

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA FARMACEUTICKÉ BOTANIKY

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Alkaloidy *Vinca minor* (Apocynaceae) a jejich biologická aktivita
Alkaloids of *Vinca minor* (Apocynaceae) and their biological activities

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

Vedoucí diplomové práce: doc. Ing. Lucie Cahlíková, Ph.D.

Hradec Králové, srpen 2018

Anežka Klátilová

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

Hradec Králové, květen 2018

.....

podpis

Ráda bych tímto poděkovala vedoucí diplomové práce, doc. Ing. Lucii Cahlíkové, Ph.D. za veškerou pomoc při vypracování diplomové práce – za poskytnutí potřebných materiálů, cenných rad, za její odborné vedení, trpělivost a vstřícný přístup. Dále bych chtěla poděkovat doc. PharmDr. Jiřímu Kunešovi, CSc. za změření a interpretování strukturních charakteristik, prof. RNDr. Lubomíru Opletalovi, CSc. za poskytnutí rostlinné frakce ke zpracování a změření biologické aktivity izolovaného alkaloidu, Ing. Ivo Doskočilovi, Ph.D. za stanovení cytotoxické aktivity alkaloidu, PharmDr. Anně Hošťálkové, Ph.D. za rady týkající se systematického zařazení rostliny. Děkuji celému kolektivu Katedry farmaceutické botaniky Farmaceutické fakulty v Hradci Králové za vytvoření příjemného pracovního prostředí při práci v laboratoři. V neposlední řadě bych také chtěla poděkovat mé spolupracovnici Kamile Lipovské za její podporu při práci v laboratoři. Nakonec děkuji celé své rodině, především manželovi, za veškerou podporu při studiu.

Obsah

1	ÚVOD.....	7
2	CÍL PRÁCE.....	9
3	TEORETICKÁ ČÁST	10
3.1	Čeleď Apocynaceae	10
3.1.1	<i>Vinca minor</i> L.	14
3.1.1.1	Obsahové látky.....	15
3.1.1.1.1	Indolové alkaloidy	16
3.1.1.1.2	Vinca alkaloidy	18
3.1.1.1.3	Biologická aktivita Vinca alkaloidů	21
3.1.1.1.4	Využití Vinca alkaloidů v terapii.....	22
3.1.1.1.5	Další Vinca alkaloidy a jejich využití.....	23
3.2	Alzheimerova choroba	27
3.2.1	Teorie vzniku Alzheimerovy choroby.....	27
3.2.2	Projevy Alzheimerovy choroby.....	28
3.2.3	Rizikové faktory onemocnění	30
3.2.3.1	Faktory ovlivnitelné.....	30
3.2.3.1.1	Rodinná anamnéza.....	30
3.2.3.1.2	Věk	30
3.2.3.1.3	Geny APOE ε4.....	30
3.2.3.2	Faktory ovlivnitelné.....	31
3.2.3.2.1	Kardiovaskulární rizikové faktory.....	31
3.2.3.2.2	Traumatické poranění mozku	31
3.2.3.2.3	Vzdělání	32
3.2.3.2.4	Sociální aktivita	32
3.2.4	Diagnostika Alzheimerovy choroby	32
3.2.5	Terapie Alzheimerovy choroby	33
3.2.5.1	Nefarmakologická léčba.....	33
3.2.5.2	Farmakologická léčba	33
3.2.5.2.1	Inhibitory cholinesteráz	34
3.2.5.2.2	Inhibitory NMDA receptorů	38
3.2.5.2.3	Ostatní přípravky.....	39
3.2.5.2.4	Léčba přidružených obtíží	40

4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	42
4.1	Použitý materiál a chemikálie	42
4.1.1	Frakce použitá k izolaci	42
4.1.2	Použitá rozpouštědla	42
4.1.3	Použitá detekční činidla	42
4.1.4	Vyvíjecí soustavy pro tenkovrstvou chromatografii (TLC)	42
4.1.5	Použitý materiál pro analytickou a preparativní tenkovrstvou chromatografii	42
4.2	Izolace alkaloidů	42
4.2.1	Sloupcová chromatografie	42
4.2.2	Tenkovrstvá chromatografie.....	43
4.2.2.1	Tenkovrstvá chromatografie frakce 378-389	43
4.2.2.2	Hledání vhodné mobilní fáze	43
4.2.3	Alkaloidní frakce.....	43
4.2.4	Postup samotné izolace	44
4.3	Strukturní analýza jednotlivých složek.....	47
4.3.1	GC-MS analýza alkaloidní frakce VM 378-379	47
4.3.2	Analýza NMR	47
4.3.3	Analýza ESI-MS	48
4.3.4	Optická otáčivost.....	48
4.4	Metody pro screening biologických aktivit izolovaného alkaloidu	49
4.4.1	Stanovení inhibiční aktivity izolovaného alkaloidu vůči erytrocytární AChE a sérové BuCh.....	49
4.4.1.1	Podmínky měření.....	49
4.4.1.2	Použitý materiál	49
4.4.1.3	Použité chemikálie	49
4.4.1.4	Použitá činidla	50
4.4.1.5	Použité pufrы.....	50
4.4.1.6	Přístroje	50
4.4.1.7	Příprava pouzder erytrocytů	50
4.4.1.8	Stanovení inhibiční aktivity (IC ₅₀) izolovaného alkaloidu VM3b ₃ vůči cholinesterázám	51
4.4.2	Stanovení cytotoxické aktivity izolovaného alkaloidu VM3b ₃	52
5	VÝSLEDKY	53
5.1	Strukturní analýza venoterpinu	53

5.1.1	EI-MS analýza	53
5.1.2	ESI-MS analýza.....	53
5.1.3	NMR-analýza	53
5.1.4	Optická otáčivost.....	54
5.2	Screening biologických aktivit.....	54
5.2.1	Inhibiční aktivita izolovaného alkaloidu vůči erytrocytární AChE a sérové BuChE	54
5.2.2	Cytotoxická aktivita izolovaného alkaloidu	54
6	DISKUSE A ZÁVĚR.....	55
7	POUŽITÁ LITERATURA	56
8	PŘEHLED OBRÁZKŮ.....	63
9	PŘEHLED TABULEK.....	64
10	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	65

1 ÚVOD

Rostliny jsou důležitým zdrojem látek, které mají v dnešní době využití v medicíně a farmacii. Používají se přímo látky získané z rostliny, nebo jsou tyto vzorem pro přípravu látek nových. Rostliny jsou schopny v sobě shromažďovat metabolity sekundárního typu, které mají v rostlinách funkci ochrannou (proti predátorům, fyzikálním vlivům), případně funkci signální molekuly, například atraktantu pro hmyz. Sekundární metabolity patří mezi významné zdroje biologické aktivity.¹

Alkaloidy jsou bezpochyby jedny z nejdůležitějších sekundárních metabolitů. Jsou charakteristické spíše pro rostliny (hlavně dvouděložné), než pro živočichy. Odhaduje se, že 10–20 % veškerých rostlin obsahuje metabolity alkaloidního typu.²

Čeď Apocynaceae představuje velmi početnou skupinu rostlin, které jsou rozšířeny v zemích celého světa, nejvíce však v tropických a subtropických oblastech. Tyto rostliny se mohou vyskytovat v podobě stromů, keřů, polokeřů nebo také jako tropické liány. Často bývají jedovaté. Do této čeledi patří nejen rostliny, které slouží jako okrasné, ale z většiny těchto rostlin se získávají jejich účinné látky, například mono nebo polyterpeny (kaučuky), kardioaktivní glykosidy, především ale alkaloidy, a hlavně alkaloidy indolové. Tyto látky se používají pro různé účely.

Mezi nejvýznamnější zástupce této čeledi patří *Catharanthus roseus* (L.) G. Don (*Vinca rosea* L.), neboli katarant růžový a *Vinca minor* L., neboli barvínek menší, *Rauwolfia serpentina* (L.) Benth., neboli zmijovice hadová a *Strophanthus gratus* (Wall. Et Hook. Ex Benth.) Baill., krutíkvět cenný.^{1,3,4}

Vinca minor L. je modře kvetoucí jedovatá rostlina, která je jediným volně rostoucím zástupcem čeledi Apocynaceae u nás. Mezi její obsahové látky patří především látky alkaloidní povahy. Typické jsou zde indolové alkaloidy, do kterých se řadí i *Vinca* alkaloidy, které jsou charakteristické pro tuto rostlinu.^{5,6,7}

Alzheimerova choroba (AD) je nevratné neurodegenerativní onemocnění, při kterém dochází k postupnému odumírání nervových buněk a jejich následnému rozpadu.⁸ Nejvíce postihuje pacienty ve věkové kategorii nad 65 let, u kterých působí jako nejčastější příčina demence, přičemž s narůstajícím věkem se incidence onemocnění zvyšuje.⁸ Z počátku jsou u těchto jedinců patrné pouze problémy se zapomínáním a zmatkovaním. Bývá to přičítáno přirozenému procesu stárnutí. Postupně se přidávají komplikace jako poruchy řeči, orientace nebo potíže s rozpoznáním známých osob, dokonce i z vlastní rodiny. V pozdních stádiích není

dotyčný schopen obstarat ani běžné denní potřeby. Nemocí je tak ovlivněn nejen on sám, ale i jeho blízcí, na kterých je poté plně závislý.

Doposud nebyla objevena léčba, díky které by bylo možné AD vyléčit, jsou však dostupná léčiva, která mohou zpomalit její progresi a prodloužit tak pacientův život až o několik let.

V současné době existují dva přístupy v léčbě AD, přičemž v praxi se většinou volí jejich kombinace. Jedná se o přístup farmakologický a nefarmakologický. Mezi používaná léčiva řadíme inhibitory acetylcholinesterasy (AChE) a butyrylcholinesterasy (BuChE) a dále inhibitory N-methyl-D-aspartátových (NMDA) receptorů. Do skupiny léčiv s mechanismem inhibice cholinesteráz patří alkaloidy galanthamin, rivastigmin a donepezil. Pro tyto látky je typické, že blokují enzymy, které v synaptické štěrbině rozkládají acetylcholin. Druhá jmenovaná skupina zahrnuje léčivo memantin, jehož působením ve funkci parciálního antagonisty NMDA receptorů dochází ke snížení excitotoxicity, která je způsobena glutamátem.^{9, 10, 11, 12, 13,14}

Tato práce se zabývá izolací alkaloidu z frakce získané z rostliny *Vinca minor* L., dále identifikací izolovaného alkaloidu a studiem jeho biologických aktivit.

2 CÍL PRÁCE

- 1) Vypracování odborné rešerše dle zadání školitele.
- 2) Zpracování přidělené frakce za účelem izolace alespoň jednoho alkaloidu v čisté formě
- 3) Strukturní identifikace izolovaných látek (MS, NMR apod. analýzy)
- 4) Příprava izolovaných látek pro co nejširší spektrum biologických aktivit
- 5) Zpracování všech získaných výsledků, jejich analýza a vyhodnocení.
- 6) Sepsání a odevzdání diplomové práce

3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Čeleď Apocynaceae

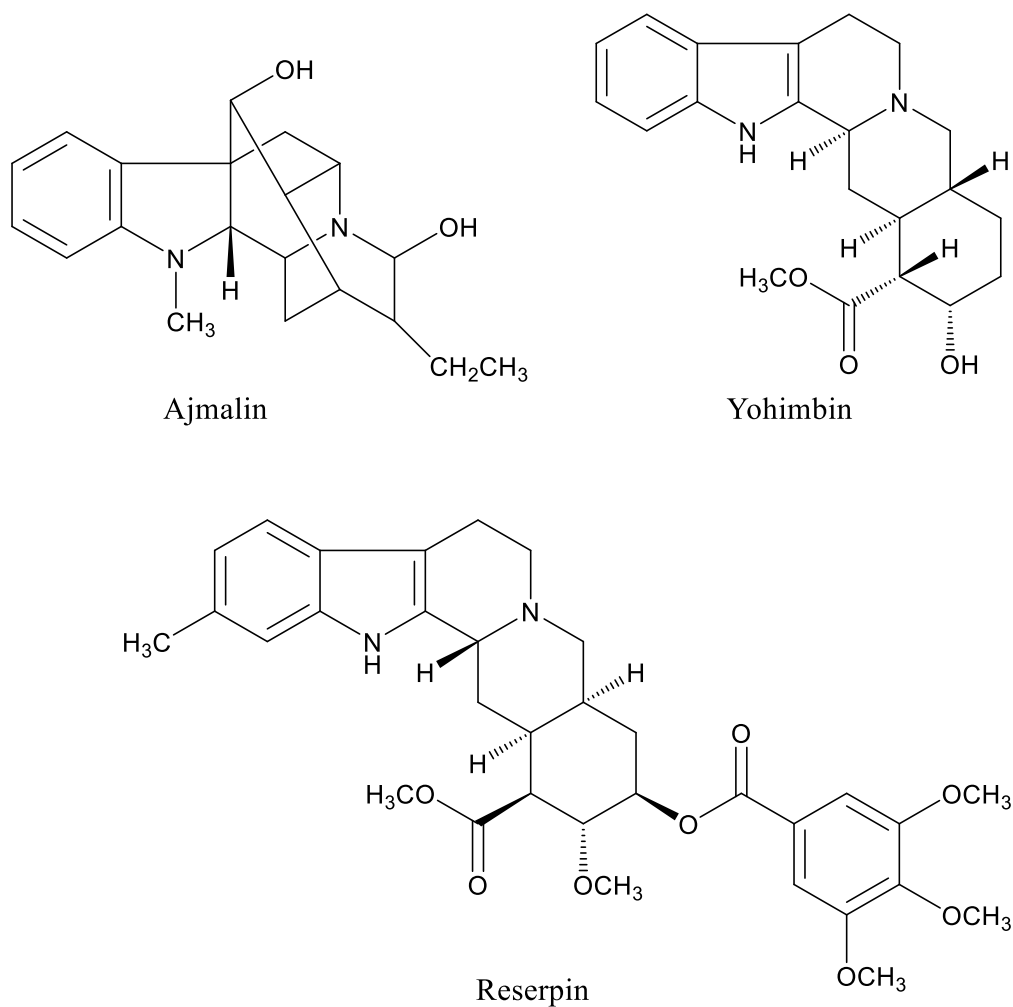
Čeleď Apocynaceae (toješťovitých) čítá okolo 415 rodů a 4600 druhů kvetoucích rostlin, které se vyskytují spíše v teplejších oblastech zeměkoule.⁴ Řadíme ji do řádu Gentiales (hořcotvaré) společně s čeleděmi Loganiaceae (kulčibovité), Rubiaceae (mořenovité), Menyanthaceae (vachtovité), Asclepiadaceae (klejichovité), Gentianaceae (hořcovité).^{1,4}

Rostliny této čeledi jsou vytrvalé, mají listy s hladkými okraji, květy jsou oboupohlavné, uspořádané v klastrech. Pletiva obsahují mléčnice, ze kterých při poranění vytéká jedovatá šťáva (latex). Plodem může být bobule, peckovice, měchýřek nebo tobolka.^{1,4} Rostliny mohou být stromovitého, keřovitého nebo liánovitého typu. Vyskytují se v teplejších oblastech zeměkoule, tedy především v tropech a subtropích. Rostliny čeledi jsou nejen okrasné, ale také obsahují látky, které mají praktické využití.^{1,3,4}

Čeleď čítá mnoho významných zástupců. Patří sem rostlina s názvem *Rauwolfia serpentina* (L.) Benth., česky zmijovice hadová (Obrázek 3-1). Tato chráněná rostlina je typická pro oblast Indie. Její listy jsou kožovité a stálezelené, květy bílorůžové. Plodem je peckovice.¹ Rostlina obsahuje látky alkaloidního typu, mezi něž patří terciární indolinový alkaloid ajmalin a terciární indolové alkaloidy yohimbinového základu reserpin a yohimbin (Obrázek 3-2). Nejvýznamnějším alkaloidem je reserpin, který má hypotenzní účinky.^{1,15}



Obrázek 3-1: *Rauwolfia serpentina*¹⁶



Obrázek 3-2: Strukturální vzorec ajmalinu, yohimbinu a reserpinu

Liánovitý nebo někdy také keřovitý krutikvět cenný (*Strophanthus grauts*, (Wall. Et Hook. Ex Benth.) Baill.) rostoucí v Africe má listy křížmostojně postavené a květy růžovobíle zbarvené (Obrázek 3-3). Jejich součástí je vínová trubka. Plody jsou tenké dvojité měchýřkovité.¹ Rostlina obsahuje hlavně alkaloidy, dále kardioglykosidy, například oubain, který má kardiostimulativní účinky a dále také lignany.^{1,17}

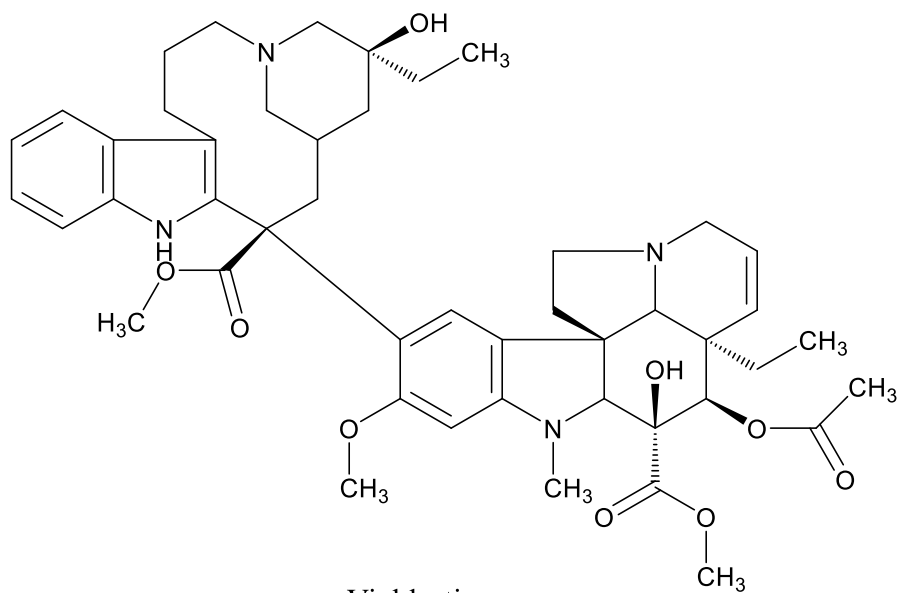


Obrázek 3-3: *Strophanthus gratus*¹⁸

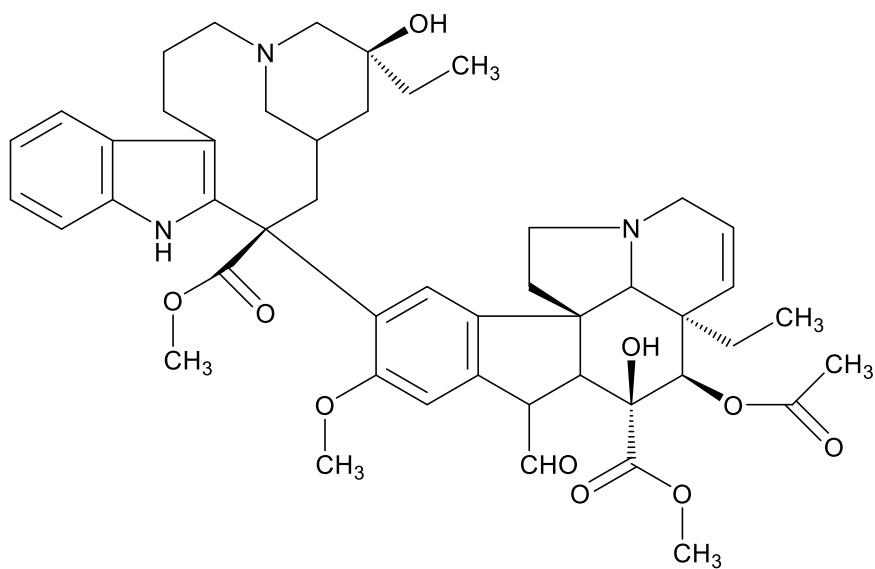
Významným zástupcem této čeledi je *Catharanthus roseus* (L.) G. Don (katarant růžový) (Obrázek 3-4). Jedná se o polokeř, který pochází z Madagaskaru, dnes se však vyskytuje i v jiných, především teplejších, oblastech světa. Významné alkaloidy získávané z katarantu - vinblastin a vinkristin (Obrázek 3-5) - patří mezi dimerní indolové alkaloidy, které mají antineoplastické účinky.¹



Obrázek 3-4: *Catharanthus roseus*¹⁹



Vinblastin



Vinkristin

Obrázek 3-5: Strukturální vzorce vinblastinu a vinkristinu

Rod *Vinca* je rostlinný rod typický pro oblast Evropy, jihozápadní Afriky a Severozápadní Asie. Patří sem několik konkrétních druhů rostlin, mezi něž se řadí *Vinca erecta* Regel & Schmalh., *Vinca difformis* Pourr., *Vinca herbacea* Waldst. & Kit., *Vinca major* L., *Vinca minor* L., *Vinca pubescens* d'Urv. (syn. *Vinca major* subsp. *hirsuta* (Boiss.) Stearn.) a *Vinca sonerei*. Poslední uvedený zástupce je zároveň zástupcem nejpozději popsaným.^{20,21,22,23,24,25}

3.1.1 *Vinca minor* L.

