a split v poměru 15:1. Dělení směsi proběhlo na koloně Agilent Technologies HP-5MS, 30 m × 0.250 mm při teplotním programu 15°C/min ze 100°C na 180°C, 1 min na 180°C, 5°C/min ze 180°C na 300°C, 40 min na 300°C. Nosný plyn byl He 5.0 (Linde) při průtoku 0,8 ml/min. Ionizace proběhla při 230°C elektrony 70 eV a detekovány byly fragmenty v rozmezí 40-600 *m/z*.

Alkaloidy byly předběžně identifikovány pomocí porovnávání jejich spekter se spektry dostupnými v komerční knihovně spekter NIST 11 (National Institute of Standards and Technology Library, USA), v literatuře a se standardy izolovanými v laboratoři KFBE.



#### 4.5.4 Nukleární magnetická rezonance

Spektra NMR ( $^1\text{H}$ -NMR a  $^{13}\text{C}$ -NMR) byla měřena v roztocích látek v  $\text{CDCl}_3$  s použitím přístroje Bruker Avance DRX 500 Spectrometer operating (500 a 125 MHz), jako vnitřní standard byl použit tetramethylsilan (TMS). Chemické posuny ( $\delta$ ) jsou vyjádřeny v ppm a interakční konstanty (J) v Hz.

#### 4.6 Stanovení cholinesterasové inhibiční aktivity ( $\text{IC}_{50}$ )

Pro stanovení hodnoty  $\text{IC}_{50}$  byla použita Ellmanova spektrofotometrická metoda s použitím 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoové kyseliny (DTNB)<sup>87</sup>. Jako substrát byly použity estery thiocholinu. Ty jsou štěpeny cholinesterasami za vzniku žlutě zbarvených produktů. Následně se spektrofotometricky stanoví nárůst absorbance za 1 minutu při dané vlnové délce (AChE  $\lambda = 436 \text{ nm}$ ; BChE  $\lambda = 412 \text{ nm}$ ).

Pro stanovení aktivity izolovaných látek se do mikrotitračních destiček napipetuje 8,3  $\mu\text{l}$  krevní plazmy (BChE) nebo hemolyzátu (AChE), přidá se 283  $\mu\text{l}$  5 mM DTNB a 8,3  $\mu\text{l}$  roztoku látek v DMSO v klesající koncentraci 40,0; 10,0; 4,0; 1,0 a 0,4 mM. Směs se po 1 minutovém promíchání v mikrotřepačce inkubuje v komoře readeru přístroje při 37 °C po dobu 5 minut. Poté se přidá 33,3  $\mu\text{l}$  roztoku substrátu (10mM acetylthiocholinjodidu nebo 10mM butyrylthiocholinjodidu) a po 2 minutách se odečtou příslušné hodnoty absorbance. Takto bylo změřeno 6 řad po 3 jamkách pro každou koncentraci stanovované látky včetně DMSO jako slepého vzorku.

Hodnoty  $\text{IC}_{50}$  byly vypočítány z naměřených hodnot poklesu aktivity AChE nebo BChE v programu GraphPad Prism. Stanoven byl průměr se směrodatnou odchylkou. Výsledky byly porovnány s hodnotami  $\text{IC}_{50}$  známých inhibitorů cholinesteras: galanthaminem, huperzinem A a eserinem. Procenta inhibice (% I) byla přepočtena podle vzorce:

$$\% I = 100 - (\Delta A_{\text{BL}} / \Delta A_{\text{SA}}) * 100$$

Kde:  $\Delta A_{\text{BL}}$  – nárůst absorbance slepého vzorku za 1 minutu

$\Delta A_{\text{SA}}$  – nárůst absorbance měřeného vzorku

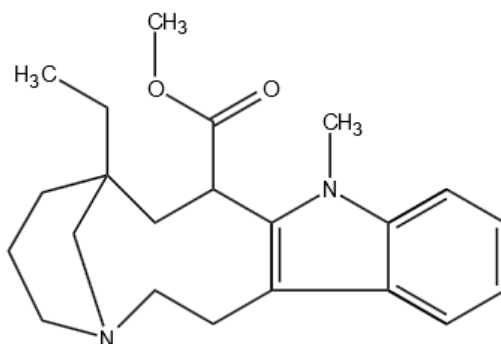
## 5 VÝSLEDKY

### 5.1 Identifikace izolovaných látek

Na základě výsledků z hmotnostní spektrometrie (MS) a nukleární magnetické rezonance, po porovnání s literaturou, byly izolované látky LB-2 a LB-3 identifikovány jako (+)-vinkaminorein a (+)-vinkamin.

#### 5.1.1 Struktura izolované látky LB-2

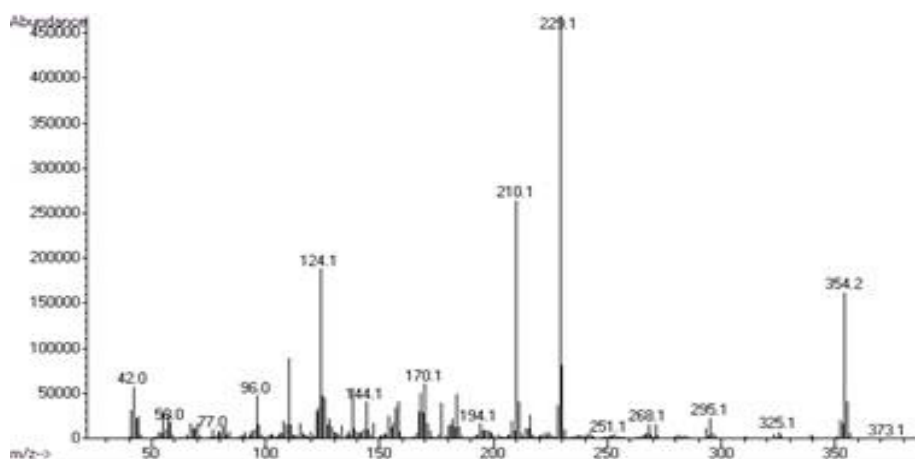
Na základě spektrální analýzy byla tato látka identifikována jako (+)-vinkamonorein (CAS 2411-51-0). Bílá, práškovitá látka, t. t. 125-126 °C,  $[\alpha]_D^{22} +26,1$  (c = 1,01; měřeno v CHCl<sub>3</sub>).



Obrázek 20: (+)-Vinkaminorein

##### 5.1.1.1 MS analýza

$m/z$  (rel. int.): 354 (83, M<sup>+</sup>), 399 (3), 325 (3), 295 (8), 268 (9), 229 (100), 210 (60), 184 (13), 170 (19), 149 (9), 124 (43).



Obrázek 21: MS spektrum (+)-vinkaminoreinu

### 5.1.1.2 <sup>1</sup>H-NMR analýza

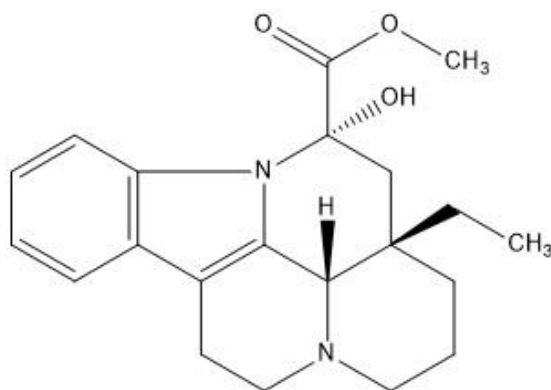
<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 7,50 (d, J = 7.1, 1H, H-9), 7,24 (1H, H-12), 7,17 (t, J = 7, 1H, H-10), 7,07 (t, J = 7, 1H, H-11), 3,70 (s, 3H, OMe), 3,52 (s, 3H, NMe), 3,16 (d, J = 15, 1H, H-21a), 2,93–2,95 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-17), 2,49–2,51 (m, 1H, H-3a), 2,29–2,33 (m, 1H, H-5a), 2,27–2,29 (m, 1H, H-5b), 2,24–2,27 (m, 1H, H-3b), 1,93–1,96 (m, 1H, H-16), 1,61 (d, J = 15, 1H, H-21b), 1,47–1,54 (m, 1H, H-14a), 1,36–1,41 (m, 1H, H-6a), 1,30–1,35 (m, 1H, H-15a), 1,25–1,29 (m, 1H, H-14b), 1,20–1,25 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-19), 1,18–1,20 (m, 1H, H-15b), 1,16–1,18 (m, 1H, H-6b), 0,93 (t, J = 7.2, 3H, Me-18).

### 5.1.1.3 <sup>13</sup>C-NMR analýza

<sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 175,17 (CO), 139,27 (C-2), 136,74 (C-13), 127,05 (C-8), 120,59 (C-10), 118,49 (C-11), 117,96 (C-9), 109,96 (C-7), 108,59 (C-12), 57,88 (C-21), 55,27 (C-5), 53,29 (C-3), 52,48 (OMe), 34,21 (C-6), 33,79 (C-16), 31,01 (C-15), 30,23 (NMe), 24,88 (C-20), 22,45 (C-17), 22,32 (C-14), 14,19 (C-19), 7,39 (C-18) (13).

## 5.1.2 Struktura izolované látky LB-3

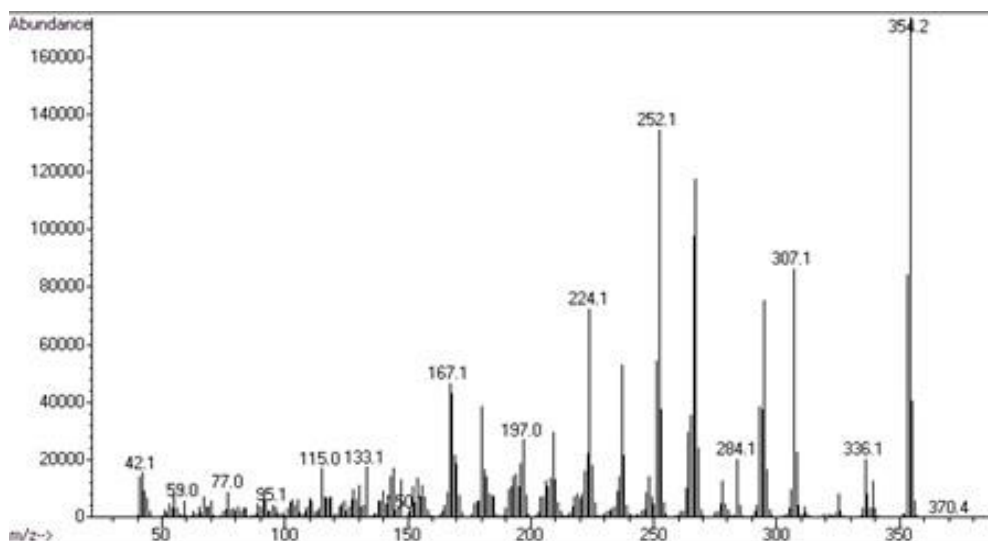
Na základě výsledků spektrální analýzy vyplynulo, že se jedná o (+)-vinkamin (CAS 1617-90-9). Bílá, drobně krystalická látka, t. t. 230-232 °C, [α]<sub>D</sub><sup>22</sup> +15,1 (c = 0,11; měřeno v AcOH).



Obrázek 22: (+)-Vinkamin

### 5.1.2.1 MS analýza

$m/z$  (rel. int.): 354 (100,  $M^+$ ), 339 (16), 325 (14), 307 (31), 295 (45), 284 (13), 267 (51), 252 (87), 237 (27), 224 (40), 209 (17), 180 (22), 167 (27), 149 (13), 133 (13), 115 (11).