Řád:	Hořcotvaré (Gentiales)
Čeleď:	Toješťovitě (Apocynaceae)
Rod:	Barvínek (syn. brčál)
Druh:	Barvínek menší (<i>Vinca Minor</i> L.) ^{8,9,10}

Vinca minor L. neboli barvínek menší je jediná volně rostoucí rostlina této čeledi v České republice. Roste v lesích, parcích, zahradách i podél silnic, nejlépe se jí daří na stinných vlhčích místech. Tato modře až modro-fialově (někdy však i bíle nebo růžově) kvetoucí jedovatá bylina (Obrázek 3-6) s květy rostoucími jednotlivě na stopkách je 20-40 cm vysoká, pokud se jedná o květonosné lodyhy. Lodyhy, které květy nenesou, mohou být až 80 cm vysoké. Při bázi oddenku rostlina dřevnatí. Kveté v období od března do června. Listy jsou protistojné, nejčastěji elipsovitého tvaru a neopadají. Plodem je měchýřek. Vyskytuje se v různých kultivarech, které se liší barvou květů a listů a jejich velikostí.^{1,26,27} Rozmnožování probíhá vegetativním způsobem pomocí oddenků. Barvínek je odolný a nepaří mezi chráněné rostliny, jelikož je zplanělý a hojně pěstovaný.^{28,29}

Rostlina je používána jak v léčitelství, tak v lékařství. Extrakt z nati je prospěšný při snižování krevního tlaku či mírnění kašle. Dále se používají listy pro léčbu krvácivých stavů (krvácení z nosu, nadměrného menstruačního krvácení i vnitřního krvácení) nebo zánětlivých a cévních onemocnění (ateroskleróza a demence způsobená nedostatečným zásobením mozku krví). V rozdrcené formě mají listy adstringentní účinky na rány a působí na ně hojivě, proto se používají i ústní vody k léčbě ústních a krčních infekcí. Kořen má, stejně jako nat', hypotenzivní účinek. *Vinca minor* L. má své místo také v protinádorové terapii.^{28,30,31}



Obrázek 3-6: *Vinca minor* – květ, list a celá rostlina^{32,33,34}

3.1.1.1 Obsahové látky

Čeleď Apocnyaceae obsahuje hlavně látky alkaloidního charakteru. Vedle alkaloidů se u zástupců této čeledi vyskytují také terpeny sekoiridoidního a iridoidního typu, kardioglykosidy, polyterpeny a indolové alkaloidy.¹

Alkaloidy jsou významné přírodní produkty z hlediska biologického, chemického i komerčního. Jedná se o sloučeniny tvořené uhlíkem, vodíkem, kyslíkem a dusíkem, kdy dusík je v těchto sloučeninách vázán převážně heterocyklicky. Většina z nich má alkalický charakter (odtud název alkaloid), vždy tomu tak ale být nemusí. Bývají spíše pevné a bezbarvé, ve vodě se rozpouští méně než v tucích. Podle struktury se alkaloidy dělí na alkaloidy vlastní, protoalkaloidy a pseudoalkaloidy. Pro vlastní alkaloidy je typické, že je dusík součástí heterocyklu, kdežto u protoalkaloidů není heterocyklicky vázán. Biosyntéza pseudoalkaloidů nevyhází z aminokyselin, dusík je ale v jejich molekule obsažen. Dále je možné alkaloidy dělit podle látky, ze které vychází jejich biosyntéza. Mezi tyto látky patří ornithin, kyselina nikotinová, tyrosin, kyselina anthranilová, tryptofan, histidin, lysin, arginin. Některé alkaloidy jsou díky svým účinkům používány při léčbě různých onemocnění.^{2,35}

Čeleď Apocynaceae je jednou z nejvýznamnějších čeledí obsahujících alkaloidy. Využívají se při léčbě onkologických onemocnění u dětí i dospělých díky jejich antimitotické a antimikrotubulární aktivitě.⁶

Vinca minor L. obsahuje kromě alkaloidů také sloučeniny flavonoidně-glykosidického a tříslovinného původu. Alkaloidní část tvoří především alkaloidy indolové (0,3-1 %). Nejvýznamnějším alkaloidem je vinkamin, který je alkaloidem monoterpenickým indolovým typu erbunaminu. Dále jsou zde obsaženy například vinkadiformin, apovinkamin a vinkamon. Celkem obsahuje *Vinca minor* L. více než 50 látek.^{2,29}

3.1.1.1 Indolové alkaloidy

Indolové alkaloidy jsou alkaloidy vycházející z tryptofanu. Alkaloidy odvozené od této aminokyseliny mohou být různého typu, konkrétně ergotové, pyrroloindolové, chinolinové, jednoduché indolové, jednoduché beta-karbolinové, nebo terpenoidní. Vinca alkaloidy patří do poslední jmenované skupiny, přesněji do skupiny monoterpenických indolových alkaloidů.³⁶

Tato skupina čítá přibližně 3000 zástupců, kteří mají významnou biologickou aktivitu. Patří sem jedovatý strichnin, antimalarický chinin, ale zejména právě Vinca alkaloidy. Ty se vyskytují hlavně ve 4 čeledích - Nyssaceae, Loganiaceae, Rubiaceae a Apocynaceae.³⁷

Syntéza vinblastinu a vinkristinu a dalších monoterpenických indolových alkaloidů je zobrazena níže (Obrázek 3-7).

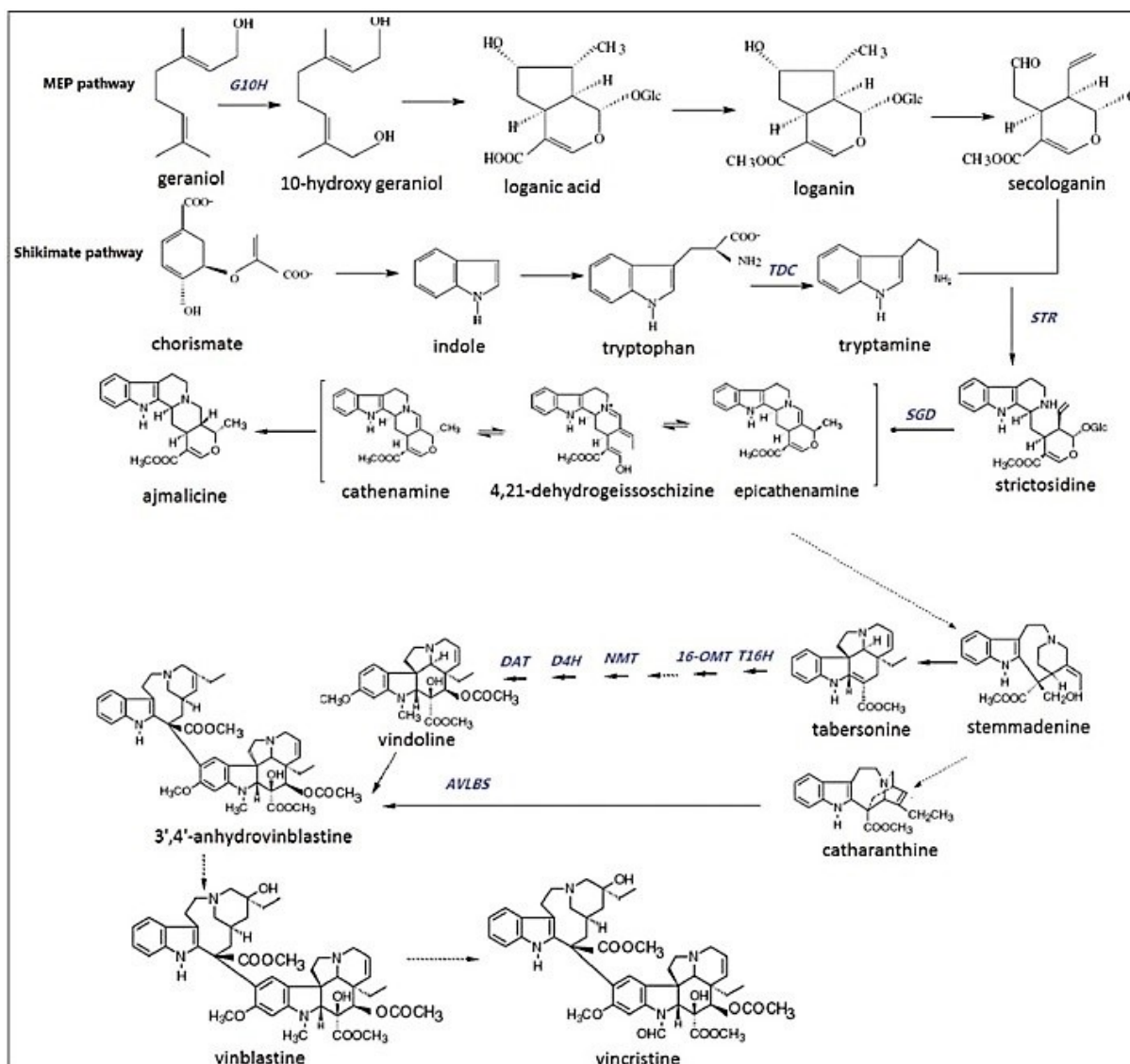
Aminokyselina tryptofan vzniká šikimátovou biosyntetickou cestou. Terpenoidní část sekologanin má původ v geraniolu. Geraniol je nejprve hydroxylován v poloze C10 pomocí enzymu geraniolhydroxylasy. Z 10-hydroxygeraniolu vznikne loganiová kyselina, která je následně přeměněna na loganin. Oxidačním štěpením jeho cyklopentanového kruhu sekologaninsynthasou je získán sekologanin.

Dekarboxylací tryptofanu pomocí tryptofandekarboxylasy vzniká strictosidine. Syntézou strictosidinu a sekologaninu za působení strictosidin synthasy získáme glukalkaloid-3-strictosidin, který je prekurzorem všech monoterpenických indolových alkaloidů. Strictosidine-p-glukosidasa způsobí odštěpení glukózové části, čímž vznikne nestabilní aglykon. Z tohoto vzniklého produktu vznikne přes několik nestabilních sloučenin 4,21-dehydrogeissoschizine, ze kterého je dále tvořen vindolin a catharanthin.

Meziprodukt 4,21-dehydrogeissoschizine je nejprve přeměněn na stammadenin, přičemž u této sloučeniny se biosyntetická cesta větví. První řetězec vede k syntéze vindolinu

přes meziprodukt tabernosin. Ten je hydroxylován tabernosin-16-hydroxylasou v poloze C-16, čímž dostáváme 16-hydroxytabersonin. Následuje jeho methylace za vzniku 16-methoxy-54-abersoninu enzymem S-adenosyl – N-methioninem. Dále vzniká methylací indolu 16-methoxy-2,3-dihydro-3-hydroxytabersonin. Posledním krokem je přeměna deacetoxyvindolinu na vindolin jeho C-4 hydroxylací.

Syntézou vindolinu a katharanthinu pomocí anhydrovinblastinsyntasy vznikne 3', 4'-anhydrovinblastin, což byl první popsáný dimerický Vinca alkaloid. Z něho poté vznikají i ostatní dimerní alkaloidy vinblastin a vinkristin.³⁷



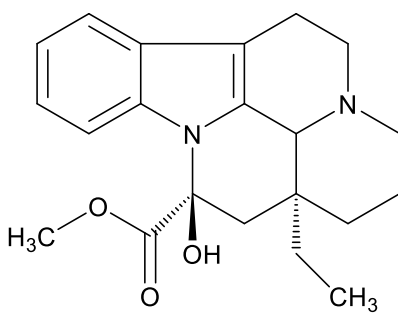
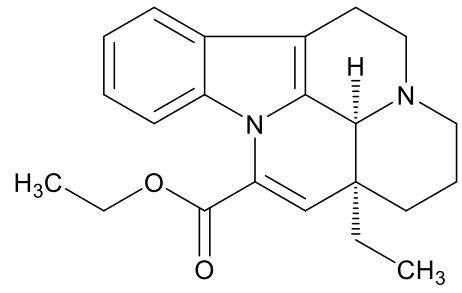
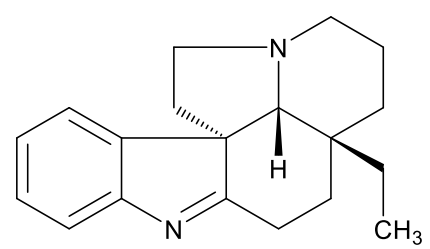
Obrázek 3-7: Biosyntéza vinblastinu a vinkristinu (monoterpenických indolových alkaloidů)³⁸

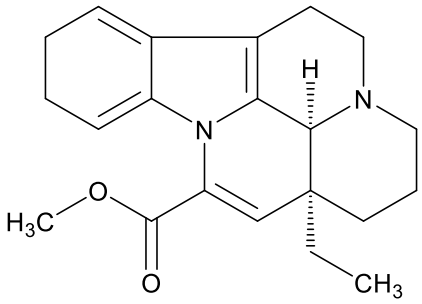
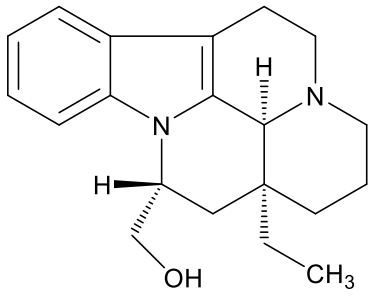
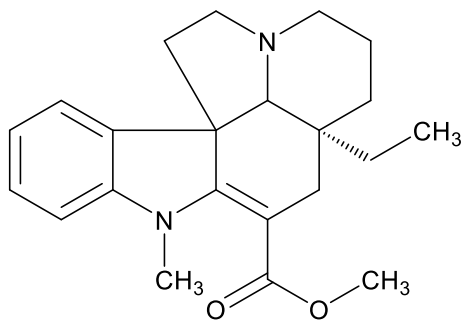
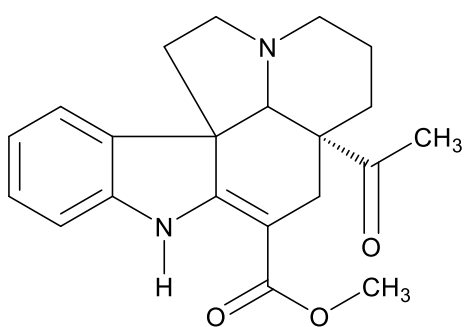
3.1.1.1.2 Vinca alkaloidy

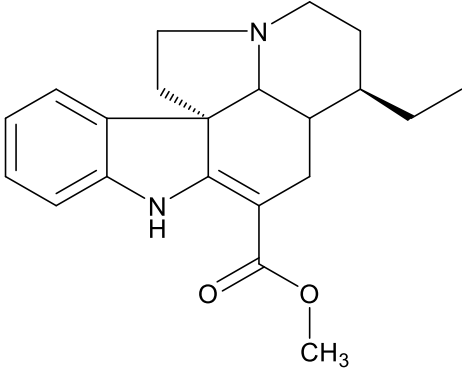
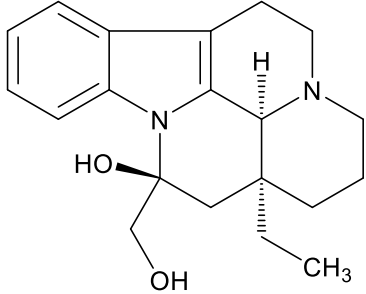
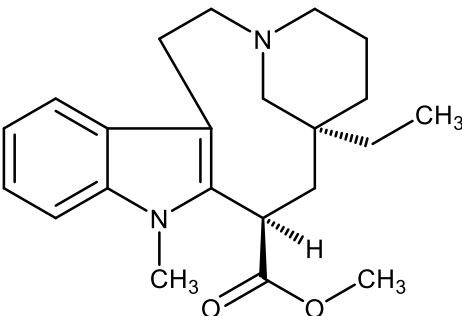
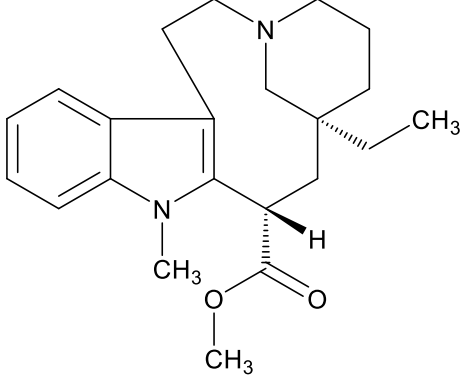
Nejstaršími cytostaticky působícími alkaloidy jsou Vinca alkaloidy.³⁵ Byly objeveny v 50. letech díky hypoglykemickému účinku listů z *Catharantus roseus* (L.) G. Don.^{35,36}

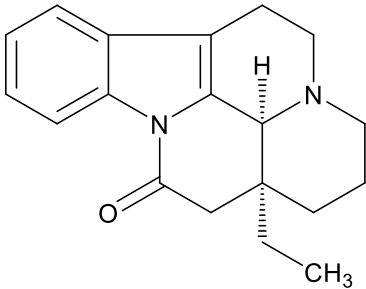
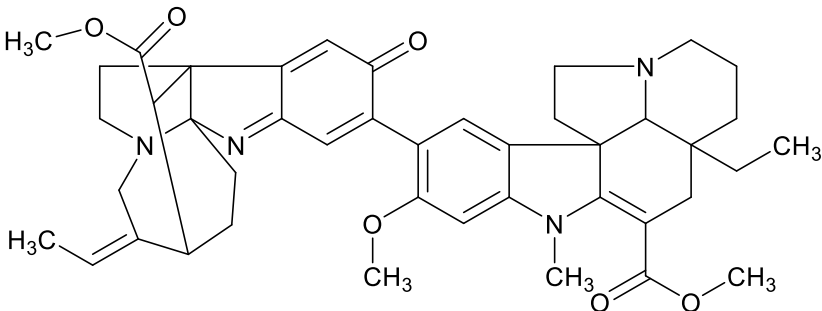
Nejznámějším Vinca alkaloidem izolovaným z rostliny *Vinca minor* L. je alkaloid vinkamin. Rostlina obsahuje dalších přibližně 50 látek alkaloidního původu. Některé další jsou uvedeny v následující tabulce (Tabulka 3-1).³⁹

Tabulka 3-1: Strukturální vzorce některých Vinca alkaloidů^{39,40,41,42,43}

Název	Původ	Vzorec
Vinkamin ^{39,40}	<i>Vinca Minor</i> L.	
Vinpocetin ⁴¹	semisyntetický derivát vinkaminu	
1,2-dehydroaspidospermin ⁴⁰	<i>Vinca minor</i> L.	