Obrázek 23: MS spektrum (+)-vinkaminu

### 5.1.2.2 $^1\text{H}$ -NMR analýza

$^1\text{H}$ -NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 7,47–7,49 (m, 1H, H-9), 7,09–7,13 (m, 3H, H-10, H-11 and H-12), 4,57 (s, 1H, 14-OH), 3,92 (s, 1H, H-3), 3,82 (s, 3H, OMe), 3,32–3,35 (m, 1H, H-5a), 3,28–3,31 (m, 1H, H-5b), 2,95–3,02 (m, 1H, H-6a), 2,58–2,63 (m, 1H, H-6b), 2,54–2,57 (m, 1H, H-19a), 2,49–2,51 (m, 1H, H-19b), 2,25–2,27 (m, 1H, H-20a), 2,22 (d,  $J = 15.1$ , 1H, H-15a), 2,12 (d,  $J = 15.1$ , 1H, H-15b), 1,70–1,75 (m, 1H, H-17a), 1,66–1,69 (m, 1H, H-18a), 1,47–1,50 (m, 1H, H-20b), 1,42–1,46 (m, 1H, H-17b), 1,35–1,38 (m, 1H, H-18b), 0,91 (t,  $J = 7.2$ , 3H, Me-21).

### 5.1.2.3 $^{13}\text{C}$ -NMR analýza

$^{13}\text{C}$ -NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 174,89 (CO), 134,56 (C-13), 132,89 (C-8), 129,39 (C-2), 122,13 (C-10), 120,71 (C-12), 118,92 (C-9), 110,75 (C-11), 106,34 (C-7), 82,32 (C-14), 59,59 (C-3), 54,73 (OMe), 51,40 (C-5), 45,01 (C-19), 44,83 (C-15), 35,56 (C-16), 29,32 (C-20), 25,51 (C-18), 21,16 (C-17), 17,25 (C-6), 8,01 (C-21) (17, 18).

## 5.2 Stanovení inhibiční aktivity vůči AChE a BChE

Tabulka 14: *In vitro* inhibiční aktivita (IC<sub>50</sub>) izolovaných látek

Látka	AChE (μM)	BChE (μM)
(+)-vinkaminorein	1730 ± 393,35	8,71 ± 0,49
(+)-vinkamin	>5000	3782,67 ± 1788,54
galanthamin <sup>a</sup>	1,710 ± 0,065	42,30 ± 1,30
huperzin A <sup>a</sup>	0,033 ± 0,001	>1000
eserin <sup>a</sup>	0,063 ± 0,001	0,130 ± 0,004

<sup>a</sup> referenční látky

## 6 DISKUSE

V rámci mé diplomové práce jsem zpracoval frakci 28-34 ze sumárního alkaloidového extraktu *Vinca minor* L. Z výše uvedeného extraktu jsem izoloval dvě látky (LB-2 a LB-3), které byly dále identifikovány. Pomocí spektrální analýzy MS a NMR a fyzikálně-chemických metod byly látky identifikovány jako (+)-vinkaminorein (LB-2) a (+)-vinkamin (LB-3). Látky byly podrobeny *in vitro* testování na inhibiční aktivitu vůči lidským cholinesterasám.

Vinkamin je typický alkaloid rodu *Vinca* L. z čeledi Apocynaceae, nachází se v druzích *V. minor*, *V. major*, *V. herbacea*, *V. erecta* a *V. difformis*<sup>64</sup>. Dále byl vinkamin nalezen u druhů *Tabernaemontana rigida*, *Aspidosperma album*, *Rhazya stricta* a *Ambelania occidentalis* z čeledi Apocynaceae<sup>88, 89, 90</sup>. U druhu *Vinca minor* je převažujícím alkaloidem<sup>56</sup>.

Význam vinkaminu spočívá v jeho účincích na CNS a kardiovaskulární systém. První studie ukázaly pozitivní vliv na KVS snížením krevního tlaku, srdečního výdeje a srdeční frekvence. U pacientů trpících bolestmi hlavy, závratí nebo vertigem došlo po podání vinkaminu ke zlepšení stavu, to je vysvětleno dilatačním účinkem na mozkové cévy<sup>77</sup>. Na zvířecích modelech u krys bylo zjištěno silný blok napěťově řízených Na<sup>+</sup> kanálů v CNS. Vinkamin takto působí neuroprotektivně proti otravám neurotoxickými jedy, má určité antikonvulzivní účinky a může omezit následky akutních ischemií<sup>78</sup>. Studie se 17 pacienty s poruchou krevní cirkulace v mozku ukázala po injekčním podání vinkaminu zlepšení hemodynamiky v ischemických částech mozku<sup>77</sup>. Zaměření další studie bylo na terapeutické účinky u pacientů s primární degenerativní nebo s vaskulární demencí. Na základě různých hodnotících kritérií měli pacienti užívající vinkamin statisticky lepší výsledky těchto testů oproti kontrolní skupině s placebem<sup>80</sup>. Vliv na spánek u kočky ukázal zvýšení podílu tzv. paradoxního spánku, tento efekt může souviset se zlepšením paměťových funkcí. Jiná studie u pacientů s vaskulární demencí sledovala účinky vinkaminu na chování, schopnost učení a na vjemově-motorickou aktivitu. Výsledky ukázaly výrazné zlepšení těchto parametrů<sup>77</sup>. V nižších dávkách byla pozorována antioxidační a protizánětlivá aktivita<sup>79</sup>. Vinkamin vykazuje také určitou antibakteriální a antivirovou aktivitu<sup>91</sup>.

Testování inhibiční aktivity vůči cholinesterasám popsané v literatuře, ukázalo určité působení na AChE a BChE, avšak z klinického hlediska spíše nevýznamné<sup>79, 92</sup>. V prvním případě u laboratorní krysy při uměle navozené neurotoxicitě vedlo podání 20 mg/kg vinkaminu ke snížení aktivity AChE o 39,1 %, u BChE způsobila dávka 10 mg/kg pokles aktivity o 42,8 %<sup>79</sup>.