<p>Apovinkamin⁴²</p>	<p>semisyntetický derivát vinkaminu</p>	
<p>Desoxyvinkaminol⁴²</p>	<p>semisyntetický derivát vinkaminu</p>	
<p>Minovin^{39,40}</p>	<p><i>Vinca minor</i> L.</p>	
<p>Minovincin³⁹</p>	<p><i>Vinca minor</i> L.</p>	

Vinkadiformin ⁴⁰	<i>Vinca minor</i> L.	
Vinkaminol ⁴²	semisyntetický derivát vinkaminu	
Vinkaminorein ^{37,40}	<i>Vinca minor</i> L.	
Vinkaminorin ^{39,40}	<i>Vinca minor</i> L.	

Vinkamon ⁴²	semisyntetický derivát vinkaminu	
Vinkarubin ⁴⁰	<i>Vinca minor</i> L.	viz ↓
		

3.1.1.1.3 Biologická aktivita *Vinca* alkaloidů

Nejznámějšími *Vinca* alkaloidy rostliny *Vinca minor* L. jsou vinkamin a v dnešní době více studovaný vinpocetin.^{39,40,44}

Vinpocetin má více možností využití jeho biologických účinků. Působí protizánětlivě díky přímé inhibici komplexu kináz IκB. Tohoto mechanismu je využíváno například při aterosklerotickém onemocnění a cerebrovaskulárních onemocnění, která jsou způsobena zánětem. Má vazoaktivní účinky a působí tedy dilatací cév. Tím dochází k většímu průtoku krve mozkem, a je tak urychlen mozkový metabolismus, což se projeví zvýšenou produkcí adenosintrifosfátu (ATP) v mozkových buňkách. K tomu je potřeba více kyslíku a glukózy.

Pomáhá též zvýšením hladiny neurotransmiterů užitečných pro paměť.^{41,44} Vinpocetin podporuje průtok krve mozkovou tkání. Děje se tak na základě mechanismu inhibice CA/kalmodulin dependentní cGMP fosfodiesterázy. Tím je v hladké cévní svalovině zvyšována koncentrace cGMP. V mozku má antikonvulzivní a neuroprotektivní účinek. Inhibuje totiž napětově řízené sodíkové kanály, čímž snižuje poškození mozku. Tato látka dále působí v mozku při snižování účinků oxidačního stresu. Snižuje také excitotoxicitu neurotransmiterů, které se uvolňují kvůli nedostatku kyslíku, případně ischemie. Takovým neurotransmiterem je například glutamát. Tohoto účinku dosahuje snížením koncentrace intracelulárních iontů vápníku. Díky tomu brání zahájení molekulových kaskád, které způsobí poškození neuronů.⁴¹ Chrání kardiovaskulární systém pomocí modifikace mitochondriálního přechodu póry. Zlepšuje kinematickou viskozitu a rigiditu erytrocytů a snižuje hladinu fibrinogenu. Snižováním viskozity krve je prospěšný u pacientů s cerebrovaskulárními onemocněními. Vinpocetin dále působí neuroprotektivně aktivací periferních benzodiazepinových receptorů.⁴⁵

Mechanismus protinádorového účinku rostliny *Catharanthus roseus* (L.) G. Don má původ v reakci alkaloidů této rostliny s tubulinem, čímž dojde k narušení funkce mikrotubulů, a to zejména těch, které obsahují mitotické vřetenko. Je tak zastavena metafáze buňky. Vinca alkaloidy mají vliv hlavně na nemitotický buněčný cyklus.

Vinca alkaloidy se vážou na vazebná místa tubulinu, přičemž v každém mikrotubulu je 16–17 vazebných míst, umístěných u konců mikrotubul. Navázáním na tato vazebná místa dojde k zastavení shlukování mikrotubul. Důsledkem působení i malých koncentrací léčiv může být zastavení růstu nebo zkrácení konců mikrotubuly. Díky tomu může vzniknout tzv „mitotické víčko“, které má za následek potlačení funkce mikrotubul. Takto tedy dojde k zástavě metafáze.

Jsou důkazy i pro maligní angiogenezi *in vitro* pomocí vinca alkaloidů. Jsou jimi blokována jednotlivá stadia angiogeneze, tedy endoteliální proliferace, chemotaxe a rozšiřování na fibronectin. Pokud jsou kombinovány s protilátkami proti vaskulárnímu endoteliálnímu faktoru nízké dávky, například vinblastinu, významně zvyšují protinádorovou odezvu.³⁵

3.1.1.1.4 Využití Vinca alkaloidů v terapii

Vinpocetin je jednou z látek patřících mezi látky alkaloidního původu, konkrétně mezi Vinca alkaloidy. Jedná se o ethylester apovinkaminu izolovaného z listů rostliny *Vinca minor* L. Je to látka polosyntetické povahy, která je známa svými neuroprotektivními a vazoaktivními účinky, proto se používá při léčbě cerebrovaskulárních onemocnění často

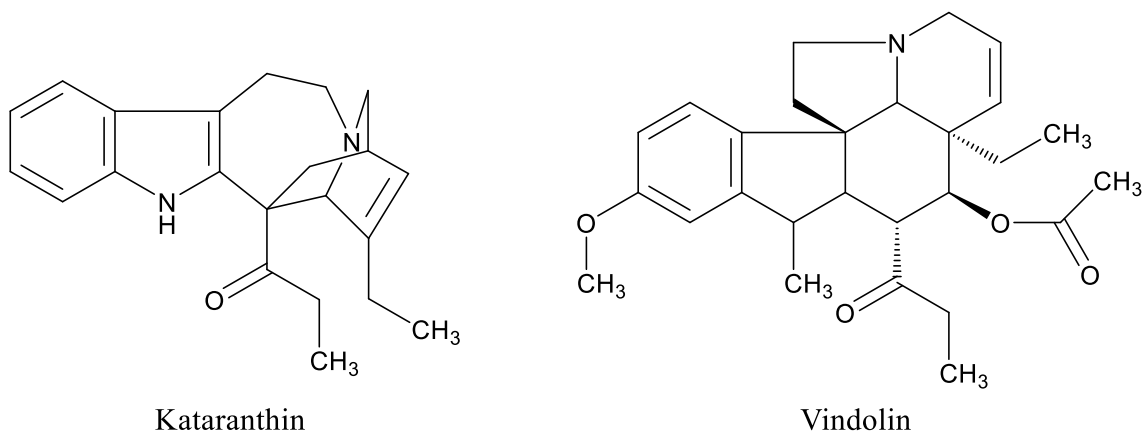
způsobených hypoperfuzí (snížený průtok krve v mozku). Při těchto stavech dochází k nevratným patologickým změnám mozkové tkáně. U pacienta se mohou v důsledku tohoto jevu vyskytnout některé typy demencí. Vinpocetin se v těchto stavech užívá jako vazoaktivum a také nootropikum, jelikož zvýší průtok krve mozkovou tkání. Léčivo s obsahem vinpocetinu je možné užívat i dlouhodoběji díky nízkému výskytu nežádoucích účinků. Stejně tak je možné ho použít při zrakových problémech cévního původu a také poruchách sluchu. Dále má své uplatnění v oblasti neuropsychologie a geriatric. Mimo jiné je studován pro léčbu ztráty vlasů.⁴⁴

3.1.1.1.5 Další Vinca alkaloidy a jejich využití

Významnou rostlinou pro izolaci Vinca alkaloidů je také *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. Jeho listy se dříve používaly pro snižování hladiny glykemie. Díky tomuto účinku byla rostlina dále testována a byly objeveny alkaloidy vinblastin a vinkristin, které mají významnou roli v cytostatické léčbě. Byly to první přírodní látky vůbec, které se v protinádorové terapii začaly užívat. Z rostliny však bylo možné izolovat pouze malé množství těchto látek, proto začaly být zkoumány možnosti, jak připravit tyto látky synteticky.

Vinblastin a vinkristin (Obrázek 3-5) jsou dimerické alkaloidy terpenoidního charakteru, které se od sebe strukturně liší pouze jednou funkční skupinou na indolovém dusíku, kterou je u vinblastinu methylová a u vinkristinu formylová skupina. Cytostatická aktivita vinkristinu je založená na reakci s tubulinem, přesný mechanismus účinku znám ale dosud není.

Alkaloidy jsou složeny ze dvou odlišných indolových terpenoidních jednotek, které tak tvoří dimerní sloučeninu. Ty jsou odvozeny od prekurzorů kataranthinu a vindolinu (Obrázek 3-9), ze kterých přes meziproduct 3', 4'-anhydrovinblastin vznikne vinblastin a dále vinkristin.



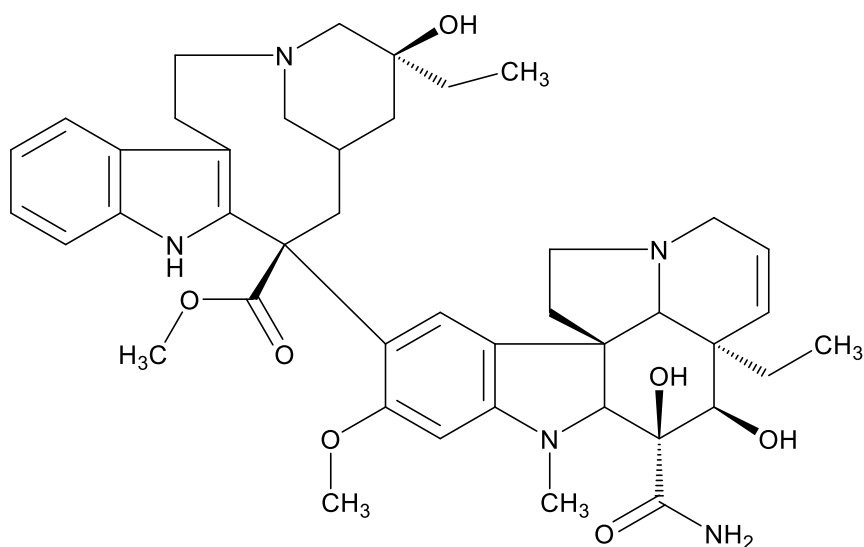
Obrázek 3-8: Strukturální vzorce kataranthinu a vindolinu

Výraznější odlišnosti mezi těmito dvěma alkaloidy jsou však patrné v účinku, kdy každý z nich působí lépe na jiné typy nádorů.

Vinblastin je součástí kombinované protinádorové léčby, samostatně se užívá pro léčbu Hodgkinova lymfomu a jiných lymfomů. Dále je léčivem proti histocystóze X, Kaposiho sarkomu či karcinomu varlat. Může být použit také u nádorů zárodečných buněk a karcinomu prsu. Nevýhodou tohoto léčiva je poškození kostní dřeně a v důsledku toho hematotoxicita. Jsou poškozeny bílé krvinky, pacient může trpět horečkami, nauzeou, zvracením nebo dušností.³⁵

Vinkristin je vůči krvi toxický méně, proto je užíván jako součást chemoterapeutických režimů, používá se v kombinované léčbě Hodgkinova lymfomu, sarkomů, karcinomů a leukémií. Až u 90 % dětských pacientů trpících akutní lymfoidní leukémií nedochází po léčbě vinkristinem k návratu onemocnění. Může mít účinky i na nemaligní hematologické poruchy, například hemolytický uremický syndrom. Častým problémem je zde ale nežádoucí účinek v podobě neurotoxického působení. Dále se může vyskytnout nevolnost, zvracení či potlačení aktivity kostní dřeně.^{35,37}

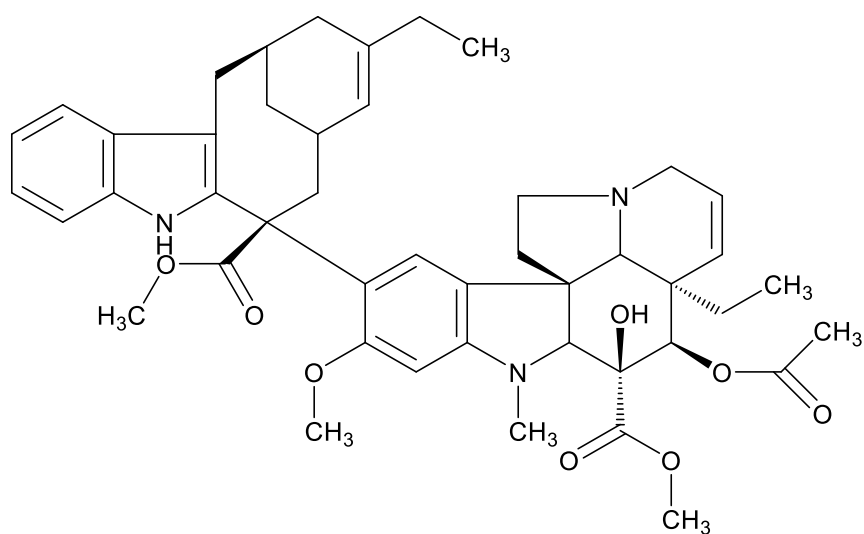
Vindesin (Obrázek 3-10) byl schválen jako první polosyntetický derivát získaný z vinblastinu a vinkristinu. Tato látka byla připravena obměnou vindolinové části dimeru za účelem zlepšení cytostatického účinku a snížení nežádoucích účinků. Tento derivát nachází použití při léčbě nemalobuněčného plicního karcinomu, melanomu nebo akutní lymfoblastické leukemie, chronické myeloidní leukémie, prsních, jícnových a renálních karcinomů, solidních dětských nádorů.^{35,37}



Vindesin

Obrázek 3-9: Strukturální vzorec vindesinu

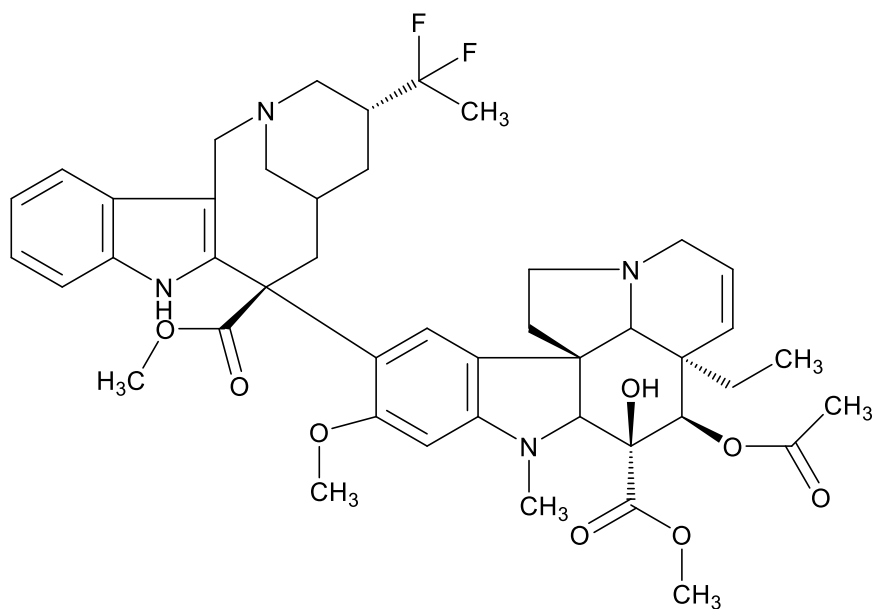
Modifikací meziproductu 3',4'-anhydrovinblastinu byl připraven alkaloid vinorelbin (Obrázek 3-11). Jeho hlavním nežádoucím účinkem je hematologická toxicita. Výskyt nežádoucích účinků je u něho ale oproti předchozím alkaloidům nižší. Může dojít k nevolnostem a dalším zažívacím obtížím, únavě, brnění v rukou a nohou, či snížené odolnosti vůči infekcím. Používá se při léčbě karcinomu prsu a nemalobuněčného karcinomu plic. Dále může být použit při karcinomu prostaty, nádorové onemocnění jícnu a lymfomy, případně osteosarkomů.^{35,37}



Vinorelbin

Obrázek 3-10: Strukturální vzorec vinorelbinu

V rámci dalších experimentů byl získán difluorovaný derivát vinorelbinu vinflunin (Obrázek 3-12). Tato látka má méně nežádoucích účinků než předchozí zástupci a je oproti nim i účinnější. V současné době je již také schválen pro léčbu například karcinomu prsu nebo nemalobuněčného plicního karcinomu.^{35,37}



Vinflunin

Obrázek 3-11: Strukturální vzorec vinfluninu

3.2 Alzheimerova choroba

Alzheimerova choroba (AD) je neurodegenerativní onemocnění mozku, které je nejčastější formou demence u starších lidí, přičemž tvoří asi 60-80 % z celkového počtu demencí^{8,9,46,47}. V roce 2015 bylo touto chorobou postiženo přibližně 35 milionů jedinců po celém světě.⁴⁸ AD se projevuje snížením výkonných, poznávacích a kognitivních funkcí, konkrétně poruchami inteligence, paměťových schopností, logického uvažování, fatických funkcí, vnímání, chápání, plánovacích schopností a motivace.⁴⁶ V poslední době pacientů s AD přibývá. Jednou z příčin vzrůstu onemocnění je stárnutí populace, kdy se zvyšuje podíl starších zástupců populace oproti počtu jedinců v populaci celkově.^{8,46} V roce 2014 bylo zaznamenáno přes devadesát tisíc úmrtí na AD, čímž se tato choroba stala šestou nejčastější příčinou úmrtí.⁹ Onemocnění trvá od vypuknutí do smrti přibližně sedm až deset let. V dnešní době se hlavně díky kvalitní zdravotní péči a léčbě doba přežití v mnoha případech prodloužila. Existuje však stále část pacientů, kteří zůstává bez léčby, jelikož ještě nebyli diagnostikováni.⁴⁶

3.2.1 Teorie vzniku Alzheimerovy choroby

Přesná příčina onemocnění dnes stále není známa. Existuje ale několik teorií jeho vzniku.

První teorií je teorie proteinová. Podle ní nastává problém, pokud jsou degradovány přirozené proteiny a patologický protein, tzv. β -amyloid se začne usazovat v okolí neuronů a tau protein v prostoru uvnitř neuronů, což jsou jevy typické právě pro AD.⁴⁶ Beta-amyloid vzniká z většího množství jednotek APP. Ten je běžně štěpen enzymem α -sekretázou na fragmenty o délce 40 aminokyselin. Pokud je ale štěpen β - a γ -sekretázou, tvoří fragmenty delší (42 nebo 43 aminokyselin), které nejsou rozpustné a shlukují se za vzniku shluků β -amyloidu. Tyto β -amyloidové plaky způsobují odumírání cholinergních neuronů. Tau protein, který se běžně nachází uvnitř neuronů a je za fyziologických podmínek zodpovědný za polymeraci mikrotubulů, zabraňuje při AD přísunu živin do jednotlivých neuronů, což vede také k apoptóze neuronů. Nadměrně hyperfosforylovaný tau protein je toxický. Tvoří vlákna, tzv. neuronální tangles, jejichž působením nastává apoptóza nervových vláken. Dochází k hromadění odumřelých neuronů v mozkové tkáni a k zánětu zapříčiněnému uvolňováním zánětlivých cytokinů.^{9,46,48,49,50,51}

Při AD je negativně ovlivněna funkce neuromediátorů, nejvíce těch cholinergních. Acetylcholin je v synaptické štěrbině v nedostatku, jelikož je snížena aktivita acetyltransferasy,

kteřá je zodpovědná za tvorbu acetylcholinu. Nastává tedy snížení cholinergní neurotransmise.^{14,50}

AD někdy bývá připodobňováno k diabetu mellitu (DM), kdy pro obě onemocnění je typický defekt inzulinových drah. Stejně jako u DM se zde objevuje oxidativní stres, inzulinová rezistence, cytokiny způsobený zánět, toxicita glukózy atd. Proto jsou testována některá antidiabetika i v terapii AD.

Při AD může být v těle přítomno nadměrné množství volných radikálů (ROS), což je charakterizováno nerovnováhou mezi tvorbou a odbouráváním těchto částic. Při AD nastává nadměrná exprese mutované formy APP. Dochází tak ke zvýšenému uvolňování ROS a je poškozen metabolismus mitochondrií, jelikož je snížena výkonnost mitochondriálních enzymů, které jsou schopny likvidovat volné radikály. Z těchto enzymů můžeme jmenovat cytochrom oxidasu nebo superoxid dismutasu-2.⁵¹

Svou roli hraje také genetika. Dědičná forma AD je spojována s mutací genu pro apolipoprotein E (APOE) (viz dále kapitola Neovlivitelné rizikové faktory), genu pro presenilin 1 a 2 (PSEN 1 a 2), mutace genu pro amyloidový prekurzorový protein (APP). Při zděděné mutaci pro tyto geny je vyšší pravděpodobnost vzniku onemocnění AD. Většinou se AD rozvíjí po 65. roce života jedince, při zděděné mutaci jednoho z těchto genů se onemocnění vyskytne často již před 65. rokem.^{9,50,51}

3.2.2 Projevy Alzheimerovy choroby

V lidském mozku se nachází přes sto miliard neuronů, které obsahují rozvětvení, díky nimž se jednotlivé neurony propojují pomocí těsných spojení, synapsí. Díky výbojům mezi těsnými spoji synapse může mozkovou tkání procházet vzruch. Vytvoří se takto buněčný základ pohybových dovedností, myšlenek, vzpomínek a emocí.^{9,46,47}

Příznaky AD nemusí být u všech pacientů stejné, mohou se u jednotlivých jedinců projevovat odlišně. Stejně tak rychlost, jakou se choroba u jednotlivých pacientů rozvíjí, je často různá. Poruchy mozku a degenerace neuronů, které u nemoci nastávají, jsou bohužel nevratné. Z počátku je mozek schopen dané změny kompenzovat do té míry, že se změny navenek neprojeví. Po delší době jsou ale změny takové, že jsou jejich projevy již znatelné.

Stádiu, než se naplno projeví AD, předchází stav zvaný MCI. Vyskytuje se přibližně u 15-20 % populace starší šedesáti pěti let. Dochází v něm ke změnám, které jsou již patrné, jelikož se navenek projeví tak, že je již zaznamenána dotyčný i jeho blízcí. Přesto je postižený

schopen dále vykonávat každodenní běžné činnosti. U lidí, kteří již mají MCI, je pravděpodobnější, že se u nich časem rozvine Alzheimerova choroba.⁹

U pacientů, u kterých je již onemocnění v rozvinutějším stádiu, je patrné postižení na třech úrovních, konkrétně v každodenních aktivitách, kognitivních funkcích, psychologických změnách a změnách chování.⁴⁶ Co se každodenních aktivit týče, nevládají pacienti nejprve složitější úkony, například ty, které jsou spojené se zaměstnáním – obsluha počítače či používání peněz, telefonování. Postupem času dochází ke snížené schopnosti zvládat činnosti jednodušší, například vaření. V pozdní fázi je pro postiženého problémové obstarání denní hygieny a samostatné oblékání.^{9,52}

Pro pacienty může být zpočátku obtížné zapamatovat si nové informace, což je způsobeno tím, že většinou jako první odumírají neurony, které leží v oblasti mozku, jež je důležitá pro tvorbu nových vzpomínek.⁹ Pro postižené se stává větším problémem zapamatovat si nově naučené informace a termíny důležitých událostí. Zhoršuje se koncentrace a přichází zpomalení při konání naučených činností. Pro pacienty bývá těžké dokončit každodenní běžné činnosti nebo jet na místo, které dobře znají.

Znakem AD mohou být také problémy se zrakem, neschopnost přečíst text, možnost rozostřeného vidění, nerozpoznávání barev a v důsledku zhoršeného zraku potíže s řízením automobilu. Pacient ztrácí a zapomíná věci, není schopen si vzpomenout, kde je odložil a mívá tendenci obviňovat z jejich „zmizení“ ostatní.⁹ Postižený není schopen předměty ani rozeznat, přestože sensorické funkce jsou stále v pořádku. Tento jev nazýváme agnozií.⁴⁶

Postupně se přidávají problémy s řečí a vyslovováním (tento jev bývá nazýván afázií, což znamená potíže s řečí, pokud je zachovaná funkce sluchu a mluvidel), pacient často neumí dokončit myšlenku, jelikož zapomíná souvislosti uprostřed věty. Přestává umět nazývat předměty správně.

Pro jedince s AD je typické, že se straní společnosti a omezuje své společenské aktivity. Má snížené organizační a plánovací schopnosti a často dává výpověď z práce. Je náladový a úzkostný. Mívá potíže s poruchami chování, v některých případech bývá i agresivní. Agresivita může mít podobu slovní, ve vážnějších případech i fyzickou, přičemž nejvíce bývají napadáni blízcí nemocného, tedy ti, kdo o něho pečují. Též se na sebe snaží nadměrně upozornit, vydává neobvyklé zvuky a často také odchází z domova, případně jiného místa, kde pobývá. Zároveň u některých jedinců trpících touto chorobou pozorujeme psychotické obtíže, například halucinace a bludy.^{9,14,46}

Problémy nastávají také u motorických funkcí, kdy se postupem času dostaví stav zvaný apraxie, což znamená, že má pacient motorické funkce zachované, ale není schopen výkonu motorických aktivit, které má již naučené, například jízdy na kole.⁴⁶

Během několika let se tedy nemoc postupně zhoršuje, až nakonec končí smrtí. Riziková je imobilita pacienta, který kvůli ní může být náchylnější k mnoha infekčním onemocněním, smrt v důsledku plicních onemocnění tedy není výjimkou. Může dojít k poškození oblasti mozku, která kontroluje polykání, což může vést k následné dehydrataci a podvyživení a následné smrti pacienta.⁹

3.2.3 Rizikové faktory onemocnění

3.2.3.1 Faktory ovlivnitelné

3.2.3.1.1 Rodinná anamnéza

Pokud má někdo v rodině jedince Alzheimerovu chorobu, nemusí to nutně znamenat, že daný jedinec onemocní Alzheimerovou chorobou také. Svou roli hraje i životní styl jedince, například to, jak zdravě se stravuje nebo kolik svého času věnuje aktivnímu pohybu.⁹

3.2.3.1.2 Věk

Věk je nejčastějším rizikovým faktorem vzniku demencí a tedy i AD. S rostoucím věkem pravděpodobnost vzniku AD stoupá. Většina pacientů patří do věkové skupiny 65 let a více. Nad 65 let se zvyšuje prevalence onemocnění rychleji, kdy ve věkovém rozmezí 65-74 let trpí touto nemocí okolo 3 % populace. Mezi 75 a 85 lety se zvyšuje počet jedinců na 17 %, nad 85 let dokonce na 32 %.^{9,46,47}

3.2.3.1.3 Geny APOE e4

APOE je apolipoprotein, důležitý prvek pro přenášení cholesterolu v krvi. Běžně jsou jeho formy APOE e2, e3 a e4, z nichž forma e4 je druhou nejčastější po formě e3. Pokud někdo zdědí alelu e4, může být u něj zvýšená pravděpodobnost výskytu AD (a to až u 70 % pacientů) ve srovnání s alelou e3, a je zde oproti alelám e3 a e2 zvýšené riziko rozvoje choroby v nižším věku. Naopak pokud má pacient alelu e2, pak tato alela může riziko vzniku snižovat.^{9,53}

3.2.3.2 Faktory ovlivnitelné

Genetické poruchy či rodinnou anamnézu nemůžeme nijak ovlivnit, jsou však i faktory, na jejichž ovlivnění se můžeme sami podílet.

3.2.3.2.1 Kardiovaskulární rizikové faktory

Rizikové faktory, které ovlivňují zdraví srdce a cév mohou též negativně působit na stav mozku. Mozek potřebuje, aby byl do něho pumpován dostatek krve za účelem dostatečného přísunu kyslíku, a tím pádem jeho správné funkce. Spotřebovává totiž až dvacet procent spotřeby tělesného kyslíku, přestože jeho hmotnost činí pouze 2 % celkové tělesné hmotnosti. Problém tedy může nastat, pokud jsou cévy nebo srdce ohrožovány rizikovými faktory negativně působícími na jejich funkce, což se dále promítá i do fungování mozku a často vede tento stav právě k demenci. K negativnímu ovlivnění mozku tedy dochází při zvýšené hladině krevního cukru, cholesterolu, vysokém tlaku nebo obezitě.⁴⁷

Naopak faktory, které působí pozitivně na stav srdce a cév, mohou působit pozitivně i na stav mozku a snižovat tak pravděpodobnost vzniku demence. Pozitivní vliv má hlavně dostatek fyzické aktivity a zdravá strava.⁹

3.2.3.2.2 Traumatické poranění mozku

Ke zvýšenému riziku vzniku poruch kognitivních funkcí, demencí, neurodegenerativních onemocnění, a tak i Alzheimerovy choroby může dojít díky mikrotraumatům způsobeným poraněním mozku, a to zpravidla prudkými otřesy nebo nárazy, či proniknutím cizího tělesa do mozku, což může být následek pádu nebo automobilových nehod. Možnost vzniku mozkového traumatu existuje také při kontaktních sportech. Těmito se myslí například fotbal, box nebo další bojové sporty, při kterých je častější poranění hlavy obvyklé. Při sportech, při kterých dochází k opakovaným úderům do hlavy, se později může rozvinout takzvaná chronická traumatická encefalopatie, při které jsou patrné mozkové změny, které mohou postupně vést až k demenci.⁹

3.2.3.2.3 Vzdělání

Vzdělání může mít vliv na vznik Alzheimerovy choroby.⁴⁷ Lidé, kteří dosáhli nižšího vzdělání, mají vyšší šanci rizika vzniku demencí než ti, kteří mají vzdělání vyšší a u nichž jsou neurony propojovány na více úrovních než u lidí s nižším vzděláváním. Díky většímu počtu propojení neuronů je poté možné řešit kognitivní úkoly pomocí cest neuronů, které u lidí s nižším vzděláním nemusí být vytvořeny. Vzdělání má navíc vliv i na úroveň života. Zdravý a aktivní životní styl může znamenat menší riziko vzniku chorob spojených se životním stylem špatným. U těchto lidí je větší možnost snížení kardiovaskulárních rizikových faktorů hrajících roli při vzniku AD.⁹

3.2.3.2.4 Sociální aktivita

Zdraví mozkových buněk může být podpořeno také tím, jak hodně je jedinec během svého života sociálně a psychicky aktivní. Díky zvýšené sociální angažovanosti může být nižší pravděpodobnost, že jedinec onemocní AD. Je však stále předmětem výzkumu, jakým mechanismem přesně působí vyšší sociální aktivita na snížení rizika vzniku tohoto onemocnění.⁹

3.2.4 Diagnostika Alzheimerovy choroby

Než je možné přistoupit k samotné terapii, je třeba nemoc správně diagnostikovat. Důležité je mít informace o pacientově rodinné diagnóze. Dále již může být diagnóza potvrzována také pomocí testových a klinických zkoušek. Jako screeningové vyšetření slouží test MMSE. Spolehlivost tohoto testu nemusí být vždy dostačující a i člověk, který dle tohoto testu má dobré výsledky, může onemocnět AD. Použit může být i test kreslení hodin. K potvrzení diagnózy slouží některé znaky tzv. markery značící, že se jedná o AD. Řadí se sem poruchy epizodické paměti, zobrazovacími metodami zjištěná atrofie temporálních struktur, rozdílný poměr proteinů v likvoru oproti zdravým osobám. Celkově mohou vyšetření trvat i několik týdnů.^{9,10}

3.2.5 Terapie Alzheimerovy choroby

Existují dva přístupy v léčbě AD - přístup nefarmakologický a přístup farmakologický, přičemž oba mají v terapii této choroby důležitou funkci. Ani jedním z nich však nelze dosáhnout úplného vyléčení pacienta.^{9,46,54}

3.2.5.1 Nefarmakologická léčba

Nefarmakologickou nazýváme takovou léčbu, která se nevyznačuje podáváním léčiv. Díky ní je možné zvýšit kvalitu života pacienta, ale také snížit vedlejší nežádoucí projevy způsobené tímto onemocněním, např. poruchy spánku, agresivitu, psychomotorickou excitaci, depresivní stavy aj. Existuje několik nefarmakologických opatření, která je dobré dodržovat, pokud trpí pacient AD. Je třeba, aby měl pacient pravidelný režim, ve kterém budou nastávat změny co nejméně. Dotyčný tak bude lépe schopen zvládat běžnou denní rutinu. Neměla by být užívána léčiva s anticholinergním účinkem, která by mohla způsobit zhoršení onemocnění. Je potřeba léčit faktory, které by mohly onemocnění zhoršit. Mezi takové řadíme vysoký krevní tlak, diabetes mellitus, hyperlipidémii či malnutrici. Dále můžeme uvést vyvolání vzpomínky pomocí oblíbené hudby či pohybovou aktivitu, která hlavně v podobě kombinace aerobního a anaerobního cvičení zpomaluje pokles kognitivních funkcí u pacientů s AD.^{9,54}

3.2.5.2 Farmakologická léčba

Farmakologická léčba se vyznačuje použitím léčiv k terapii daného onemocnění. Dosud však zatím nebylo objeveno léčivo, díky kterému by bylo možné AD úplně vyléčit. Toto onemocnění je tedy nakonec fatální. Pomocí farmakoterapie lze alespoň dočasně zlepšit symptomy tohoto onemocnění a oddálit nástup těžkých stádií. Dříve, než se přistoupí k samotné léčbě, je třeba prokázat, zda je choroba u konkrétního pacienta opravdu přítomna. K těmto důkazům slouží aktuální doporučené postupy. Léčiva jsou prospěšná především k dočasnému zlepšení kognitivních funkcí, bývají proto nazývána kognitiviv, případně antidemencii dle ATC klasifikace. V dnešní době se používají dvě skupiny léčiv, konkrétně inhibitory AChE a inhibitory NMDA receptorů.^{9,14,46,54}

3.2.5.2.1 Inhibitory cholinesteráz

Při AD dochází ke sníženému uvolňování neurotransmiteru acetylcholinu a zároveň k jeho snížené tvorbě, a tedy k jeho nedostatku. Inhibitory AChE a BuChE mají za úkol inhibovat tyto enzymy, které mají vychytávat volný acetylcholin. Tím dojde ke zvýšení hladiny tohoto neurotransmiteru v synaptické štěrbině. Hladina acetylcholinu má vliv na paměťové schopnosti a kvalitativní úroveň vědomí. Také je pomocí inhibitorů cholinesteráz zpomalováno tvoření beta-amyloidu, čímž je podpořen účinek při terapii této nemoci.^{46,54}

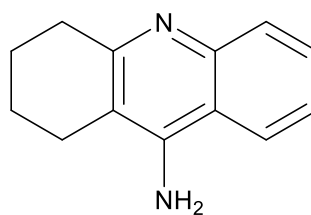
Je třeba, aby byla léčba zahájena co nejdříve. Pokud se tak nestane, onemocnění se rychle zhoršuje až do nejtěžšího stádia, které je již nevratné. Největší účinek mají tato léčiva prokázán u mírnějších až středních stádií onemocnění.⁵⁴

Z této skupiny se dnes užívají tři léčiva. Řadíme sem galanthamin, donepezil a rivastigmin. U všech těchto léčiv je třeba na počátku vytitrovat dávku pro konkrétního pacienta, aby byly sníženy nežádoucí účinky, například zažívací obtíže, které jsou při užívání těchto medikamentů celkem časté.^{14,46,54} Je také nutné monitorování terapeutických hladin daných látek.⁵⁵

Takrin (Obrázek 3-13) byl prvním inhibitorem acetylcholinesterázy, který byl používán v souvislosti s AD. Nakonec byl však stažen z trhu jen krátce po jeho zavedení, jelikož nebyl pacienty dobře tolerován a působil toxicky na játra.^{56,57} Přes jeho účinnost tedy není takrin léčivem vhodným k preskripci právě z důvodu tohoto výrazného nežádoucího účinku.