V druhém případě byla zkoumána aktivita *in vitro*, koncentrace 1 mg/ml vinkaminu nevedla k inhibici AChE, aktivita proti koňské sérové BChE byla pouze  $28.5 \pm 2.01 \%$ <sup>92</sup>. Měření aktivity (+)-vinkaminu, izolovaného v rámci mé práce, neukázalo téměř žádnou inhibici lidských cholinesteras.

V klinické praxi se vinkamin využívá jako nootropikum. Zvyšuje prokrvení mozku, spotřebu kyslíku a využití glukózy v CNS. Zlepšuje tedy metabolismus v CNS a má neuroprotektivní účinek. Užívá se k prevenci a léčbě poruch prokrvení mozku, při poruchách paměti, proti bolestem hlavy a proti vertigu<sup>8,93</sup>. Vinkamin se snadno absorbuje po p. o. podání a jeho biologický poločas jsou přibližně 2 hodiny. Z velké části je metabolizován, pouze 6-7 % látky je vyloučeno močí v nezměněné formě. Hlavní metabolická cesta je štěpením esterové vazby<sup>77</sup>. V zahraničí je vinkamin dostupný jako léčivo nebo jako doplněk stravy, vyrábějí se také kombinované přípravky s piracetamem jako nootropika<sup>93,94</sup>.

Z vinkaminu je odvozen jeho semisyntetický derivát vinpocetin, hojně využívané nootropikum. Má srovnatelné účinky jako vinkamin, navíc chrání neurony před toxickými účinky glutamátu a *N*-methyl-D-aspartátu<sup>9</sup>.

Vinkaminorein je indolový alkaloid izolovaný z rostliny *Vinca minor* (Apocynaceae)<sup>64</sup>. Vyskytuje se především v listech rostliny<sup>95</sup>. *In vitro* testování ukázalo cytotoxické působení vinkaminoreinu na leukemické buňky P388. Mechanismus působení spočívá v inhibici tvorby buněčné RNA, tím je narušena syntéza proteinů a růst buněk leukemie je tak potlačen. Epimer vinkaminoreinu, vinkaminorin naopak inhibuje syntézu buněčné DNA, čímž také zasahuje do buněčného růstu<sup>96</sup>. V minulosti byl vinkaminorein, včetně dalších alkaloidů, využíván ke studiu biosyntézy indolových alkaloidů *V. minor*<sup>97,98,99</sup>. (+)-Vinkaminorein získaný v rámci mé práce vykazoval silnou inhibici sérové BChE, na aktivitu AChE působil minimálně.

Izolované alkaloidy byly otestovány na inhibiční aktivitu proti AChE a BChE. Výsledky ukázaly, že (+)-vinkamin prakticky nepůsobí inhibičně na cholinesterasy a není tedy zajímavý pro další studium jako inhibitor cholinesteras. (+)-vinkaminorein naproti tomu ukázal relativně selektivní inhibici BChE ( $IC_{50}$ :  $8,71 \pm 0.49 \mu M$ ) a mohl by tak být atraktivní pro další výzkum v oblasti látek ovlivňujících průběh AN.

## 7 SEZNAM LITERATURY

---

- <sup>1</sup> World Health Organisation: *Dementia a public health priority*. World Health Organisation, Geneva (2012).
- <sup>2</sup> Prince M., Wimo A., Guerchet M., Ali G. C., Wu Y. T., Prina M.: *World Alzheimer Report 2015: The Global Impact of Dementia*. Alzheimer's Disease International, London 2015.
- <sup>3</sup> Sheardová K., Hort J., Rusina R., Bartoš A., Línek V., Rössner P., Rektorová I.: Doporučené postupy pro léčbu Alzheimerovy nemoci a dalších onemocnění spojených s demencí. *Cesk. Slov. Neurol. N. 70/103*, 589–94 (2007).
- <sup>4</sup> Hosoi M., Hori K., Konishi K., Tani M., Tomioka H., Kitajima Y., Akashi N., Inamoto A., Minami S., Izuno T., Umezawa K., Horiuchi K., Hachisu M.: Plasma Cholinesterase Activity in Alzheimer's Disease. *Neurodegener. Dis. 15*, 188–90 (2015).
- <sup>5</sup> Giacobini E.: Selective inhibitors of butyrylcholinesterase: a valid alternative for therapy of Alzheimer's disease? *Drugs Aging 18*, 891–8 (2001).
- <sup>6</sup> Wong S. K., Lim Y. Y., Chan E. W.: Botany, uses, phytochemistry and pharmacology of selected Apocynaceae species: A review. *Pharmacog. Commun. 3*, 2–11 (2013).
- <sup>7</sup> Jahodář L.: *Farmakobotanika: semenné rostliny*. Karolinum, Praha 2006.
- <sup>8</sup> Farahanikia B., Akbarzadeh T., Jahangirzadeh A., Yassa N., Shams Ardekani M. R., Mirnezami T., Hadjiakhoondi A., Khanavi M.: Phytochemical Investigation of *Vinca minor* Cultivated in Iran. *Iran. J. Pharm. Res. 10*, 777–85 (2011).
- <sup>9</sup> Jha M. K., Rahman M. H., Sheikh H.: Vinpocetine: a smart drug and a smart nutrient: a review. *Int. J. Pharm. Sci. Res. 3*, 346–52 (2012).
- <sup>10</sup> Bahadori F., Topcu G., Boga M., Türkekul A., Kolak U., Kartal M.: Indole alkaloids from *Vinca major* and *V. minor* growing in Turkey. *Nat. Prod. Commun. 7*, 731–4 (2012).
- <sup>11</sup> Pidrman V.: *Demence*. Grada Publishing, Praha 2007.
- <sup>12</sup> Koukolík F., Jiráček R.: *Alzheimerova nemoc a další demence*. Grada Publishing, Praha 1998.