Tato látka působí mechanismem nekompetitivní inhibice AChE a BuChE, kdy zvyšuje aktivitu acetylcholinu na cholinergním receptoru.⁵⁵ Váže se totiž nedaleko aktivního místa receptoru pro acetylcholin. Přestože inhibuje obě cholinesterasy, je selektivnější k AchE než k BuChE. Takrin může také působit přímo na mukarinový cholinergní receptor K jeho metabolizaci dochází v játrech pomocí cytochromu CYP1A2. Metabolická dostupnost takrinu je nižší, pohybuje se v rozmezí přibližně 2-40 % intravenózní dávky.⁵⁸

Mezi nežádoucí účinky takrinu patří zažívací obtíže, stejně jako u následujících zástupců, způsobené vlivem na cholinergní receptory. Dále se může projevit insomnie, úzkost, agitovanost a již výše zmiňovaná hepatotoxicita.

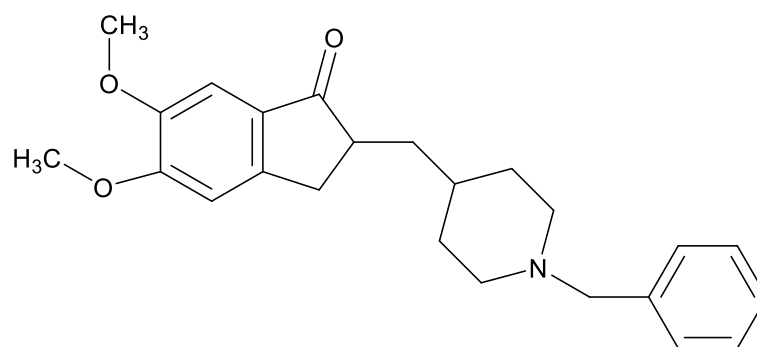


Takrin

Obrázek 3-12: Strukturální vzorec takrinu

Donepezil (Obrázek 3-14) (ALZIL[®], ARICEPT[®], DONEPEZIL ACCORD[®], DONEPEZIL ACTAVIS[®], DONEPEZIL KRKA[®], DONEPEZIL MYLAN[®], DONEPEZIL SANDOZ[®], DONPETHON[®], DOSPELIN[®], KOGNEZIL[®], LANDEX[®], PROMEMORE[®], YASNAL[®])⁵⁹ se řadí do druhé generace inhibitorů AChE, na kterou působí selektivněji než na BuCHE, jelikož ta se oproti AChE umístěné spíše v mozku vyskytuje především v periferních částech nervové soustavy.^{49,56} Látka je používána jako standartní léčivo při léčbě AD. Byla u ní prokázána bezpečnost a dobrá tolerovatelnost u pacientů s mírnou až závažnou formou AD. Biologický poločas dosahuje okolo 60 až 90 hodin, v některých případech až 104 hodin. Látka má též vysokou biologickou dostupnost. K metabolizaci dochází pomocí cytochromu CYP3A4 a také CYP2D6.⁵⁶

Díky tomuto léčivu je zpomalována progresse AD.⁵⁶ Dávka, která bývá užívána je 5 mg, případně 10 mg. U vyšší dávky se více projevují cholinergní nežádoucí účinky. Z těchto důvodů je nutné dávku navyšovat postupně. V některých případech středně těžké a těžké formy onemocnění byl prokázán prospěch z dávky 23 mg/den. S takto vysokou dávkou ale souvisí vyšší projev nežádoucích účinků.^{8,56} Stejně jako u ostatních inhibitorů AChE mezi nejčastější nežádoucí účinky patří zažívací potíže, tedy nauzea, zvracení nebo průjemy. Je možné zaznamenat také nespavost. Pomocí tohoto léčiva nelze zabránit přechodu z MCI na AD, ale můžeme pomocí něho docílit zvýšení kvality života.⁵⁴ U donepezilu byl prokázán pozitivní vliv na zvládnání každodenních činností samotným pacientem, zlepšení kognitivních funkcí zejména v lehkém a středním stádiu a také jeho chování zejména u závažnější formy onemocnění.^{53,56} V případě vysazení léčiva se urychlí progresse onemocnění a pacient často končí v ústavní péči do dvanácti měsíců po vysazení léčby.⁵⁶

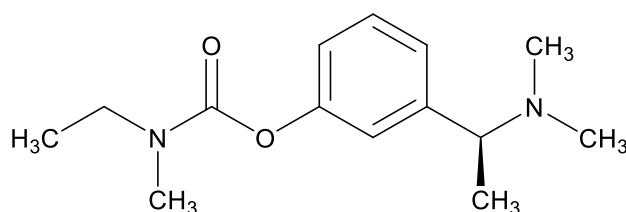


Donepezil

Obrázek 3-13: Strukturální vzorec donepezilu

Rivastigmin (Obrázek 3-15) (EXELON[®], NIMVASTID[®])⁶⁰ má větší selektivitu k AChE než k BuChE. Inhibice enzymů je v jeho případě pseudoireverzibilní. Na cholinesterasy působí inhibičně po dobu přibližně 10 hodin.⁶¹ Poté, co je látka podána *per os*, je poměrně rychle vstřebávána, maximální koncentrace je dosaženo za 0,80-1,67 hodiny. Biodostupnost léčiva je nízká. Na plazmatické bílkoviny se váže pouze asi ze 40 %.⁶¹ Metabolismus této látky neprobíhá v játrech, ale po navázání na AChE, je jeho karbamátová část hydrolyzována. Poté dochází k jejímu štěpení, následné konjugaci se zbytkem kyseliny sírové (sulfátem) a vyloučení z těla.^{62,63} Nežádoucí účinky jsou obdobné, jako u ostatních inhibitorů cholinesteráz. Projevují se hlavně nežádoucí účinky spojené se zažíváním a dále například ospalost a malátnost. Od výše uvedeného takrinu se rivastigmin liší tím, že nezpůsobuje hepatotoxicitu. Nežádoucí účinky mohou být zpomaleny postupným titrováním léčiva.^{55,62}

Rivastigmin je možné jako jediný z léčiv používaných u tohoto onemocnění podávat i pomocí náplastí, kdy účinná látka proniká do těla přes kůži. Léčivo zlepšuje nejen kognitivní, ale také afektivní funkce u pacientů s AD. Působí pozitivně u lehké až středně těžké formy nemoci.⁶³



Rivastigmin

Obrázek 3-14: Strukturální vzorec rivastigminu

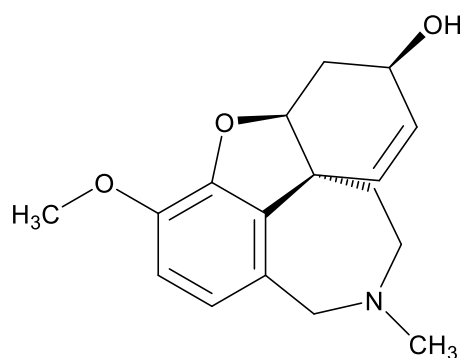
Galanthamin (Obrázek 3-16) (GALANTAMIN MYLAN®)⁶⁴ je látka bazické povahy, konkrétně se jedná o terciární alkaloid, který je získáván z rostliny *Galanthus woronovii* Losink.⁶⁵, neboli sněženky kavkazské, která působí mechanismem inhibice enzymu AChE. Tato inhibice je vratná a kompetitivní. K BuChE má galanthamin afinitu nižší. Druhým mechanismem jeho účinku může být zvyšování citlivosti nikotinových receptorů k acetylcholinu pomocí modulace těchto receptorů. Je to jediná látka využívaná k léčbě AD, která má dva mechanismy účinku.^{66,67} Uvolňují se i jiné neurotransmitery, které se při AD vyskytují v nedostatečném množství.^{53,66} K těmto neurotransmiterům patří například glutamát, který má účinek na paměťové procesy a procesy učení.⁵²

Za udržovací dávku považujeme 16–24 mg galanthaminu na den. Látka dosahuje rychle maximální koncentrace, je málo vázána na plazmatické bílkoviny. Má dlouhý poločas, díky čemuž působí v organismu déle. K metabolizaci dochází zejména v játrech pomocí cytochromu CYP3A4 a CYP 2D6. Pokud by byl tedy podán zároveň s léčivem, která působí inhibicí těchto izoenzymů, došlo by ke zvýšení hladiny galanthaminu a zvýšení jeho účinků na cholinergní systém, což by se projevilo například vyšším výskytem nevolností či zvracení. Mezi tyto inhibitory počítáme například antibiotikum erythromycin.⁶⁶

Látka je dobře tolerována a má pozitivní charakter v působení nejen na kognitivní funkce, ale zároveň i na chování pacienta a zvládání každodenních činností, což ukazují i randomizované studie za použití galanthaminu a placeba.^{52,66} Jeho přínos je navíc prokazatelně vyšší než u rivastigminu a donepezilu.⁶⁶

Bylo prokázáno, že galanthamin zlepšuje stav pacienta i bez ohledu na to, zda je daný pacient nositelem alely APO e4.⁵³ Působí příznivě při AD kombinované s cerebrovaskulární demencí snižováním příznak⁶⁸

U galanthaminu se také vyskytují některé nežádoucí účinky. Můžeme jmenovat ty, které jsou spojené se zažíváním, například nevolnost, závrať, zvracení nebo průjem, snižování tělesné hmotnosti, bolest hlavy a dále nežádoucí účinky spojené se zvýšením cholinergní aktivity, například slabost svalů. Nežádoucí účinky se mohou projevit ve snížené míře, pokud je dávka postupně titrována. Bylo zjištěno, že galanthamin nezpůsobuje, oproti jiným léčivům působícím cholinergním mechanismem, snižování kvality spánku.^{53,67} Je-li nasazena léčba u pacienta s mírnou formou AD včas, je výrazně zpomalena progresse daného onemocnění a větší šance na oddálení typických projevů nemoci.⁸



Galanthamin

Obrázek 3-15: Strukturální vzorec galanthaminu

3.2.5.2.2 Inhibitory NMDA receptorů

Další skupinou léčiv působících proti onemocnění AD jsou inhibitory NMDA receptorů. Při AD je výrazně ovlivněna paměť kvůli excitotoxicitě způsobené nadměrnou produkcí glutamátu, excitačně působící aminokyseliny. Při nadměrné excitaci se dostává nadbytek vápenatých iontů do neuronu, což vyvolá nepřiměřeně zvýšené uvolňování faktorů vyvolávajících apoptózu, ke které poté dochází. Je to způsobeno tím, že enzymy jsou aktivovány nesprávným mechanismem, což má za následek uvolnění proapoptotických enzymů. Inhibicí NMDA receptorů je zlepšeno fungování neuronu a výsledkem je usnadnění synaptického přenosu.

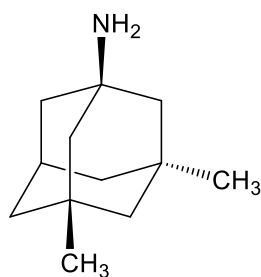
Pomocí inhibitorů NMDA receptorů se zpomaluje progresse onemocnění. Léčba těmito inhibitory má efekt i u závažnějších stádií. Díky ní je jedinec schopen vykonávat každodenní činnosti samostatně delší dobu, než by tomu bylo bez této léčby.^{14,46,50}

Do této skupiny řadíme memantin (Obrázek 3-17) (EBIXA[®], MANTOMED[®], MARIXINO[®], MEMABIX[®], MEMANTIN APOTEX[®], MEMANTIN MYLAN[®], MEMANTIN SANDOZ[®], MEMANTIN STADA[®], MEMANTIN RATIOPHARM[®], MEMANTIN VIPHARM[®], MEMIGMIN[®], MEMIXA[®], MEMOLAN[®], MORYSA[®], NEMDATINE[®], POLMATINE[®]).^{14,46,54,69} Jeho perorální podání není závislé na potravě. Maximální koncentrace je dosaženo za 9-12 hodin. Léčivo se váže na plazmatické proteiny ze 45 %. Memantin se vyhne efektu prvního průchodu játry, proto zde cytochrom P450 nehraje při metabolizaci příliš velkou roli.⁴⁷ Přibližně 48 % memantinu je vyloučeno z organismu v nezměněné formě.⁷⁰ Ve formě přípravku IR je memantin užíván 2 × denně v jednotlivé dávce

10 mg. Pokud se jedná o memantin ER, může být podáván v dávkách 7(počáteční dávka), 14, 21, 28 mg/den (udržovací a zároveň maximální udržovací dávka memantinu ER).⁴⁷

Léčivo je dobře tolerováno a používá se v praxi při léčbě středně těžké až těžké formy onemocnění AD.⁴⁷ Dávku memantinu je nutné natitrovat podle individuální potřeby pacienta.^{14,46,47,54} U léčiva se mohou projevit některé nežádoucí účinky, nejčastěji se jedná o bolesti hlavy, závratě, průjemy.⁴⁷

Memantin je dnes používán také v kombinaci s donepezilem v dávce 28 mg memantinu a 10 mg donepezilu. Bylo zjištěno, že použití léčiv v této kombinaci je výhodnější než použití léčiva každého zvlášť. Memantin může být použit i v kombinaci s jinými inhibitory cholinesteráz.^{47,70} Léková forma s prodloužením uvolňováním je výhodná z důvodu jejího podávání pouze v jedné denní dávce, která je předpokladem pro vyšší adherenci pacienta k léčbě.⁴⁷

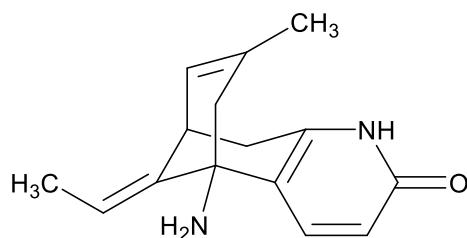


Memantin

Obrázek 3-16: Strukturální vzorec memantinu

3.2.5.2.3 Ostatní přípravky

Huperzin (Obrázek 3-18) je látka přírodního charakteru izolovaná z rostliny *Huperzia serrata* (Thunb.) Trevis, která působí mechanismem reverzibilní inibice AChE. Je součástí tradiční čínské medicíny.^{71,72,74} Huperzin může být prospěšný při léčbě Alzheimerovy choroby a má relativně malou pravděpodobnost výskytu cholinergních nežádoucích účinků. Co se týká inhibiční koncentrace IC₅₀ vůči AChE, huperzin byl dokonce účinnější než galanthamin, fyzostigmin a takrin. Huperzin také tlumí toxicitu vyvolanou NMDA. Ukázalo se, že léčivo zlepšuje kognitivní funkce a zvládání každodenního života u pacientů s Alzheimerovou chorobou.⁷³ Byly u něho zjištěny i antioxidační a neuroprotektivní účinky.⁷⁴



Huperzin

Obrázek 3-17: Strukturální vzorec huperzinu

Extrakt z *Ginkgo biloba* může mít též prospěšné účinky při léčbě AD, proto se používá jako doplňková léčba při léčbě inhibitory cholinesteráz. Prospěšnější a stále bezpečné je dle provedených studií užití 240 mg za den oproti 120 mg za den, kdy v mnoha případech není dosaženo úplné odpovědi. Při podání dochází ke zlepšování mozkové cirkulace, paměti a schopnosti učit se, k antioxidačnímu a protizánětlivému působení. Nebyl ale prokázán preventivní účinek užívání *Ginkgo biloba* na vznik AD. Rostlina obsahuje především flavonoidy, které mají za úkol inaktivovat toxicky aktivní kyslík, látky terpenoidní, konkrétně bilobalid a ginkgolidy typu A, B a C. Ty působí neuroprotektivně v mozku a zároveň antagonizují faktor aktivace destiček. V rostlině je přítomno menší množství kyseliny ginkgolové, která je často původcem alergických reakcí. Účinek *Ginkgo biloba* na AD je stále předmětem zkoumání.^{75,76,77}

3.2.5.2.4 Léčba přidružených obtíží

AD se může projevovat nejen čistě demencí, ale i dalšími příznaky, které zhoršují celkový stav pacienta. Je potřeba tyto příznaky snížit pomocí vhodné léčby. V těchto případech jsou podávána například léčiva působící proti poruchám chování, konkrétně antipsychotika (haloperidol, tiaprid, melperon, risperidon, olanzapin, quetiapin), avšak u těchto léčiv je snaha podávání vždy opravdu jen v závažných případech poruch behaviorálních funkcí. U pacienta s AD se mohou vyskytnout úzkostné stavy. Tyto symptomy jsou léčeny anxiolytiky (oxazepam, alprazolam, lorazepam, diazepam). Úzkost pak často ustupuje, proto je v mnoha případech možno léčbu anxiolytiky ukončit z důvodu vymizení příznaků. Dále bývají v některých případech užívána antidepresiva, pokud se u pacienta s AD vyskytnou depresivní stavy. (SSRI – sertralin, citalopram, IMAO – moklobemid, selegilin). Poruchy spánku jsou nejčastěji léčeny pomocí nebenzodiazepinových hypnotik (zolpidem, zopiklon), při dlouhodobější potřebě

léčby jsou volena spíše antidepresiva (mirtazapin, amitriptylin, trazodon), pokud dochází i k poruchám cyklu spánek-bdění, mohou být volena i antipsychotika (tiaprid, melperon).⁵⁴

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Použitý materiál a chemikálie

4.1.1 Frakce použitá k izolaci

Pro vlastní izolaci alkaloidů byla použita frakce, která byla již dříve připravena na Katedře farmaceutické botaniky Farmaceutické fakulty v Hradci Králové z rostliny *Vinca minor* L. Jednalo se konkrétně o frakci VM 378–389.

4.1.2 Použitá rozpouštědla

Etanol, p. a. (Penta)

Chloroform, p.a. (Penta)

Toluen, p. a. (Penta)

Diethylamin, p.a. (LachNer)

4.1.3 Použitá detekční činidla

Dragendorffovo činidlo

4.1.4 Vyvíjecí soustavy pro tenkovrstvou chromatografii (TLC)

S: To: EtOH :DEA 90 : 5 : 5

4.1.5 Použitý materiál pro analytickou a preparativní tenkovrstvou chromatografii

Kiesel gel SiO₂ F254, Merck, 20 cm × 20 cm, hliníková deska s vrstvou silikagelu pro TLC; vrstva 0,2 mm

4.2 Izolace alkaloidů

4.2.1 Sloupcová chromatografie

Pomocí sloupcové chromatografie byla získána daná frakce VM 378-389. Provedení této metody nebylo předmětem diplomové práce, bylo provedeno na Katedře farmaceutické botaniky.

4.2.2 Tenkovrstvá chromatografie

4.2.2.1 Tenkovrstvá chromatografie frakce 378-389

Tenkovrstvá chromatografie byla prováděna klasicky ve vyvíjecích komorách, které byly nasyceny parami mobilní fáze. Poté byly do komory vkládány jednotlivé desky s naneseným vzorkem a po přiklopení víka komory se nechala deska vyvíjet po dobu přibližně dvaceti minut. Následně byla zjišťována přítomnost alkaloidů nejprve pomocí detekce UV lampou při vlnové délce 254 a 366 nm a poté pomocí Dragendorffova činidla aplikovaného na desku.

4.2.2.2 Hledání vhodné mobilní fáze

Nejprve bylo vyzkoušeno vyvinutí vzorku naneseného na analytické desce v soustavě To:DEA v poměru 95:5. Po prvním vyvinutí nebyla zóna rozdělena, proto byla deska vyvinuta ještě jednou. Přesto však nedošlo k oddělení. Daná mobilní fáze tedy byla pozměněna na fázi To:EtOH:DEA v poměru 90:5:5. Díky této fázi došlo k dostatečnému oddělení vzorku na více zón, mohla být tedy použita pro další práci

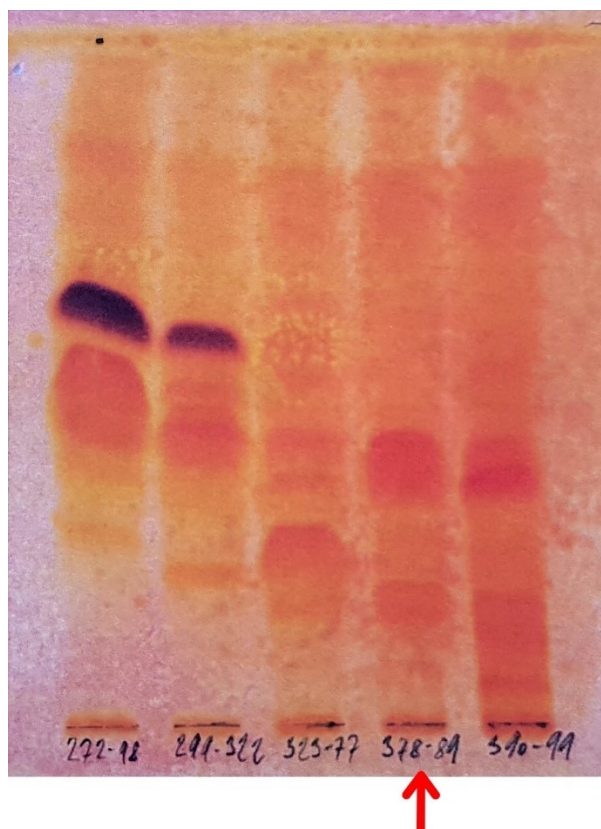
4.2.3 Alkaloidní frakce

V této diplomové práci byla zpracovávána alkaloidní frakce 378–389 o hmotnosti 1,74 g získaná extrakcí z nati rostliny *Vinca minor* L. již dříve na Katedře farmaceutické botaniky (Obrázek a tabulka 4-1).

Tabulka 4-1: Charakteristika zpracovávané frakce

Spojené frakce	Frakce	Eluce	TA (g)	Odparek (g)	Popis
378-389	378-382	Bz+CHCl ₃ =15+85	9,501	1,74	Tmavě hnědý, pevný

Bz=benzín lékařský

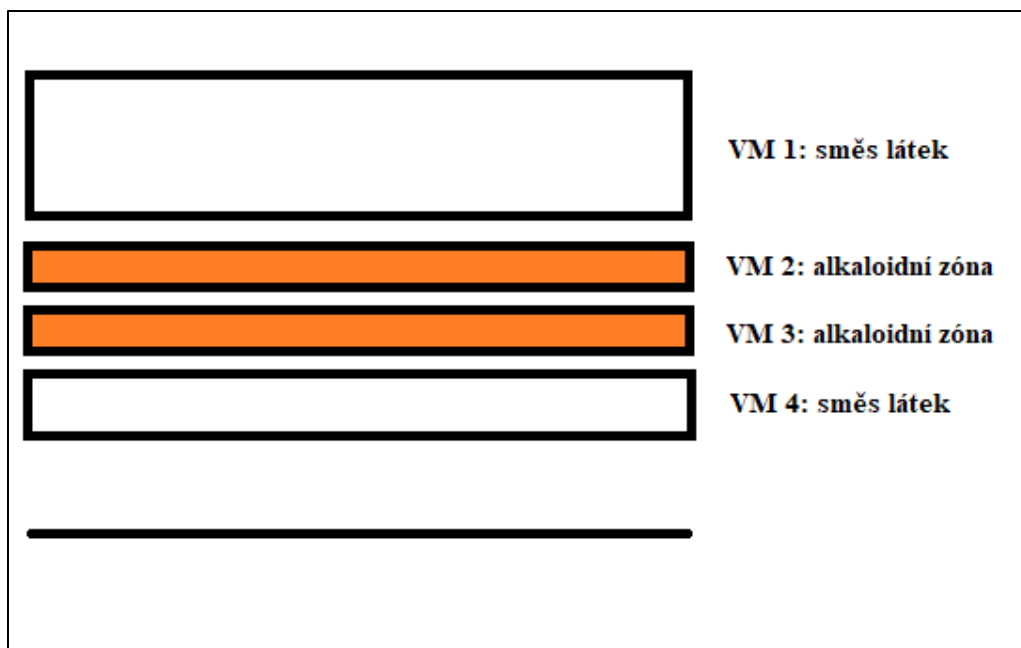


Obrázek 4-1: Zpracovávaná frakce

4.2.4 Postup samotné izolace

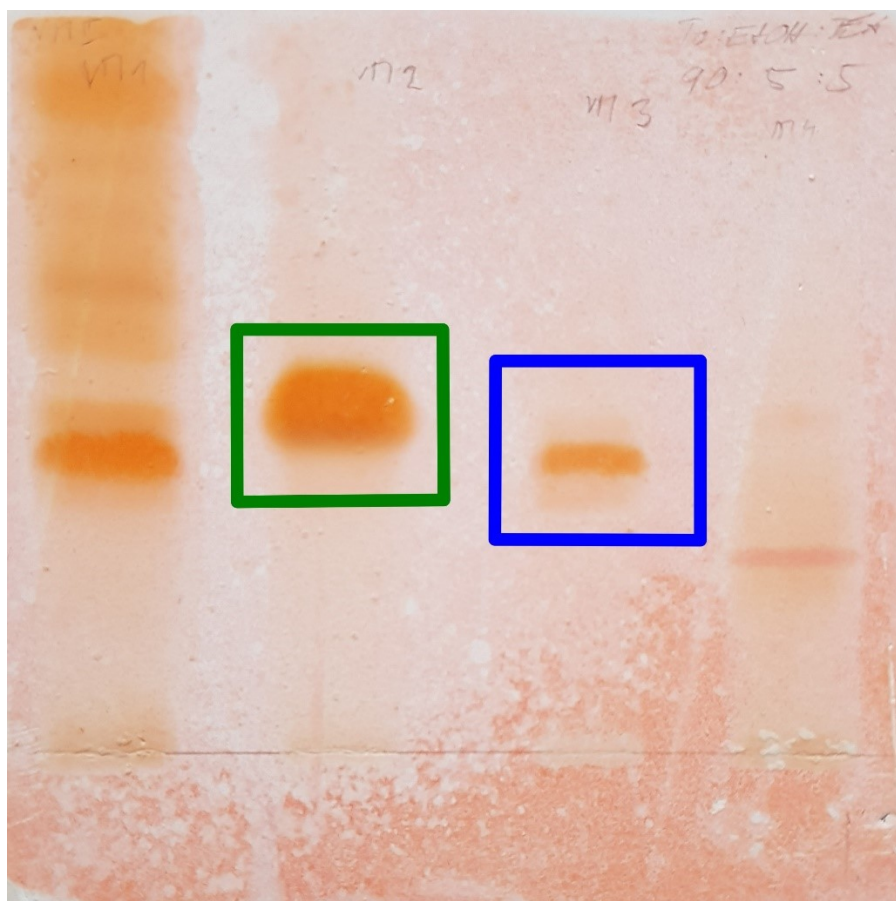
Z dané frakce bylo odebráno asi 400 mg a naneseno celkem na 19 desek k preparativní tenkovrstvé chromatografii.

Vzorek se pomocí preparativní tenkovrstvé chromatografie za využití mobilní fáze rozdělil po 2 vyvinutích na 4 zóny VM 1- VM 4 (Obr. 4-2)



Obrázek 4-2: Zóny získané po TLC původní frakce

Jednolivé zóny byly následně vyškrabány z desky a každá byla promyta pomocí směsi $\text{CH}_3\text{Cl}:\text{EtOH}$ v poměru 1:1. Po odfoukání byl zbytek rozpuštěn v menším množství chloroformu s malým přídavkem ethanolu. Všechny čtyři zóny byly nanесeny na společnou analytickou desku a vyvinuty v dané soustavě $\text{To}:\text{EtOH}:\text{DEA}$ v poměru 90:5:5. Výsledek této preparativní tenkovrstvé chromatografie je znázorněn na následujícím obrázku. (Obrázek 4-3)



Obrázek 4-3: Analytická deska zón VM 1-VM 4

K dalšímu zpracování byly vybrány zóny VM 2 a VM 3 (obr. 4-3, zóna VM2 a VM3). Dále byla provedena analytická TLC pouze těchto zón, kdy zóna VM3 se dělila na 3 další zóny a u zóny VM 2 se zdálo, že dále obsahuje 2 látky obtížně separovatelné.

Množství izolované ze zóny VM 2 činila 3,4 mg. Hmotnost izolované zóny VM 3 činila 33,9 mg. Postupně bylo izolováno ještě další množství složek VM 2 a VM 3.

Obsah získaný ze zóny VM2 byl nanesen na další 2 desky, na které bylo použito 22,8 mg této složky. Z obsahu získaného ze zóny VM 3 bylo použito 42,4mg a nanášeno na 4 desky TLC o rozměrech 10x20 cm.

Získaných 22,8 mg ze zóny VM 2 bylo nanášeno na 2 desky a 42,4 mg ze získané zóny VM3 na 4 desky. Dále bylo použito ještě dalších 202,8 mg z první původní frakce VM 378-389 a nanášeno na 16 desek.

Látka získaná postupně z původní zóny VM2 se ukázala být stále nedočištěná i přes několik postupných zpracování pomocí TLC, kdy každá deska byla vyvinuta minimálně 2×. Navíc se ukázalo, že se nejedná o látku alkaloidního původu, ale tukového charakteru. Dále se s ní tedy nepracovalo.

Látka ze zóny VM3 se izolovala obtížně, jelikož se vždy po dalším nanesení na desku, vyvinutí, vyškrabání, promytí a znovunanesení ukázalo, že se dále dělí na další zóny. Nejprve bylo z původní frakce doizolováno více zóny VM3. Celá část získaná ze zóny VM3 byla poté nanesena na další desky, kdy se tato zóna rozdělila na 3 další zóny (VM3a-c). Prostřední zóna (VM3b), která se po aplikaci Dragendorffova činidla jevila jako alkaloidní byla vyškrabána a opět nanesena na další desky. Tentokrát se po 3 dvou vyvinutích rozdělila na 3 zóny (VM3b₁₋₃). Poslední zóna (VM3b₃) byla vyškrabána, promyta a nanesena na analytickou desku, kdy už se látka jevila jako čistá. Po několika přečištění se tedy podařilo izolovat látku VM3b₃ v množství 45,6 mg výsledné látky, která dokonce krystalizovala.

Desky musely být vyvíjeny 2× až 3×, aby se konkrétní část frakce dostatečně separovala na jednotlivé zóny.

4.3 Strukturní analýza jednotlivých složek

4.3.1 GC-MS analýza alkaloidní frakce VM 378-379

K GC-MS analýze byl použit chromatograf Agilent Technologies 7890 A GC 5975 inert MSD který pracuje v EI režimu při 70 eV. Typ kolony, která byla použita k separaci, byl DB-5 MS (30 m × 0.25 mm × 0.25 μm). Pomocí GC-MS analýzy byla zjišťována molekulová hmotnost vzorků.

Měření probíhalo při teplotách 100-300 °C. Nejprve docházelo ke zvyšování teploty postupně po 15 °C za minutu. Takto tomu bylo v rozmezí od 100 °C do 180 °C.

Po dobu jedné minuty pak byla při dosažení 180 °C tato teplota udržována. Dále byla po 15 °C zvyšována, tentokrát rychlostí 5 °C/min, dokud nebylo dosaženo horní teplotní hranice 300 °C. Tato teplota pak byla udržována ještě dalších 40 minut.

Nástřik vzorku na kolonu probíhal při teplotě 180 °C. Rychlost průtoku nosného plynu (helium) činila 0,8 ml/min. Detekovány byly fragmenty v detekčním rozmezí m/35-600. Bylo získáno spektrum izolovaného alkaloidu, které bylo porovnáno s daty uvedenými v literatuře.

4.3.2 Analýza NMR

Za laboratorní teploty byla naměřena NMR spektra daného alkaloidu, konkrétně na spektrofotometru Varian Iniova 500, který pracuje při 499,87 MHz pro ¹H jádra

a 125,70 MHz pro ^{13}C jádra. Měření probíhalo v roztocích CDCl_3 případně CD_3OD a to při teplotě 25 °C.

Pomocí OneNMR sondy, která je dvoukanálová, gradientní a širokopásmová, a je možné u ní regulovat teplotu, došlo k ozařování a detekci signálu. Byly změřeny chemické signály jako hodnoty δ pars per milion (ppm), které byly nepřímo vztaženy ke standardu, zde konkrétně TMS, pomocí zbytkového signálu rozpouštědla.

Studie NMR byla prováděna na Farmaceutické fakultě Univerzity Karlovy v Hradci Králové, na Katedře organické a bioorganické chemie. Měření i interpretaci spekter provedl doc. PharmDr. Jiří Kuneš.

4.3.3 Analýza ESI-MS

Analýza byla prováděna na LC/MS Thermo Finnigan LCQDuo, iontová past. Probíhala pomocí elektrospreje v kladném módu (ESI+). Daný alkaloid byl zde analyzován pomocí této metody ESI, jelikož neionizoval za podmínek měření EI spekter. Byla tak zjišťována Mr daného alkaloidu. Látka byla rozpuštěná v methanolu ($c=1\text{mg/ml}$).

4.3.4 Optická otáčivost

V roztoku alkaloidu byla změřena optická otáčivost. Měření proběhlo při 20 °C na automatickém polarimetru ADP 220 BS v prostředí chloroformu. Specifická optická otáčivost byla vypočtena ze vzorce:

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

t – teplota měření

D – linie sodíkového světla

α – naměřená optická otáčivost [°C]

c – koncentrace naměřeného alkaloidu [$\text{g} \times 100 \text{ ml}^{-1}$]

l – délka kyvety [dm]

4.4 Metody pro screening biologických aktivit izolovaného alkaloidu

4.4.1 Stanovení inhibiční aktivity izolovaného alkaloidu vůči erytrocitární AChE a sérové BuChE

Toto měření bylo prováděno na Katedře farmaceutické botaniky Farmaceutické fakulty v Hradci Králové prof. RNDr. Lubomír Opletalem, CSc. Byla zjišťována inhibiční aktivita alkaloidu vůči enzymům AChE a BuChE. Podrobný postup metody je uveden v následující literatuře. (Cahlíková et al., 2015)⁷⁸

4.4.1.1 Podmínky měření

Měření bylo provedeno při vlnové délce 453 nm, teplotě 37 °C. Probíhalo v prostředí fosfátového pufru v mikrotitračních destičkách.

4.4.1.2 Použitý materiál

AChE pro měření byla získána z jader lidských erytrocytů, BuChE z lidské plazmy.

4.4.1.3 Použité chemikálie

- acetylthiocholin jodid, p. a. (Sigma – Aldrich, Praha)(ATChI)
- butyrylthiocholin jodid, p. a. (Sigma – Adrich, Praha)
- 5mM 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina, $\geq 98\%$ (Sigma-Aldrich, Praha) (DTNB)
- 0,1 M fosfátový pufr, pH 7,4 (chemikálie pro přípravu pufru: dodekahydrát hydrogenfosforečnanu disodného, p. a. (Lanchema), dihydrát dihydrogenfosforečnanu sodného, p.a. (Lanchema))
- galanthamin hydrobromid, (Changsha Organic Haerb Inc., People republic of China) ($C_{17}H_{21}NO_3$)
- huperzin A, (Tai'an zhonghui Plant Biochemical Co., Ltd., People Republic of China)
- dimethylsulfoxid, p. a. (Sigma-Aldrich)
- chlorid sodný p. a. (Lachema, Brno) (NaCl)

4.4.1.4 Použitá činidla

- Roztok 10mM ATChI byl připraven rozpuštěním příslušného množství látky ve vodě. Roztok musel být čirý. Činidlo bylo uchováváno v chladničce při 4°C po dobu maximálně 1 týdne.
- Roztok 10mM BuTChI byl připraven stejným postupem jako roztok ATChI.
- Roztok 5mM DTNB byl připraven přímým rozpouštěním příslušného množství DTNB v 100 mM fosfátovém pufru pH 7,4. Roztok smí být jen slabě nažloutlý. Činidlo bylo uchováváno v chladničce při 4°C po dobu maximálně 1 týden.