- <sup>13</sup> Mátl O., Mátlová M.: *Zpráva o stavu demence 2015*. Česká Alzheimerovská Společnost, Praha 2015.
- <sup>14</sup> Jirák R., Koukolík F.: *DEMENCE Neurobiologie, klinický obraz, terapie*. Galén, Praha 2004.
- <sup>15</sup> Bartoš A., Hasalíková M.: *Poznejte demence správně a včas – příručka pro klinickou praxi*. Mladá fronta, Praha 2010.
- <sup>16</sup> Jirák R., Holmerová I., Borzová C.: *Demence a jiné poruchy paměti*. Grada Publishing, Praha 2009.
- <sup>17</sup> Cahlíková L., Macáková K., Benešová N., Chlebek J., Hošťálková A., Opletal L.: Natural Compounds (Small Molecules) as Potential and Real Drugs of Alzheimer's Disease: A Critical Review. *Stud. Nat. Prod. Chem.* 42, 153–94 (2014).
- <sup>18</sup> Zeman M., Jirák R.: Alzheimerova choroba a diabetes mellitus typu 2. *Neurol. Prax* 13, 105–8 (2012).
- <sup>19</sup> Simoncini C., Orsucci D., Caldarazzo Ienco E., Siciliano G., Bonuccelli U., Mancuso M.: Alzheimer's pathogenesis and its link to the mitochondrion. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2015, 803942 (2015).
- <sup>20</sup> Wang X., Wang W., Li L., Perry G., Lee H. G., Zhu X.: Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease. *Biochim Biophys. Acta* 1842, 1240–7 (2014).
- <sup>21</sup> Polgar L., Szeltner Z.: Structure, function and biological relevance of prolyl oligopeptidase. *Curr. Protein Pept. Sci.* 9, 96–107 (2008).
- <sup>22</sup> Rössner P., Hort J., Rektorová I., Bartoš A., Rusina R., Línek V., Sheardová K.: Doporučené postupy pro diagnostiku Alzheimerovy nemoci a dalších onemocnění spojených s demencí. *Cesk. Slov. Neurol. N.* 71/104, 494–501 (2008).
- <sup>23</sup> Růžička E.: *Diferenciální diagnostika a léčba demencí*. Galén, Praha 2003.
- <sup>24</sup> Jirák R.: Farmakoterapie Alzheimerovy choroby. *Prakt. Lékáren.* 5, 176–8 (2009).
- <sup>25</sup> Vališ M., Caisberger F., Šimůnek L., Linková H.: Farmakoterapie demencí – pokroky v léčbě a aktuální doporučení. *Remedia* 23, 396–9 (2013).

- <sup>26</sup> Pohanka M.: Acetylcholinesterase inhibitors: a patent review (2008 – present). *Expert Opin. Ther. Patents* 22, 871–86 (2012).
- <sup>27</sup> <http://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?kod=0197105>, staženo 1. července 2016.
- <sup>28</sup> Martin J., Kršková Z., Dušek J.: Huperzin A a jiné přírodní látky v léčbě Alzheimerovy choroby. *Prakt. Lékáren.* 7, 39–41 (2011).
- <sup>29</sup> Drtinová L., Pohanka M.: Možnosti využití huperzinu A v léčbě Alzheimerovy nemoci. *Chem. Listy* 107, 12–15 (2013).
- <sup>30</sup> Zangara A.: The psychopharmacology of huperzine A: an alkaloid with cognitive enhancing and neuroprotective properties of interest in the treatment of Alzheimer's disease. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 75, 675–86 (2003).
- <sup>31</sup> Opletal L., Chlebek J., Macáková K., Benešová N., Hošťálková A., Cahlíková L.: Antioxidanty a degenerativní onemocnění. *Prakt. Lékáren.* 9, 135–8 (2013).
- <sup>32</sup> Pydychová E.: Alzheimerova nemoc. SOLEN 2002/2003. Dostupné z <http://www.medon-solutio.cz>, staženo 18. června 2016.
- <sup>33</sup> Vališ M., Kalnická D.: Novinky ve farmakoterapii demencí. *Neurol. Pro Praxi* 12, 33–36 (2011).
- <sup>34</sup> Pohanka M.: Butyrylcholinesterase as a biochemical marker. *Bratisl. Lek. Listy* 114, 726–34 (2013).
- <sup>35</sup> Pohanka M.: Cholinesterases, a target of pharmacology and toxicology. *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czech Repub.* 155, 219–30 (2011).
- <sup>36</sup> Patočka J., Kuča K., Jun D.: Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase – important enzymes of human body. *Acta Med. (Hradec Kralove, Czech Repub.)* 47, 215–28 (2004).
- <sup>37</sup> Masson P., Lockridge O.: Butyrylcholinesterase for protection from organophosphorus poisons: catalytic complexities and hysteretic behavior. *Arch. Biochem. Biophys.* 494, 107–120 (2010).