4.4.1.5 Použité pufrы

- 5mM fosfátový pufr pH 7,4 obsahující 150 mM chloridu sodného 8,766 g chloridu sodného p. a. se rozpustí v 5mM fosfátovém pufru pH 7,4 a doplní se jím do 1000 ml

4.4.1.6 Přístroje

- mikrotitrační destičky 96 jamek (Fisher, Pardubice)
- odstředivka Boeco U-32R (Boeco, Hamburg, Germany) s rotorem Hettich 1611 (Hettich, Tuttlingen, Germany)
- statistický program GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, California, USA, 2006)

4.4.1.7 Příprava pouzder erytrocytů

Erytrocytární pouzdra byla získávána z čerstvě odebrané krve zdravých dobrovolníků, ke které byly přidány 2 ml 3,4 % citrátu sodného na množství 18 ml krve. Krev byla rozdělena po stejných částech do 5ml šroubovacích zkumavek. Následně byla provedena centrifugace, která probíhala rychlostí 4000 rpm po dobu 10 minut za teploty 4 °C. Po skončení první centrifugace byla plazma odsána tak, aby v ní nezůstaly erytrocyty a uchovávala se v lednici při teplotě 4 °C do té doby, než mohla být stanovena aktivita BuChE (takto však bylo možné vzorek uchovávat maximálně 6 hodin).

Zbývá plazma získaná ze sedimentů erytrocytů byla šetrně odsána bezpopelovým filtračním papírem, který měl hlazený povrch a sestřiženou špičku. Poté se odečetl objem masy

erytrocytů a sediment byl zředěn fosfátovým pufrům o pH 7,4 a koncentraci 5 mM, který obsahoval 10 mM NaCl. Pufr byl použit v takovém množství, aby objem suspenze byl 13 ml. Vše se pečlivě promíchalo a byla provedena centrifugace za podmínek uvedených výše. Promytí bylo takto provedeno celkem 3×, čímž došlo k úplnému odstranění promývací kapaliny. Poté byl přidán fosfátový pufr o koncentraci 5 mM, pH 7,4 a bez obsahu chloridu sodného v takovém množství, aby byl objemový poměr erytrocyty pufr 1+8-9. Směs byla zhomogenizována a vpravena do Erlenmayerovy baňky. Erytrocyty se nechaly spontánně hemolyzovat při míchání teflonovým míchadlem a 300 rpm. Poté, co byla řízená hemolýza u konce, šlo již u této suspenze stanovit acetylcholinesterázovou aktivitu. Bylo možné popřípadě upravit absorbanci za pomoci fosfátového pufru o koncentraci 5 mM (absorbance musela mít hodnotu 0,08 – 0,15). Před použitím byl naředěný hemolyzát uchováván při teplotě -22 °C.

Stejným způsobem byla stanovována butyrylcholinesterázová aktivita plazmy, kdy absorbance musela být 0,15 – 0,20. Uchovávání zde probíhalo také za stejných podmínek jako u hemolyzátu.

4.4.1.8 Stanovení inhibiční aktivity (IC₅₀) izolovaného alkaloidu VM3b₃ vůči cholinesterázám

Za použití Ellmanovy spektrofotometrické metody byla stanovena hodnota IC₅₀ za použití 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoové kyseliny (DTNB) [$\lambda = 436$ nm (AChE), nebo $\lambda = 412$ nm (BuChE)]. Byla stanovována SH-skupina thiocholinu (estery thiocholinu byly použity jako substráty). Ta se navázala na DTNB. Následně vznikl žlutě zbarvený produkt, který byl stanoven spektrofotometrickou metodou při vlnové délce 436 nm. Sledovaný byl nárůst absorbance za 1 minutu. Poté byly z naměřených hodnot poklesu aktivity AChE nebo BuChE vypočítány hodnoty IC₅₀ pomocí nelineární regrese v programu GraphPaD Prism (verze 3.02 pro Windows; výrobce Graph PaD Software, San Diego, CA, USA). Získané hodnoty byly poté porovnávány s hodnotami IC₅₀ známých inhibitorů cholinesteráz, konkrétně huperzinem A a galanthaminem. Nakonec byla vypočítána procentuální inhibice dle vzorce:

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

%I – procento inhibice

ΔA_{BL} – nárůst absorbance slepého vzorku za 1 minutu

ΔA_{SA} – nárůst absorbance měřeného vzorku

Stanovení aktivity enzymů: na mikrotitrační destičku bylo do každé z 6 jamek pipetováno 8,3 μ l hemolyzátu nebo plazmy. Poté se přidalo 283 μ l 5 mM DTNB, 8,3 μ l DMSO. Vše se promíchalo na mikrotřepače a směs byla inkubována v komoře readeru při teplotě 37 °C po dobu 5 minut. Následně je přidáno 33,3 μ l roztoku substrátu, konkrétně 10 mM acetylcholinjodidu nebo 10mM butyrylthiocholinjodidu) a při příslušné vlnové délce zjišťována absorbance (AChE – hemolyzát: 436 nm; BuChE – plazma: 412 nm). Nakonec byl vypočten rozdíl obvyklým způsobem a stanoven průměr a směrodatná odchylka.

Stanovení aktivity látek: byly použity stejné objemy roztoku substrátu a činidel (3 jamky v 6 řadách) a stejný postup měření. Byly použity koncentrace látky: 40 mM, 10 mM, 4 mM, 1 mM, 0,4 mM. Bylo možné případné použití další série koncentrací v tomto početním modu, pokud byla aktivita vysoká. Do poslední 6. řady se pipetovalo DMSO, která zde plní funkci slepého vzorku.

Získané hodnoty byly poté porovnávány s hodnotami IC_{50} známých inhibitorů cholinesteráz, konkrétně huperzinem A (IC_{50} HuAChE = $0,033 \pm 0,001$ μ M, IC_{50} HuBuChE > 1000 μ M) a galanthaminem (IC_{50} HuAChE = $1,710 \pm 0,065$ μ M, HuBuChE = $42,301 \pm 0,065$ μ M).

4.4.2 Stanovení cytotoxické aktivity izolovaného alkaloidu VM3b₃

Stanovení cytotoxické aktivity izolovaného alkaloidu nebylo provedeno na Farmaceutické fakultě v Hradci Králové, nýbrž bylo spolupracováno s Katedrou mikrobiologie, výživy a dietetiky, Fakulty agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů, České zemědělské univerzity v Praze. Testování bylo provedeno Ing. Ivo Doskočilem. Podrobnější popis metody lze nalézt v následující literatuře. (Doskočil et al., 2015)⁷⁹

5 VÝSLEDKY

V diplomové práci byla zpracovávána frakce 378-389. Po vyvinutí části frakce vznikly 4 zóny (VM 1-4), ze kterých byla dále zpracovávána zóna VM 2 a VM 3. Přičemž u látky izolované ze zóny VM 2 se ukázalo, že se nejedná o alkaloid, ale látku tukového charakteru. Látka izolovaná ze zóny VM 3 byla alkaloidního charakteru, jednalo se konkrétně o alkaloid venoterpin.

5.1 Strukturní analýza venoterpinu

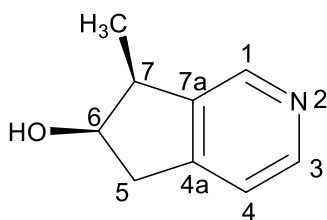
5.1.1 EI-MS analýza

Látka neionizovala za podmínek měření.

5.1.2 ESI-MS analýza

m/z - [M+H] 150 (100)

5.1.3 NMR-analýza



Venoterpin

Obrázek 5-1: Strukturní vzorec venoterpinu

^1H NMR (500MHz, CDCl_3) δ :

8.38 (1H, bs, H1), 8.37 (1H, d, $J= 5.0$ Hz, H3), 7.19 (1H, d, $J= 5.0$ Hz, H4), 4.59 (1H, td, $J= 5.4$ Hz, $J= 2.5$ Hz, H6), 3.25 (1H, m, H7), 3.12 (1H, dd, $J= 16.7$ Hz, $J= 5.4$ Hz, H5), 2.94 (1H, dd, $J= 16.7$ Hz, $J= 2.5$ Hz, H5), 1.39 (3H, d, $J= 6.9$ Hz, C7- CH_3).

^{13}C NMR (125MHz, CDCl_3) δ :

150.6, 147.5, 145.1, 141.6, 120.4, 75.2, 42.7, 41.0, 11.9.

5.1.4 Optická otáčivost

$$[\alpha]_D^{20} = +32 \text{ (CHCl}_3, c=0,1)$$

5.2 Screening biologických aktivit

5.2.1 Inhibiční aktivita izolovaného alkaloidu vůči erytrocytární AChE a sérové BuChE

Izolovaný alkaloid byl podroben studiu inhibiční aktivity vůči cholinesterázám. V následující tabulce (Tabulka 5-1) jsou uvedeny hodnoty inhibiční aktivity izolovaného alkaloidu venoterpinu vůči cholinesterázám.

Tabulka 5-1: Inhibiční aktivita izolovaného alkaloidu vůči AChE a BuChE

Alkaloid	AChE, IC ₅₀ (μM)	BuChE, IC ₅₀ (μM)
Venoterpin	> 500	> 500
galanthamin *	1,710 ± 0,065	42,301 ± 0,065
huperzin A *	0,033 ± 0,001	> 1000 μM

* Referenční látka

5.2.2 Cytotoxická aktivita izolovaného alkaloidu

Izolovaný alkaloid byl testován i z pohledu jeho cytotoxické aktivity. V tabulce uvedené níže (Tabulka 5-2) jsou uvedeny hodnoty cytotoxické aktivity nejprve vůči Caco-2 a HT-29 (buňky lidského kolorektálního adenokarcinomu), FHs-74 (lidské zdravé epiteliální buňky tenkého střeva).

Tabulka 5-2: Cytotoxická aktivita izolovaného alkaloidu VM3b₃

Alkaloid	Buněčná linie IC ₅₀ (μM)		
	Caco-2	HT-29	FHs-74
venoterpin	> 10	> 10	> 10
vinorelbin *	0,03 ± 0,01	NT	4,0 ± 0,3

* Referenční látka, NT - netestováno

6 DISKUSE A ZÁVĚR

Práce se zabývala izolací alkaloidů z alkaloidní frakce VM 378–389 získané již dříve na Katedře farmaceutické botaniky Univerzity Karlovy z rostliny *Vinca minor* L.. U izolovaných alkaloidů byla dále zjišťována biologická aktivita izolované látky, konkrétně inhibiční aktivita vůči cholinesterázám a cytotoxická aktivita a možnost využití alkaloidu v terapii Alzheimerovy choroby a nádorových onemocnění.

Frakce VM 378–389 izolovaná z rostliny *Vinca minor* L., byla zpracovávána pomocí preparativní tenkovrstvé chromatografie. Nejprve byly získány 4 frakce VM1 – VM4, z nichž dále bylo pracováno s frakcí VM2 a VM3. Látka izolovaná z frakce 2 se izolovala obtížně a ani po několika opakováních postupu TLC nebyla čistá. Z frakce VM3 byl opět po obtížné izolaci získán alkaloid VM3b3, který byl po podrobení GC/MS analýze a srovnání spekter se spektry komerční knihovny NIST 11 identifikován jako venoterpin.

Izolace byla velice problémová. Každou desku bylo třeba vyvinout nejméně 2×, spíše ale 3×, aby se zóny dostatečně oddělily. Při každém dalším vyvinutí se zóna dělila na více zón dalších, postup tedy bylo nutno opakovat několikrát. Navíc se pracovalo s celkem velkým počtem desek. Proto se za relativně dlouhý čas podařilo izolovat pouze jeden alkaloid.

Venoterpine byl poprvé získán z rostliny *Alstonia venenata* R.Br.. Později byl izolován také z rostlin *Rauwolfia serpentina* (L.) Benth. a *Vinca minor* L. Jedná se o monoterpenický alkaloid. Součástí jeho struktury je pyridin. Alkaloid je citlivý na vzduch a světlo, v jejich přítomnosti fialoví. V rostlinách je přítomen spolu s indolovými alkaloidy.^{80,81,82}

Venoterpin byl v rámci diplomové práce podroben testování biologických aktivit. Při testování inhibiční aktivity vůči cholinesterázám neprokázal alkaloid významné hodnoty (u obou cholinesteráz byly hodnoty IC₅₀ vyšší než 500 μM). Venoterpin tedy není významným inhibitorem cholinesteráz.

Zjištěná cytotoxická aktivita venoterpinu je >10 μM jak v případě zdravých epiteliálních buněk tenkého střeva FHs-74, tak buněk lidského kolorektálního karcinomu.

Látka bude dále v rámci spolupráce studována na panelu 10 nádorových a zdravých buněčných linií. Výsledky těchto studií budou dostupné v prosinci 2018.

7 POUŽITÁ LITERATURA

1. Jahodář L.: *Farmakobotanika: semenné rostliny*. Vyd 3. upravené a doplněné -Nakladatelství Karolinum, Praha 2011. ISBN 978-80-246-2015-2.
2. Spilková J. a kol.: *Farmakognosie*. Univerzita Karlova v Praze-Nakladatelství Karolinum, Praha 2016. ISBN 9788024632643
3. Rapini A.: Taxonomy „under construction“: advances in the systematics of Apocynaceae, with emphasis on the Brazilian Asclepiadoideae. *Botanical Journal of the Linnean Society* 63, 75-88 (2012).
4. Encyclopaedia Britannica [online]. Dostupné z: <https://www.britannica.com/plant/Apocynaceae>, staženo 12.8.2018.
5. The PLANTS Database. [online]. Dostupné z: <https://plants.usda.gov/core/profile?symbol=VIMI2>, staženo 11.8. 2018.
6. Khanavi M., Pourmoslemi S., Farahanikia B., Hadjiakhoondi A., and Ostad S.N.: Cytotoxicity of *Vinca minor*, *Pharmaceutical Biology* 48, 96–100 (2010).
7. Alkaloids Derived from Tryptophan. *Pharmacognosy*. [online]. 2012 Dostupné z: <http://www.epharmacognosy.com/2012/07/alkaloid>,. staženo 11. 8. 2018.
8. Lee J. H., Jeong S. K., Kim B. C., Park KW, Dash A.: Donepezil across the spectrum of Alzheimer's disease: dose optimization and clinical relevance. *Acta Neurol_Scand* 131, 259-67 (2015).
9. Alzheimer's Association. 2017 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's & Dementia* 13, 325–373 (2017).
10. Neurologie pro praxi 1/2004. Alzheimerova choroba-diagnostika a léčba [online]. Dostupné z: <https://www.solen.cz/pdfs/neu/2004/01/04.pdf>, staženo 12.8.2018.
11. MedlinePlus/Alzheimer's disease [online]. Dostupné z: <https://medlineplus.gov/alzheimersdisease.html>, staženo 11. 8. 2018.
12. PharmDr. Martin J., Ph.D., Mgr. Kršková Z., doc. RNDr. Dušek J., CSc.: Huperzin A a jiné přírodní látky v léčbě Alzheimerovy choroby. *Praktické lékařství* 7, 39–41 (2011).
13. Franková V.: Optimalizace léčby Alzheimerovy choroby. *Praktické lékařství, převzato z Psychiatrie pro praxi* 16, 79–82 (2015).
14. Jiráček R.: Farmakoterapie Alzheimerovy choroby. *Klinická farmakologie a farmacie* 18, 212–214 (2004).
15. Philips D. D., Chadha M. S.: The Alkaloids of *Rauwolfia serpentina* Benth. *Journal of the American Pharmaceutical Association* 44, 553-567 (1955)

16. Selvi. G.: *Rauwolfia serpentina*-Flowerspicture. [online]. Dostupné z: <http://www.flowerspicture.org/rauwolfia-serpentina.html>, staženo 12. 8. 2018.
17. Phauna and flora web. [online]. Dostupné z: <https://florafaunaweb.nparks.gov.sg/special-pages/plant-detail.aspx?id=2484>, staženo 11. 8. 2018.
18. Selvi G.: *Strophanthus gratus* – Flowerpicture. [online]. Dostupné z: <http://www.flowerspicture.org/strophanthus-gratus.html>, staženo 12. 8. 2018.
19. Ng A.: *Catharanthus Roseus* - NParks Flora and fauna web. [online]. Dostupné z: <https://florafaunaweb.nparks.gov.sg/Special-Pages/plant-detail.aspx?id=1791>, staženo 12. 8. 2018.
20. Koyuncu M.: A new species of *Vinca* (Apocynaceae) from eastern Anatolia, Turkey. Turkish Journal of Botany 36, 247-251 (2012).
21. The plant list. [online]. Dostupné z: <http://www.theplantlist.org/browse/A/Apocynaceae/Vinca/>, staženo 11. 8. 2018.
22. The plant list. [online]. Dostupné z: <http://www.theplantlist.org/tpl1.1/record/kew-213152>, staženo 25.8.2018
23. The plant list. [online]. Dostupné z: <http://www.theplantlist.org/tpl1.1/record/kew-213148>, staženo 25.8.2018
24. The plant list. [online]. Dostupné z: <http://www.theplantlist.org/tpl1.1/record/kew-213157>, staženo 25.8.2018
25. The plant list. [online]. Dostupné z: <http://www.theplantlist.org/tpl1.1/record/kew-213165>, staženo 25.8.2018
26. NaturGate. [online]. Dostupné z: <http://www.luontoportti.com/suomi/en/kukkakasvit/lesser-periwinkle>, staženo 11. 8. 2018.
27. Botany. [online]. Dostupné z: <https://botany.cz/cs/vinca-minor/>, <http://www.naturabohemica.cz/vinca-minor/>, staženo 11. 8. 2018.
28. Dendrologie online. [online] Dostupné z: <http://databaze.dendrologie.cz/index.php?menu=5&id=1992>, staženo 11. 8. 2018.
29. Květena ČR. [online]. Dostupné z: <http://www.kvetenacr.cz/detail.asp?IDdetail=140>, staženo 11. 8. 2018.
30. Natura Bohemica. [online]. Dostupné z: <http://www.naturabohemica.cz/vincaminor/>, staženo 11. 8. 2018.

31. Plants for a future. [online]. Dostupné z: <https://pfaf.org/user/plant.aspx?latinname=Vinca+minor>, staženo 12. 8. 2018.
32. Oshims. Herbal online pharmacy. [online]. Dostupné z: <http://www.oshims.com/herb-directory/p/periwinkle>, staženo 12. 8. 2018.
33. Lake Forest College. Environmental studies. [online]. Dostupné z: <https://www.lakeforest.edu/academics/programs/environmental/courses/es203/vinca-minor-periwinkle-apocynaceae.php>, taženo 12. 8. 2018.
34. Petříčková R.: Prima receptář. [online]. Dostupné z: <http://prima-receptar.cz/barvinek-mensi-brcal/>, staženo 12. 8. 2018.
35. Moudi M., Go R., Yong Seok Yien, Ch., Nazre M.: Vinca alkaloids. *International Journal of Preventive Medicine* 4, 1231–1235 (2013)
36. EPharmacognosy. [online]. Dostupné z: <http://www.epharmacognosy.com/2012/07/alkaloids-derived-from-tryptophan.html>, staženo 11. 8. 2018.
37. Rahman A. (Ed.): The Vinca alkaloids: From biosynthesis and accumulation in plant cells, to uptake, activity and metabolism in animal cells. *Studies in Natural Products Chemistry*, 33, 813-856 (2006).
38. Zhu J., Wang M., Wen W., Yu R.: Biosynthesis and regulation of terpenoid indole alkaloids in *Catharanthus roseus*. *Pharmacognosy Reviews* 9, 24-28 (2015).
39. Farahanikia B., Akbarzadeh T., Jahangirzadeh A., Yassa N., Ardekani M. R. S. A., Mirnezami T., Hadjiakhoondi A., Khanavi M.: Phytochemical investigation of *Vinca minor* cultivated in Iran. *Iranian journals of pharmaceutical research* 10, 777-785 (2011).
40. Proksa B, Grossmann E.: High performance liquid chromatographic determinativ of alkaloids from *Vinca minor* L. *Phytochemical analysis* 2, 74-76 (1991).
41. Jha M. K., Rahman M. H., Sheikh H.: Vinpocetine: A smart drug and a smart nutrient: A review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. 3, 346-352 (2012).
42. Smeyers Y. G., Smeyers N. J., Randez J. J., Hernandez-Laguna A., Galvez-Ruano E.: A structural and pharmacological study od alkaloids of *Vinca minor*. *Mol. Eng. I*, 153-160 (1991).
43. D'Amelio F. S., Mirhom Y. W., Williamson Y. W., Schulbaum P. L., Krueger E. B.: Comparative study of the alkaloids extracted from *Vinca minor* and those present in the homeopathic tincture 1X. *Planta Medica* 78, 1110-15 (2012).

44. Patyar S., Prakash A., Modi M., Medhi B.: Role of vinpocetine in cerebrovascular diseases. *Pharmacological Reports* 63, 618-628 (2011).
45. Alkuraishy H. M., Al-Gareeb A. I., Albuhadilly A. K.: Vinpocetine and Pyritinol: A new model for blood rheological modulation in cerebrovascular disorders – A randomized controlled clinical study. *BioMed Research International* 2014, 8 (2014)
46. Raboch J.; Pavlovský P.; a kolektiv. *Psychiatrie*. Vyd. 1. Praha: Karolinum, 2012. ISBN 8024619857.
47. Plosker G. L.: Memantine Extended Release (28 mg Once Daily): A Review of Its Use in Alzheimer's Disease 75, 887-97 2015.
48. Matsunaga S., Kishi T., Iwata N.: Memantine Monotherapy for Alzheimer's Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Public Library of Science* 10, 1-16 (2015).
49. Birks J.S., Harvey R.: Donepezil for dementia due to Alzheimer's disease. *The Cochrane Database of Systematic Reviews* 3, 1-17 (2003)
50. Barage S. H.: Sonawane K.D.: Amyloid cascade hypothesis: Pathogenesis and therapeutic strategies in Alzheimer's disease, *Neuropeptides* 52, 1-18 (2015)
51. Jiráček R., Manukyan A.: Hledání farmakoterapie Alzheimerovy choroby. *Česká a slovenská psychiatrie* 113, 79-83 (2017)
52. Blesa R.: Galantamine: Therapeutic Effects beyond cognition. *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders* 11, 28–34 (2000).
53. Wilcock K. G., Lilienfeld S., Gaens E. on behalf of the Galantamine International-1 Study Group.: Efficacy and safety of galantamine in patients with mild to moderate Alzheimer's disease: multicentre randomised controlled trial.: *British Medical Journal* 321, 1445-9 (2000).
54. Vlček J., Fialová. D.: *Klinická farmacie I.* - Grada (2009), ISBN 978-80-247-3169-8
55. Schneider L. S.: A critical review of cholinesterase inhibitors as a treatment modality in Alzheimer's disease. *Dialogues in Clinical Neuroscience* 2, 111–128. (2000).
56. Zeb M. W., Riaz A., Szigeti K.: Donepezil: A Review of Pharmacological Characteristics and Role in the Management of Alzheimer Disease. *Clinical Medicine Insights: Geriatrics*. 10, 1–14 (2017).
57. Birks J.S., Evans J.G., Rivastigmine for Alzheimer's disease (Review). *Cochrane Database of Systematic Reviews* Issue 4. Art.No.: CD001191 (2015).
58. Gomolin I. H., Smith C., Jeitner T. M.: Cholinesterase Inhibitors: Applying Pharmacokinetics to Clinical Decision Making. *The American Journal of Geriatric Pharmacotherapy* 9, 259–263 (2011).

59. SÚKL. [online]. Dostupné z: http://www.sukl.cz/modules/medication/search.php?data%5Bsearch_for%5D=&data%5Bcode%5D=&data%5Babc_group%5D=&data%5Bmaterial%5D=donepezil&data%5Bpath%5D=&data%5Breg%5D=&data%5Bradio%5D=none&data%5Bcheckbox%5D%5B%5D=marketability&data%5Brc%5D=&data%5Bcheckbox%5D%5B%5D=brail-yes&data%5Bcheckbox%5D%5B%5D=brail-no&data%5Bcheckbox%5D%5B%5D=brail-def&data%5Bwith_adv%5D=0&search=Vyhledat&data%5Blisting%5D=20, staženo 27.8.2018.
60. SÚKL. [online]. Dostupné z: http://www.sukl.cz/modules/medication/search.php?data%5Bsearch_for%5D=&data%5Bcode%5D=&data%5Babc_group%5D=&data%5Bmaterial%5D=rivastigmin&data%5Bpath%5D=&data%5Breg%5D=&data%5Bradio%5D=none&data%5Bcheckbox%5D%5B%5D=marketability&data%5Brc%5D=&data%5Bcheckbox%5D%5B%5D=brail-yes&data%5Bcheckbox%5D%5B%5D=brail-no&data%5Bcheckbox%5D%5B%5D=brail-def&data%5Bwith_adv%5D=0&search=Vyhledat&data%5Blisting%5D=20, staženo 27.8.2018.
61. Michael W. Jann.: Rivastigmine, a New-Generation Cholinesterase Inhibitor for the Treatment of Alzheimer's Disease. *Pharmacotherapy* 20, 1-12 (2000).
62. Patterson C., D.B. Hogan D.B.: Brief Review: Rivastigmine, A Second Cholinesterase Inhibitor. *Canadian Journal of Neurological Sciences* 28, 122-123 (2001).
63. Matsuzono K., Sato K., Syoichiro Kono S., Nozomi Hishikawa, Yasuyuki Ohta, Deguschi T.Y.K., Yumiko Nakano, Abe K.: Clinical Benefits of Rivastigmine in the Real World Dementia Clinics of the Okayama Rivastigmine Study (ORS). *Journal of Alzheimer's Disease* 48, 757–763 (2015).
64. SÚKL. [online]. Dostupné z: http://www.sukl.cz/modules/medication/search.php?data%5Bsearch_for%5D=&data%5Bcode%5D=&data%5Babc_group%5D=&data%5Bmaterial%5D=galantamin&data%5Bpath%5D=&data%5Breg%5D=&data%5Bradio%5D=none&data%5Bcheckbox%5D%5B%5D=marketability&data%5Brc%5D=&data%5Bcheckbox%5D%5B%5D=brail-yes&data%5Bcheckbox%5D%5B%5D=brail-no&data%5Bcheckbox%5D%5B%5D=brail-def&data%5Bwith_adv%5D=0&search=Vyhledat&data%5Blisting%5D=20, staženo 27.8.2018.
65. The Plant list. [online]. Dostupné z: <http://www.theplantlist.org/tp11.1/record/kew-307617>, staženo 25.8.2018.

66. Lilienfeld S.: Galantamine — a Novel Cholinergic Drug with a Unique Dual Mode of Action for the Treatment of Patients with Alzheimer's Disease. *CNS Drug Reviews* 8, 159–176 (2002).
67. Raskind M. A.; Peskind E. R., Wessel T., Yuan W., PhD; and the Galantamine USA-1 Study Group.: Galantamine in AD A 6-month randomized, placebo-controlled trial with a 6-month extension. *Neurology* 54, 2261–2268 (2000).
68. Erkinjuntti T., Kurz A., Gauthier S., Roger Bullock R., Sean Lilienfeld S., Chandrasekhar Rao Venkata Damaraju Ch.V.D.: Efficacy of galantamine in probable vascular dementia and Alzheimer's disease combined with cerebrovascular disease: a randomised trial. *Lancet* 359, 1283–90 (2002).
69. SÚKL. [online]. Dostupné z: http://www.sukl.cz/modules/medication/search.php?data%5Bsearch_for%5D=&data%5Bcode%5D=&data%5Bcat_group%5D=&data%5Bmaterial%5D=memantin&data%5Bpath%5D=&data%5Breg%5D=&data%5Bradio%5D=none&data%5Bcheckbox%5D%5B%5D=marketability&data%5Brc%5D=&data%5Bcheckbox%5D%5B%5D=braille-yes&data%5Bcheckbox%5D%5B%5D=braille-no&data%5Bcheckbox%5D%5B%5D=braille-def&data%5Bwith_adv%5D=0&search=Vyhledat&data%5Blisting%5D=20, staženo 27.8.2018.
70. Greig S.L.: Memantine ER/Donepezil: A Review in Alzheimer's Disease. *CNS Drugs*. 29, 963-70 (2015).
71. The Plant list. [online]. Dostupné z: <http://www.theplantlist.org/tp11.1/record/tro-26621719>, staženo 25.8. 2018.
72. Rafii M.S., MD, PhD, Walsh, S.MD, Little J. T.MD, Behan K., Reynolds B. NP, Ward C., Jin, S. MD, Thomas R. PhD, Aisen, P.S. MD.: For the Alzheimer's A phase II trial of huperzine A in mild to moderate Alzheimer disease. *Neurology* 76, 1389-1394 (2011).
73. Yang G., Wang Y., Tian J., Liu J.P.: Huperzine A for Alzheimer's Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Clinical Trials. *Huperzine A for Alzheimer's Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Clinical Trials*. *Public Library of Science* 8, 1-8 (2013).
74. Qian Z.M., Ke Y.: Huperzine A: is it an effective disease-modifying drug for Alzheimer's disease? *Frontiers in Aging Neuroscience*. 6, 1-6 (2004).

75. Hashiguchi M., Ohta Y., Shimizu M., Maruyama J., Mochizuki M.: Meta-analysis of the efficacy and safety of *Ginkgo biloba* extract for the treatment of dementia. *Journal of Pharmaceutical Health Care and Sciences*. 10,1-12 (2005).
76. Weinmann S., Roll S., Schwarzbach Ch., Vauth Ch., Willich S. N.: Effects of *Ginkgo biloba* in dementia: systematic review and meta-analysis. *BMC Geriatrics* 10, 1-12 (2010).
77. DeKosky S. T., Williamson J. D., Fitzpatrick A. L., Kronmal R. A., Ives D. G., Saxton J. A., Lopez O. L., Burke G., Carlson M. C., Fried L. P., Kuller L. H., Robbins J. A., Tracy R. P., Woolard N. F., Dunn L., Snitz B. E., Nahin R. L., Fried L. P.: *Ginkgo biloba* for Prevention of Dementia, A Randomized Controlled Trial, *The Journal of the American Medical Association* 300, 2253-2262 (2018).
78. Cahlíková L., Macáková K., Zavadil S., Jiroš P., Opletal L., Urbanová K., Jahodář L.: Analysis of Amaryllidaceae alkaloids from *Chlidanthus fragrans* by GC-MS and their cholinesterase activity. *Natural Product Communications* 6, 603-606 (2011).
79. Doskočil I., Hošťálková A., Šafratová M., Benešová N., Havlík J., Havelek R., Kuneš J., Královec K., Chlebek J., Cahlíková L.: Cytotoxic activities of Amaryllidaceae alkaloids against gastrointestinal cancer cells. *Phytochemistry Letters* 13, 394-398 (2015).
80. The Plant list. [online]. Dostupné z: <http://www.theplantlist.org/tpl1.1/record/kew-7123>, staženo 25.8.2018.
81. Ray A. B., Chatterje A.: Venoterpine – A new monoterpenoid alkaloid from the fruit of *Alstonia Venentata* R. Br. *Tetrahedron Letters* 23, 2763-2766, (1968).
82. Chatterjee A., Banerji A. and M. Chakrabar M. Monoterpenoid alkaloid from *Vinca major*. *Planta Medica* 28, 109-11 (1975).

8 PŘEHLED OBRÁZKŮ

Obrázek 3-1: <i>Rauwolfia serpentina</i> ¹⁶	10
Obrázek 3-2: Strukturní vzorec ajmalinu, yohimbinu a reserpinu	11
Obrázek 3-3: <i>Strophanthus gratus</i> ¹⁸	12
Obrázek 3-4: <i>Catharanthus roseus</i> ¹⁹	12
Obrázek 3-5: Strukturní vzorce vinblastinu a vinkristinu	13
Obrázek 3-6: <i>Vinca minor</i> – květ, list a celá rostlina ^{32,33,34}	15
Obrázek 3-7: Biosyntéza vinblastinu a vinkristinu (monoterpenických indolových alkaloidů) ³⁸	17
Obrázek 3-9: Strukturní vzorce kataranthinu a vindolinu	24
Obrázek 3-10: Strukturní vzorec vindesinu.....	25
Obrázek 3-11: Strukturní vzorec vinorelbinu.....	25
Obrázek 3-12: Strukturní vzorec vinfluninu	26
Obrázek 3-13: Strukturní vzorec takrinu.....	35
Obrázek 3-14: Strukturní vzorec donepezilu.....	36
Obrázek 3-15: Strukturní vzorec rivastigminu	36
Obrázek 3-16: Strukturní vzorec galanthaminu	38
Obrázek 3-17: Strukturní vzorec memantinu	39
Obrázek 3-18: Strukturní vzorec huperzinu	40
Obrázek 4-1: Zpracovávaná frakce	44
Obrázek 4-2: Zóny získané po TLC původní frakce.....	45
Obrázek 4-3: Analytická deska zón VM 1-VM 4	46
Obrázek 5-1: Strukturní vzorec venoterpinu	53

9 PŘEHLED TABULEK

Tabulka 3-1: Strukturní vzorce některých Vinca alkaloidů ^{39,40,41,42,43}	18
Tabulka 4-1: Charakteristika zpracovávané frakce	43
Tabulka 5-1: Inhibiční aktivita izolovaného alkaloidu vůči AChE a BuChE	54
Tabulka 5-2: Cytotoxická aktivita izolovaného alkaloidu VM3b ₃	54

10 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AD	Alzheimerova choroba
AChE	acetylcholinesterasa
APOE	apolipoprotein E
APP	amyloidní prekurzorový protein
ATP	adenosintrifosfát
BuChE	butyrylcholinesterasa
cGMP	cyklický guanosinmonofosfát
DEA	diethylamin
DM	diabetes mellitus
DTNB	5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina
EtOH	ethanol
ER	prodloužené uvolňování
GC	plynová chromatografie
HuAChE	lidská acetylcholinesterasa
HuBuChE	lidská butyrylcholinesterasa
IR	okamžité uvolňování
MCI	mild cognitive impairment, předstádium AD
MMSE	test kognitivních funkcí (mini mental state exam)
MS	hmotnostní spektrometrie
NMDA	N-methyl D-aspartát
NMR	nukleární magnetická rezonance
PSEN	presenilin
ROS	volné radikály
To	toluen

TLC tenkovrstvá chromatografie

ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické botaniky

Kandidát: Anežka Klátilová

Školitel: doc. Ing. Lucie Cahlíková, Ph. D.

Název diplomové práce: Alkaloidy *Vinca minor* (Apocynaceae) a jejich biologická aktivita

Cílem této diplomové práce bylo zpracování přidělené frakce izolované z rostliny *Vinca minor* L. a z ní izolace alespoň jednoho alkaloidu k testování jeho biologické aktivity.

Pomocí preparativní TLC byl postupně z dané frakce izolován alkaloid, který byl následně podroben strukturní analýze. Zde byly použity metody NMR a EI-MS analýzy. Díky těmto analýzám byl daný alkaloid identifikován jako venoterpin. Dále byl alkaloid připraven pro testování biologické aktivity.

Izolovaný alkaloid byl tedy identifikován jako venoterpin a byl testován na biologickou aktivitu. Zjištěná inhibiční koncentrace (IC_{50}) vůči HuAChE a HuBuChE činila více než 500 μ M, což značí, že venoterpin se neřadí k významným inhibitorům cholinesteráz. Stejně tak hodnota cytotoxické aktivity, kdy byla zjištěna hodnota této aktivity vyšší než 10 μ M vůči buňkám kolorektálního karcinomu stejně tak, jako vůči buňkám zdravým, nepatří mezi významné.

Klíčová slova: *Vinca minor*, Apocynaceae, alkaloidy, biologická aktivita

ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmaceutical botany

Candidate: Anežka Klátilová

Supervisor: doc. Ing. Lucie Cahlíková Ph. D.

Title of diploma thesis: Alkaloids of *Vinca minor* (Apocynaceae) and their biological activities

The aim of this diploma thesis was to process the assigned fraction isolated from the *Vinca minor* L. plant and to isolate at least one alkaloid to test its biological activity.

Using preparative TLC, the alkaloid was sequentially isolated from the fraction, which was then subjected to a structural analysis. NMR and EI-MS methods were used herein. Thanks to these analyzes, the alkaloid was identified as venoterpine. Furthermore, the alkaloid was prepared to test for biological activity.

Thus, the isolated alkaloid was identified as venoterpine and tested for biological activity. The observed inhibitory concentration (IC₅₀) to HuAChE and HuBuChE was more than 500 μM, indicating that venoterpine does not rank as a significant inhibitor of cholinesterase. Likewise, the value of cytotoxic activity, when this activity was found to be greater than 10 μM to colorectal cancer cells as well as to healthy cells, is not significant.

Key words: *Vinca minor*, Apocynaceae, alkaloids, biological activities