- <sup>38</sup> Darvesh S.: Butyrylcholinesterase radioligands to image Alzheimer's disease brain. *Chem. Biol. Interact.* *203*, 354–7 (2013).
- <sup>39</sup> Darvesh S., Hopkins D. A., Geula C.: Neurobiology of butyrylcholinesterase. *Nat. Rev. Neurosci.* *4*, 131–8 (2003).
- <sup>40</sup> Lockridge O.: Review of human butyrylcholinesterase structure, function, genetic variants, history of use in the clinic, and potential therapeutic uses. *Pharmacol. Ther.* *148*, 34–46 (2015).
- <sup>41</sup> Pohanka M.: Inhibitors of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase meet immunity. *Int. J. Mol. Sci.* *15*, 9809–25 (2014).
- <sup>42</sup> Ji H. F., Shen L.: Berberine: a potential multipotent natural product to combat Alzheimer's disease. *Molecules* *16*, 6732–40 (2011).
- <sup>43</sup> Ahmed F., Ghalib R. M., Sasikala P., Ahmed K. K.: Cholinesterase inhibitors from botanicals. *Phcog. Rev.* *7*, 121–30 (2013).
- <sup>44</sup> Orhan I., Sener B., Choudhary M. I., Khalid A.: Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory activity of some Turkish medicinal plants. *J. Ethnopharmacol.* *91*, 57–60 (2004).
- <sup>45</sup> Chlebek J., Macáková K., Cahlíková L., Kurfürst M., Kuneš J., Opletal L.: Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory compounds from *Corydalis Cava* (Fumariaceae). *Nat. Prod. Commun.* *6*, 607–10 (2011).
- <sup>46</sup> Cahlíková L., Opletal L., Kurfürst M., Macáková K., Kulhánková A., Hošťálková A.: Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory compounds from *Chelidonium majus* (Papaveraceae). *Nat. Prod. Commun.* *5*, 1751–4 (2010).
- <sup>47</sup> <http://botany.cz/cs/vinca-minor/>, staženo 6. července 2016.
- <sup>48</sup> [http://apps.faf.cuni.cz/daidalea/imgdetail.asp?img=images/plant/middlesized/Vinca\\_minor\\_květ.JPG](http://apps.faf.cuni.cz/daidalea/imgdetail.asp?img=images/plant/middlesized/Vinca_minor_květ.JPG), staženo 8. července 2016.
- <sup>49</sup> <http://botanika.wendys.cz/index.php/14-herbar-rostlin/7-vinca-minor-barvinek-mensi>, staženo 6. července 2016.

- <sup>50</sup> <http://www.kvetenacr.cz/detail.asp?IDdetail=140>, staženo 6. července 2016.
- <sup>51</sup> Kresánek J. st., Kresánek J. ml.: *Atlas léčivých rostlín a lesných plodov*. Osveta, Martin 2008.
- <sup>52</sup> Štalmach V.: Nie je *Vinca* ako *Vinca*, alebo dva príbehy (2). Zimozeleň menšia. *Liečivé rastliny* 49, 193–4 (2012).
- <sup>53</sup> Baloun J., Jahodář L., Leifertová I., Štípek S.: *Rostliny způsobující otravy a alergie*. Avicenum, Praha 1989.
- <sup>54</sup> <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/vincamine#section=Drug-and-Medication-Information>, staženo 6. července 2016.
- <sup>55</sup> Kostenyuk I. A., Lubaretz O. F., Endress S., Stöckigt J., Gleba Y. Y.: Somatic Hybridization in the Family Apocynaceae (*Catharanthus*, *Rauwolfia*, *Rhazya*, and *Vinca* Species), v knize: *Somatic Hybridization in Crop Improvement I* (Bajaj Y. P. S, ed), Springer Berlin Heidelberg, Heidelberg 1994.
- <sup>56</sup> Blaschek W., Hilgenfeldt U., Holzgrabe U., Reichling J., Ruth P., Schulz V. (Eds): *Hager ROM 2011: Hagers Enzyklopädie der Arzneistoffe und Drogen*. Springer Medizin Verlag, Heidelberg 2011.
- <sup>57</sup> <http://www.theplantlist.org/1.1/browse/A/Apocynaceae/Vinca/>, staženo 8. července 2016.
- <sup>58</sup> O'Connor S. E., Maresh J. J.: Chemistry and biology of monoterpene indole alkaloids biosynthesis. *Nat. Prod. Rep.* 23, 532–47 (2006).
- <sup>59</sup> Cheng G. G., Zhao Y. L., Zhang Y., Lunga P. K., Hu D. B., Li Y., Gu J., Song Ch. W., Sun W. B., Liu Y. P., Luo X. D.: Indole alkaloids from cultivated *Vinca major*. *Tetrahedron* 70, 8723–29 (2014).
- <sup>60</sup> Boga M., Kolak U., Topcu G., Bahadori F., Kartal M., Farnsworth N. R.: Two new indole alkaloids from *Vinca herbacea* L. *Phytochem. Lett.* 4, 399–403 (2011).
- <sup>61</sup> Džubák P., Šarek J., Cwiertka K., Hajdúch M., Vydra D.: Biologické účinky triterpenoidů: biologické, antimikrobiální, hepatoprotektivní, analgetické a další farmakologické aktivity. *Klin. Farmakol. Farm.* 18, 96–101 (2004).

- <sup>62</sup> Calderón-Montano J. M., Burgos-Morón E., Pérez-Guero C., López-Lázaro M.: A review on the dietary flavonoid kaempferol. *Mini Rev. Med. Chem.* **11**, 298–344 (2011).
- <sup>63</sup> D’Andrea G.: Quercetin: A flavonol with multifaceted therapeutic applications? *Fitoterapia* **106**, 256–71 (2015).
- <sup>64</sup> Malikov V. M., Yunusov S. Y.: Vinca alkaloids. *Chem. Nat. Compd.* **13**, 497–512 (1977).
- <sup>65</sup> Shang J. H., Cai X. H., Feng T., Zhao Y. L., Wang J. K., Zhang L. Y., Yan M., Luo X. D.: Pharmacological evaluation of *Alstonia scholaris*: anti-inflammatory and analgesic effects. *J. Ethnopharmacol.* **129**(2), 174–81 (2010).
- <sup>66</sup> Smith J. M., Moreno J., Boal B. W., Garg N. K.: Total synthesis of the akuammiline alkaloid picrinine. *J. Am. Chem. Soc.* **136**, 4504–7 (2014).
- <sup>67</sup> Shittu H., Gray A., Furman B., Young L.: Glucose uptake stimulatory effect of akuammicine from *Picralima nitida* (Apocynaceae). *Phytochem. Lett.* **3**, 53–55 (2010).
- <sup>68</sup> Menzies J. R., Paterson S. J., Duwiejua M., Corbett A. D.: Opioid activity of alkaloids extracted from *Picralima nitida* (fam. Apocynaceae). *Eur. J. Pharmacol.* **350**, 101–8 (1998).
- <sup>69</sup> Gülçin I., Beydemir S., Topal F., Gagua N., Bakuridze A., Bayram R., Gepdiremen A.: Apoptotic, antioxidant and antiradical effects of majdine and isomajdine from *Vinca herbacea* Waldst and kit. *J. Enzyme. Inhib. Med. Chem.* **27**, 587–94 (2012).
- <sup>70</sup> Kurmukov A. G., Akhmedkhodzhaeva Kh. G.: Pharmacological study of reserpine. *Farmakol. Alkaloidov Serdech. Glikozidov* **1971**, 33; *Chem. Abstr.* **77**, 109457 (1972).
- <sup>71</sup> Azimova S. S., Yunusov M. S. (Eds): *Natural Compounds: Alkaloids*. Springer New York, New York 2013.
- <sup>72</sup> Kurmukov A. G.: Pharmacology of the indole alkaloids akuammine, ajmaline, vinerine, and some derivatives of ervamine and pseudokopsinine. *Farmakol. Prir. Veschestv* **1978**, 32; *Chem. Abstr.* **91**, 49389 (1979).
- <sup>73</sup> Tagieva Z. D., Babaev N. A., Aliev A. M.: Study of the antiarrhythmic activity of vincamajine isolated from the essential oil of periwinkles growing in the Azerbaijan SSR. *Azerb. Med. Zh.* **56**, 11–15 (1979); *Chem. Abstr.* **93**, 37425 (1980).

- <sup>74</sup> Akhgari A., Laakso I., Seppänen-Laakso T., Yrjönen T., Vuorela H., Oksman-Caldentey K. M., Rischer H.: Determination of terpenoid indole alkaloids in hairy roots of *Rhazya stricta* (Apocynaceae) by GC-MS. *Phytochem. Anal.* **26**, 331–8 (2015).
- <sup>75</sup> Zhang L., Zhang C. J., Zhang D. B., Wen J., Zhao X. W., Li Y., Gao K.: An unusual indole alkaloid with anti-adenovirus and anti-HSV activities from *Alstonia scholaris*. *Tetrahedron Lett.* **55**, 1815–17 (2014).
- <sup>76</sup> Bhattacharya S. K., Bose R., Dutta S. C., Ray A. B., Guha S. R.: Neuropharmacological studies on strictamine isolated from *Alstonia scholaris*. *Indian J. Exp. Biol.* **17**, 598–600 (1979).
- <sup>77</sup> Vas Á., Gulyás B.: Eburnamine derivatives and the brain. *Med. Res. Rev.* **25**, 737–57 (2005).
- <sup>78</sup> Erdo S. A., Molnár P., Lakics V., Bence J. Z., Tömösközi Z.: Vincamine and vincanol are potent blockers of voltage-gated Na<sup>+</sup> channels. *Eur. J. Pharmacol.* **314**, 69–73 (1996).
- <sup>79</sup> Abdel-Salam O. M. E., Hamdy S. M., Seadawy S. A. M., Galal A. F., Abouelfadl D. M., Atrees S. S.: Effect of piracetam, vincamine, vinpocetine, and donepezil on oxidative stress and neurodegeneration induced by aluminum chloride in rats. *Comp. Clin. Pathol.* **25**, 305–18 (2016).
- <sup>80</sup> Fischhof P. K., Möslinger-Gehmayr R., Herrmann W. M., Friedmann A., Russmann D. L.: Therapeutic efficacy of vincamine in dementia. *Neuropsychobiology* **34**, 29–35 (1996).
- <sup>81</sup> Kelly G. S. (ed.): Vinpocetine. Monograph.: *Altern. Med. Rev.* **7**, 240–3 (2002).
- <sup>82</sup> Gedeon Richter Plc.: CAVINTON®: SPC - Souhrn údajů o přípravku, 2012. Dostupné z <http://www.sukl.cz/modules/medication/download.php?file=SPC28556.pdf&type=spc&as=cavinton-spc>, staženo 11. července 2016.
- <sup>83</sup> Szatmari S. Z., Whitehouse P. J.: Vinpocetine for cognitive impairment and dementia. *Cochrane Database Syst. Rev.* (1), CD003119 (2003).

- <sup>84</sup> Gavrilova S. I., Kolykhalov I. V., Fedorova Y. B., Selezneva N. D., Kalyn Y. B., Roshchina I. F., Odinak M. M., Emelin A. Y., Kashin A. V., Gustov A. V., Antipenko E. A., Korshunova Y. A., Davydova T. A., Messler G.: Potential of preventive treatment of Alzheimer's disease: results of a three-year prospective open comparative trial of the efficacy and safety of courses of treatment with cerebrolysin and cavinton in elderly patients with mild cognitive impairment syndrome. *Neurosci. Behav. Physiol.* **41**, 391–8 (2011).
- <sup>85</sup> Munier R.: Separation of alkaloids from their *N*-oxides by paper chromatography. *Bull. Soc. Chim. Biol.* **35**, 1225–31 (1953).
- <sup>86</sup> Opletal L.: osobní sdělení.
- <sup>87</sup> Ellman G. L., Courtney K. D., Andres V. Jr, Feather-Stone R. M.: A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* **7**, 88 (1961).
- <sup>88</sup> Lounasmaa M., Tolvanen A.: Eburnamine-Vincamine Alkaloids, v knize *The Alkaloids: Chemistry and Pharmacology* (Cordell G. A., ed.), sv. 42 kap. 1. Academic Press, 1992.
- <sup>89</sup> Akhgari A., Laakso I., Seppänen-Laakso T., Yrjönen T., Vuorela H., Oksman-Caldentey K. M., Rischer H.: Determination of terpenoid indole alkaloids in hairy roots of *Rhazya stricta* (Apocynaceae) by GC-MS. *Phytochem. Anal.* **26**, 331–8 (2015).
- <sup>90</sup> Ayyad S. E. N., Basaif S. A., Al-Saggaf A. T., Alarif W. M.: Vincamine and 14-*epi*-vincamine indole alkaloids from *Ambelania occidentalis*. *J. Saudi Chem. Soc.* **16**, 419–22 (2012).
- <sup>91</sup> Özcelik B., Kartal M., Orhan I.: Cytotoxicity, antiviral and antimicrobial activities of alkaloids, flavonoids, and phenolic acids. *Pharm. Biol. (Abingdon, U. K.)* **49**, 396–402 (2011).
- <sup>92</sup> Orhan I., Naz Q., Kartal M., Tosun F., Sener B.: *In vitro* anticholinesterase activity of various alkaloids. *Z. Naturforsch.* **62**, 684–8 (2007).
- <sup>93</sup> Fandy T. E., Abdallah I., Khayat M., Colby D. A., Hassan H. E.: *In vitro* characterization of transport and metabolism of the alkaloids: vincamine, vinpocetine and eburnamonine. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **77**, 259–67 (2016).
- <sup>94</sup> <https://www.drugs.com/international/vincamine.html>, staženo 26. srpna 2016.

- <sup>95</sup> Proksa B., Grossmann E.: High liquid chromatographic determination of alkaloids from *Vinca minor* L. *Phytochem. Anal.* **2**, 74–6 (1991).
- <sup>96</sup> Sturdíková M., Fuksa J., Grossmann E., Votický Z.: New compounds with cytotoxic and antitumor effects. Part 6: Monomeric indole alkaloids of *Vinca minor* L. and their effect on P388 cells. *Pharmazie* **41**, 270–2 (1986).
- <sup>97</sup> Verzar-Petri G., Szarvas T., Varadi J.: Incorporation of tryptophan-2-<sup>14</sup>C in *Vinca minor* alkaloids. *Ann. Univ. Sci. Budap. Rolando Eotvos Nominatae, Sect. Biol.* **12**, 89–95 (1970).
- <sup>98</sup> Kutney J. P., Ehret C., Nelson V. R., Wigfield D. C.: Studies on indole alkaloid biosynthesis. II. *J. Am. Chem. Soc.* **90**, 5929–30 (1968).
- <sup>99</sup> Kutney J. P., Cretney W. J., Hadfield J. R., Hall E. S., Nelson V. R., Wigfield D. C.: Indole alkaloid biosynthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **90**, 3566–7 (1968).



## 8 ABSTRAKT

Bouz L.: Biologická aktivita sekundárních metabolitů rostlin V. Alkaloidy *Vinca minor* L. Diplomová práce, Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra farmaceutické botaniky a ekologie. Hradec Králové 2016.

Ze suché nati *Vinca minor* L. (Apocynaceae) byl získán sumární extrakt, který byl rozdělen sloupcovou chromatografií za použití lékařského benzínu, chloroformu a ethanolu na 531 frakcí. Dalším dělením frakcí, následnou preparativní tenkovrstvou chromatografií a krystalizací, byly získány 2 látky alkaloidní povahy s označením LB-2 a LB-3. Látky byly identifikovány pomocí GC/MS,  $^1\text{H}$ - a  $^{13}\text{C}$ -NMR spekter a za použití fyzikálně-chemických metod. Z analýzy látek vyplynulo, že se jedná o indolové alkaloidy (+)-vinkaminorein (LB-2) a (+)-vinkamin (LB-3). Obě látky byly podrobeny testování na inhibiční aktivitu vůči lidským cholinesterasám. (+)-vinkamin nevykazoval v porovnání se standardy (galanthamin  $\text{IC}_{50}$  AChE:  $1,710 \pm 0,065 \mu\text{M}$ ,  $\text{IC}_{50}$  BChE:  $42,30 \pm 1,30 \mu\text{M}$ ; huperzin A  $\text{IC}_{50}$  AChE:  $0,033 \pm 0,001 \mu\text{M}$ ) prakticky žádnou aktivitu. Naopak (+)-vinkaminorein ukázal relativně vysokou selektivní inhibici BChE ( $\text{IC}_{50} = 8,71 \pm 0,49 \mu\text{M}$ ), na AChE nepůsobil.

Klíčová slova: *Vinca minor* L., indolové alkaloidy, vinkamin, vinkaminorein, Alzheimerova nemoc, acetylcholinesterasa, butyrylcholinesterasa

## 9 ABSTRACT

Bouz L.: Biological activity of secondary plants metabolites V. Alkaloids of *Vinca minor* L. Diploma thesis, Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Department of Pharmaceutical Botany and Ecology, Hradec Králové 2016.

Summary extract obtained from dried aerial parts of *Vinca minor* L. was separated by column chromatography with petrol, chloroform and ethanol to 531 fractions. By further separation of fractions, following preparative thin layer chromatography and crystallization 2 alkaloidal compounds marked LB-2 and LB-3 were isolated. These compounds were identified by GC/MS,  $^1\text{H}$ - and  $^{13}\text{C}$ -NMR spectroscopy and by use of physical-chemical methods. The structure of compounds were elucidated as indole alkaloids (+)-vincaminoreine (LB-2) and (+)-vincamine (LB-3). Both substances were tested for their inhibition activity against human cholinesterases. (+)-Vincamine didn't exhibited in comparison with standard drugs (galanthamine  $\text{IC}_{50}$  AChE:  $1,710 \pm 0,065 \mu\text{M}$ ,  $\text{IC}_{50}$  BChE:  $42,30 \pm 1,30 \mu\text{M}$ ; huperzine A  $\text{IC}_{50}$  AChE:  $0,033 \pm 0,001 \mu\text{M}$ ) any inhibition activity. On the other hand (+)-vincaminoreine exhibited fairly strong selective inhibition of BChE ( $\text{IC}_{50} = 8,71 \pm 0,49 \mu\text{M}$ ) with no inhibition of AChE.

Key words: *Vinca minor* L., indole alkaloids, vincamine, vincaminoreine, Alzheimer disease, acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase