

UNIVERZITA KARLOVA  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ  
KATEDRA FARMACEUTICKÉ BOTANIKY

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Alkaloidy *Vinca minor* L. a jejich biologická aktivita  
(inhibice lidských cholinesteras) V.

Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Jakub Chlebek, Ph.D.  
Vedoucí katedry: doc. Ing. Lucie Cahlíková, Ph.D.

Hradec Králové, 2020

Alžběta Vašíčková

# Prohlášení

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

# Poděkování

Ráda bych poděkovala PharmDr. Jakubovi Chlebkovi, PhD. za odborné vedení této diplomové práce, za ochotu, obětovaný čas, pomoc a trpělivost při mé práci v laboratoři. Chtěla bych také poděkovat prof. RNDr. Lubomíru Opletalovi, CSc. za stanovení inhibiční aktivity cholinesteras izolovaných alkaloidů. Můj dík patří i doc. PharmDr. Jiřímu Kunešovi, PhD. a Mgr. Janě Maříkové za změřeni a interpretaci NMR spekter. Mé poděkování patří i za LC-MS analýzy Mgr. Jardu Jenčovi. Zároveň chci poděkovat celému kolektivu Katedry farmaceutické botaniky za vstřícnost a příjemné pracovní prostředí.

Tato diplomová práce byla vytvořena za využití přístrojů v rámci projektu OPVWV 02\_16\_017: CZ.02.1.01/0.0/0.0/16\_017/0002682: Modernizace laboratoře buněčných interakcí s látkami přírodního původu (MOLABI), MŠMT ČR/Univerzita Karlova v Praze.

# Obsah

Seznam obrázků .....	6
Seznam tabulek .....	7
Seznam použitých zkratk .....	8
1 Úvod .....	9
2 Cíl práce .....	11
3 Teoretická část .....	12
3.1 Alzheimerova choroba .....	12
3.1.1 Klasifikace .....	12
3.1.2 Etiologie .....	12
3.1.2.1 Cholinergní hypotéza .....	12
3.1.2.2 Hyperfosforylace $\tau$ -proteinu .....	13
3.1.2.3 Senilní plaky .....	13
3.1.2.4 Ukládání A $\beta$ .....	13
3.1.2.5 Porucha mitochondriálního metabolismu .....	14
3.1.2.6 Volné radikály a oxidační stres .....	14
3.1.2.7 Poruchy metabolismu glukosy .....	14
3.1.2.8 Stárnutí .....	15
3.1.3 Genetické abnormality způsobující AD .....	15
3.1.4 Rizikové faktory .....	15
3.1.4.1 Věk .....	16
3.1.4.2 Výskyt AD v rodině .....	16
3.1.4.3 Gen pro apolipoprotein E .....	16
3.1.4.4 Pohlaví .....	16
3.1.4.5 Nižší dosažené vzdělání .....	17
3.1.4.6 Traumatické poranění mozku .....	17

3.1.4.7	Kouření.....	17
3.1.4.8	Deprese .....	17
3.1.4.9	Osamělost .....	17
3.1.4.10	Nezdravá strava .....	18
3.1.4.11	Složení střevní mikroflóry .....	18
3.1.4.12	Dlouhý spánek.....	18
3.1.4.13	Užívání benzodiazepinů .....	18
3.1.5	Klinický obraz.....	18
3.1.6	Diagnostika .....	19
3.1.7	Strategie léčby.....	21
3.1.7.1	Protektivní faktory .....	21
3.1.7.2	Režimová opatření .....	24
3.1.7.3	Farmakoterapie.....	24
3.1.8	Potenciální zásahy .....	31
3.1.8.1	Inhibitory cholinesteras .....	31
3.1.8.2	Inhibitory monoaminoxidasy B.....	31
3.1.8.3	Látky snižující tvorbu A $\beta$ .....	32
3.1.8.4	Látky zvyšující clearance A $\beta$ .....	33
3.1.8.5	Terapie zaměřená na $\tau$ -protein.....	33
3.1.8.6	Serotonergní látky.....	34
3.1.8.7	Agonisté nikotinových receptorů.....	34
3.1.8.8	Antagonisté receptorů pro konečné produkty pokročilé glykace .....	34
3.1.8.9	Léčiva interagující s mitochondriálními enzymy .....	34
3.1.8.10	Neurotropní faktory, neutrofiny .....	35
3.1.8.11	Látky ovlivňující zánětlivé procesy.....	35
3.1.8.12	Statiny .....	35

3.2	Vinca minor .....	36
3.2.1	Taxonomické zařazení .....	36
3.2.2	Botanická charakteristika .....	38
3.2.3	Využití v lidovém léčitelství .....	38
3.2.4	Obsahové látky .....	38
3.2.4.1	Indolové alkaloidy .....	38
3.2.4.2	Vinca alkaloidy .....	38
3.2.5	Aktivita alkaloidů v rodu Vinca .....	44
4	Experimentální část .....	49
4.1	Materiál a rozpouštědla pro izolaci alkaloidů .....	49
4.1.1	Rozpouštědla .....	49
4.1.2	Chemikálie a pomocné látky .....	49
4.1.3	Detekční činidla .....	49
4.1.4	Vyvíjecí soustavy pro TLC .....	50
4.1.5	Adsorbenty a materiál pro chromatografii .....	50
4.1.6	Použité přístroje .....	50
4.2	Metody .....	50
4.2.1	Obecné postupy .....	50
4.2.1.1	Příprava a čištění rozpouštědel .....	50
4.2.1.2	Odpařování rozpouštědel .....	51
4.2.1.3	Uchovávání vzorků .....	51
4.2.1.4	Příprava desek pro preparativní TLC .....	51
4.2.1.5	Preparativní TLC chromatografie .....	51
4.2.1.6	Detekce alkaloidů na chromatografických deskách .....	51
4.2.1.7	Flash chromatografie .....	52
4.2.1.8	LC-MS analýza .....	52

4.2.1.9	NMR analýza .....	53
4.2.1.10	Optická otáčivost .....	53
4.3	Izolace alkaloidů .....	53
4.3.1	Separace frakce VM 215–258 (20,75 g) .....	53
4.3.2	Flash chromatografie vybrané frakce VM 215–258.....	54
4.3.2.1	Separace na oxidu hlinitém.....	54
4.3.2.2	Separace spojené frakce 4–21 (7,67 g) na silikagelu .....	56
4.4	Materiál a chemikálie pro stanovení cholinesterasové inhibiční aktivity izolovaných alkaloidů .....	61
4.4.1	Chemikálie pro stanovení inhibiční aktivity .....	61
4.4.2	Pufry .....	61
4.4.3	Přístroje .....	61
4.4.4	Biologický materiál .....	61
4.5	Stanovení inhibiční aktivity alkaloidů.....	61
4.5.1	Příprava plazmy a hemolyzátu .....	61
4.5.2	Stanovení cholinesterasové inhibiční aktivity .....	62
5	Výsledky.....	64
5.1	Strukturní analýza .....	64
5.1.1	AV-1 (–)-minovincinin.....	64
5.1.1.1	LC-MS analýza .....	64
5.1.1.2	NMR analýza .....	64
5.1.1.3	Optická otáčivost .....	64
5.1.2	AV-2 (+)-striktamin .....	64
5.1.2.1	LC-MS analýza .....	65
5.1.2.2	NMR analýza .....	65
5.1.2.3	Optická otáčivost .....	65

5.1.3	AV-3 nová sloučenina .....	65
5.1.3.1	LC-MS analýza .....	65
5.1.3.2	NMR analýza .....	66
5.1.3.3	Optická otáčivost .....	66
5.2	Inhibiční aktivita izolovaných alkaloidů.....	66
6	Diskuse .....	67
7	Seznam použité literatury .....	69
8	Abstrakt .....	82
9	Abstract .....	83



# Seznam obrázků

Obrázek 1: Schematické znázornění diagnostiky AD [10] .....	20
Obrázek 2: donepezil.....	25
Obrázek 3: galanthamin .....	26
Obrázek 4: rivastigmin.....	26
Obrázek 5: huperzin A.....	27
Obrázek 6: memantin.....	28
Obrázek 7: piracetam .....	29
Obrázek 8: vinpocetin .....	29
Obrázek 9: resveratrol.....	31
Obrázek 10: takrin .....	31
Obrázek 11: Vinca minor L. [95] .....	36
Obrázek 12: Vinca minor L. květ [95] .....	37
Obrázek 13: Vinca minor L. list [95] .....	37
Obrázek 14: vinkamin.....	45
Obrázek 15: vinpocetin .....	46
Obrázek 16: vinblastin.....	47
Obrázek 17: vinorelbin .....	47
Obrázek 18: vinkristin.....	48
Obrázek 19: Flash chromatografie $\text{Al}_2\text{O}_3$ 1. část: A: DCM + DEA (100:0,25), směsi B: EtOAc + DEA (100:0,25).....	55
Obrázek 20: Flash chromatografie $\text{Al}_2\text{O}_3$ 2. část: A: MeOH + DEA (100:0,25) a směsi B: EtOAc + DEA (100:0,25).....	55
Obrázek 21: Flash chromatografie: silikagel, A: DCM, B: MeOH + $\text{NH}_4\text{OH}$ (100:0,1).....	58
Obrázek 22: souhrnný chromatogram ve směsi DCM + MeOH + $\text{NH}_4\text{OH}$ (95:5:0,1).....	59
Obrázek 23: (-)-minovincinin .....	64
Obrázek 24: (+)-striktamin .....	65
Obrázek 25: AV-3.....	65

## Seznam tabulek

Tabulka 1: Alkaloidy eburnaminového typu .....	39
Tabulka 2: Alkaloidy ajmalinového typu .....	41
Tabulka 3: Alkaloidy sarpaginového typu .....	42
Tabulka 4: Alkaloidy akuamminového typu .....	43
Tabulka 5: Alkaloidy oxindolového typu .....	44
Tabulka 6: Detail nastavení stupňovité eluce provedené ve 2 navazujících krocích .....	54
Tabulka 7: Podfrakce získané flash chromatografií frakce VM 215-258.....	56
Tabulka 8: Nastavení skokové eluce použitím mobilní fáze A (DCM) a B (MeOH + NH <sub>4</sub> OH (100:0,1)). .....	57
Tabulka 9: Podfrakce získané flash separací spojené frakce 4-21 na siliagelu .....	58
Tabulka 10: Inhibiční aktivita izolovaných alkaloidů .....	66

## Seznam použitých zkratk

ABAD	amyloid vázající alkoholdehydrogenasu
AD	Alzheimerova demence
ACh	acetylcholin
AChE	acetylcholinesterasa
AChEi	inhibitory acetylcholinesterasy
APP	amyloidní prekurzorový protein
ATP	adenosintrifosfát
A $\beta$	$\beta$ -amyloid
BDNF	mozkový neurotrofický faktor
BChE	butyrylcholinesterasa
DM2	diabetes mellitus 2. typu
GSK-3	glykogensynthasa-kinasa 3
HEB	hematoencefalická bariéra
HDL	lipoprotein o vysoké hustotě
IDE	inzulin degradabilní enzym
MAO-B	monoaminoxidasa B
NGF	nervový růstový faktor
NMDA-receptor	N-metyl-D-aspartát receptor
NSAID	nesteroidní antirevmatika-antiflogistika
rAGEs	receptory pro koncové produkty pokročilé glykace
Rf	retenční faktor
ROS	reaktivní formy kyslíku
SSRI	selektivní inhibitory zpětného vychytávání serotoninu
VLDL	lipoprotein o velmi nízké hustotě

# 1 Úvod

Demence – skupina symptomů, které mohou být způsobeny mnoha chorobami. Mezi tyto symptomy řadíme snížení intelektu, poruchy paměti, orientace, soudnosti, pozornosti, chápání, abstraktního myšlení, chování, osobnosti; problémy s řečí, špatný či zhoršující se racionální úsudek, ztrátu iniciativy. Výsledkem je narušení sociální a ekonomické aktivity jedince, ten se tak stává nesamostatným a odkázaným na pomoc rodiny či péči institucí k tomu určených a přizpůsobených. Do skupiny demencí řadíme vaskulární demence, demence s Lewyho tělísky, smíšené demence, demence u Parkinsonovy choroby, frontotemporální demence a Alzheimerovu demenci. [1–4]

Dne 3. listopadu 1906 německý neuropatolog a psychiatr Alois Alzheimer popsal všeobecný úpadek mentálních funkcí, provázený zvláštními změnami v mozkové kůře, u pacientky Auguste D. Dr. A. Alzheimer upozornil na formu senilní demence u překvapivě mladé osoby a uvedl předpoklad, že se tento typ demence může vyskytovat i u osob ve věku 40–50 let. Onou osobou, která významně přispěla k tomu, že obě formy demence dnes označujeme za Alzheimerovu demenci, byl Emil Kraepelin. Ten roku 1910 publikoval 8. vydání *Kompendium der Psychiatrie*, v němž Alzheimerovu popisu onemocnění Auguste D. přisuzuje status samostatné nemoci. [5]

Lidí s demencí neustále přibývá [6]. Alzheimerova choroba je progresivní neurodegenerativní onemocnění, které dosud nelze vyléčit ani nelze tento proces rozvoje poruchy kognitivních funkcí zastavit. Spektrum používaných léčiv je omezené, léčba zahrnuje léčiva zvyšující koncentraci acetylcholinu v CNS a léčiva ovlivňující glutamátové receptory. Dále se využívají kognitiva – léčiva, která zlepšují pozornost, vnímání i paměť a nootropika, mezi která řadíme také léčiva s vazodilatačními účinky, jako jsou flunarizin (již není v ČR registrován), cinnarizin nebo pentoxyfyllin [7]. Ovšem symptomatická léčba pouze zmírňuje projevy behaviorálních a psychologických příznaků demence a může pouze oddálit nástup těžké demence a jejích komplikací.

V poslední době se věnuje pozornost obsahovým látkám z čeledi Apocynaceae – indolovým alkaloidům, jejichž základní strukturu tvoří indol a jejichž biosyntéza vychází z aminokyseliny tryptofanu. Do této čeledi také patří rostlina *Vinca minor* L. neboli barvínek menší, mezi jehož obsahové látky („vinka alkaloidy“) patří mimo jiné důležitá používaná léčiva vinkamin, vinblastin a vinkristin. Účinky této skupiny alkaloidů se uplatňují jako nootropika

(vinpocetin), v léčbě nádorových onemocnění (vinblastin, vinkristin a jejich polosyntetické deriváty), v tradiční čínské medicíně se využívají pro své antidiabetické a antimalarické účinky [8]. Nejznámějším alkaloidem ze skupiny vinka alkaloidů je bezesporu vinkamin, který má hlavně antihypertenzní, vazodilatační, neuroprotektivní a antioxidační účinky [9].

Alkaloidy z *V. minor* L. se staly náplní mé diplomové práce, neboť během screeningu na katedře farmaceutické botaniky FAF UK, alkaloidní extrakt z této rostliny vykazoval signifikantní a selektivní inhibici butyrylcholinesterasy – jednoho z potenciálního terapeutického zásahu u Alzheimerovy choroby.

## 2 Cíl práce

Cíle diplomové práce:

1. příprava rešerše na zadané téma,
2. izolace alespoň 1 čistého alkaloidu z vybrané frakce 215–258 získané během sloupcové chromatografie alkaloidního extraktu z *Vinca minor* L.,
3. podíl na stanovení struktury izolovaných alkaloidů (příprava vzorků pro NMR a MS analýzu, stanovení optické otáčivosti)
4. podíl na stanovení cholinesterasové inhibiční aktivity izolované sloučeniny,
5. intepretace získaných dat a sepsání diplomové práce.

## 3 Teoretická část

### 3.1 Alzheimerova choroba

Alzheimerovu chorobu (Alzheimer's disease; AD) řadíme mezi demence, pro které je charakteristický podstatný úbytek kognitivních funkcí. Jedná se o nejčastější demenci vůbec [1,10]. Toto onemocnění je smrtelné s délkou trvání 2–12 let [4].

#### 3.1.1 Klasifikace

Rozlišujeme presenilní (AD s časným začátkem) a senilní (AD s pozdním začátkem) formu. Presenilní forma se začíná symptomaticky projevovat do 65. roku života, zatímco projevy pozdní formy AD začínají po 65. roce [1].

#### 3.1.2 Etiologie

Ačkoli není přesně známá příčina vzniku a rozvoje AD, předpokládá se, že je výsledkem více faktorů. Ty zahrnují tvorbu a ukládání intracelulárních klubek polymerizovaného  $\tau$ -proteinu, depozita extracelulárního amyloidu a také degeneraci neuronů. Dále se uvažuje i o nadměrné glutamátergní aktivitě, které aktivuje *N*-metyl-D-aspartát receptory (NMDA-receptory) a může tak přispívat k odumírání neuronů [7].

##### 3.1.2.1 Cholinerní hypotéza

Cholinerní hypotéza hledá souvislost mezi poklesem neuromediátoru acetylcholinu (ACh) a projevy nemoci [11]. ACh se vytváří v nervovém zakončení z cholinu, cholin je zde acetylován pomocí enzymu cholinacetyltransferasy za přítomnosti acetylkoenzymu A, následně je ACh uskladněn v synaptických vezikulách. Při aktivaci nervového zakončení je ACh z těchto vezikul uvolňován exocytózou do synaptické štěrbině, ve které může stimulovat své receptory. Aktivita ACh je pak ukončena rozkladem acetylcholinesterasou (AChE) a butyrylcholinesterasou (BChE) na cholin a acetát. Cholin je následně vychytáván zpět do nervového zakončení za pomoci cholinového přenašeče. [7]

S rozvojem AD klesá aktivita AChE v synaptické štěrbině a na odbourávání ACh se pak může ve větší míře podílet i BChE (hlavně v krevní plazmě, dále v odlišných částech mozku), což vede k dalšímu úbytku ACh. Zablokováním mozkových cholinesteras dochází ke zvýšení

počtu molekul ACh schopného navázat se na své receptory, čímž dochází ke zlepšení cholinergní transmise a tím ke zlepšení kognitivních funkcí. [12]

### 3.1.2.2 Hyperfosforylace $\tau$ -proteinu

$\tau$ -Protein je neurocytoskeletální protein vyskytující se ve větším množství v axonech neuronů. Podílí se na stabilizaci sítě cytoskeletu neuronu a vazbou na mikrotubuly udržuje transportní systém axonu funkční. Jeho funkce je řízena fosforylací a defosforylací. Defosforylovaný  $\tau$ -protein, který se vyznačuje vyšší afinitou k mikrotubulům, umožňuje jejich polymerizaci a stabilizaci. Fosforylace  $\tau$ -proteinu je naopak spojena s poklesem jeho vazebných schopností. Fosforylovaný  $\tau$ -protein se uvolňuje z vazby s mikrotubuly, které se potom rozpadají. Za fyziologických okolností je udržována rovnováha mezi fosforylací a defosforylací tak, aby byla zachována potřebná stabilita mikrotubulů. Uvolněné molekuly fosforylovaného  $\tau$ -proteinu agregují za vzniku neurofibrilárních klubek, které se obtížně odbourávají, a proto vytvářejí intracelulární depozita. A právě tato depozita blokují přístup výživy a dalších potřebných molekul dovnitř neuronu a přispívají tak k zániku buňky. [13]

### 3.1.2.3 Senilní plaky

Senilní plaky jsou obvykle okrouhlé, heterogenní útvary velké asi 10–200  $\mu\text{m}$  obsahující  $\beta$ -amyloid ( $A\beta$ ). Množství plaků doprovázející AD je vyšší, než je tomu u normálního stárnutí mozku. [14]

### 3.1.2.4 Ukládání $A\beta$

Hlavní patologickou změnou u AD je ukládání  $A\beta$ . V neuronech je transmembránově uložen amyloidní prekurzorový protein (APP). Tento protein může být proteolyticky štěpen neamyloidní nebo amyloidní cestou, a to třemi enzymy:  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -sekretasou. Neamyloidní cesta využívá štěpení pomocí  $\alpha$ - a  $\gamma$ -sekretas a výsledkem jsou potom nepatogenní fragmenty. Zatímco amyloidogenní způsob proteolýzy je uskutečňován pomocí  $\beta$ - a  $\gamma$ -sekretasy na jiném místě a vedoucí tak k nerozpustným produktům, jež se mohou hromadit vně neuronů a vytvářet tzv.  $A\beta$  plaky [15,16]. Právě hromadění  $A\beta$  zasahuje do mezineuronové komunikace pomocí synapsí a způsobuje buněčnou smrt. Ukládání extracelulárního  $A\beta$  vede také k oxidativnímu stresu, mitochondriální dysfunkci a nedostatku energie v buňkách [17]. Možné je, že  $A\beta$  není ani tak toxický, nýbrž zvyšuje citlivost neuronů vůči dalším poškozujícím vlivům, například nedostatku glukosy nebo vlivům excitačních aminokyselin [14].  $A\beta$  se také ukládá



i v mozku lidí klinicky normálně stárnoucích, bez známek demence. Ukládání A $\beta$  v mozku nekoreluje se ztrátou neuronů a kognitivním úpadkem [18].

### 3.1.2.5 Porucha mitochondriálního metabolismu

Mitochondrie – membránová buněčná organela, jejíž funkcí je produkce energie pro organismus. Distribuce mitochondrií v buňkách tkání závisí na energetické náročnosti. Vzhledem k vysoké energetické náročnosti, vysoké produkci a spotřebě adenosintrifosfátu (ATP) v mozku, většina mitochondriálních mutací nebo mitochondriálních toxinů poškozuje mozkovou funkci a vede k neurologické patologii [17]. U osob s AD jsou výrazně postiženy mitochondriální funkce, což má za následek snížení produkce molekul ATP jako nosiče energie a také se vytváří méně acetylkoenzymu A jako substrátu pro tvorbu ACh [12].

Práce Catariny Oliveiry a jejích kolegů ukázala, že buňky bez mitochondrií byly *in vitro* vůči A $\beta$  mnohem odolnější než buňky obsahující mitochondrie [19].

### 3.1.2.6 Volné radikály a oxidační stres

Nejbohatším zdrojem reaktivních forem kyslíku (ROS) je dýchací řetězec v mitochondriích, ovšem samotné mitochondrie jsou velmi náchylné k oxidačnímu poškození či poškození A $\beta$  [20]. Stárnutím nebo vlivem nemoci může docházet k únikům těchto radikálů. ROS má vliv na oxidaci proteinů, peroxidaci lipidů, hromadění a ukládání A $\beta$  či inaktivaci enzymů. Neurony, u kterých došlo k peroxidaci, podléhají apoptóze [4]. Za patofyziologických podmínek se objevuje nerovnováha mezi produkcí a odstraňováním ROS. Výsledkem je pak zvýšená hladina ROS, která může hrát roli v rozvoji nejen AD.

### 3.1.2.7 Poruchy metabolismu glukosy

Epidemiologické údaje a výsledky experimentálních prací naznačují vztah mezi onemocněním diabetes mellitus typu 2 (DM2) a poruchami kognitivních funkcí a výskytem AD. Inzulinová rezistence, hlavní patogenetický faktor DM2, je také spojena s výskytem neuropsychiatrických onemocnění [21].

V mozku nemocných se nacházejí snížené hladiny inzulínu. S progresem AD klesá hladina inzulínu i hustota jeho receptorů v mozku. Inzulin a A $\beta$  jsou dva kompetitivní substráty inzulín degradabilního enzymu (IDE), které tento enzym rozkládá. Kompetice inzulínu a A $\beta$  při zvýšené hladině inzulínu může přispívat ke zvýšené zátěži A $\beta$  [21].

### 3.1.2.8 Stárnutí

S věkem se snižuje hmotnost i velikost mozku společně s tloušťkou mozkové kůry. Po šedesátém roce života se začínají rozšiřovat mozkové komory. U AD probíhají podobné změny jako při stárnutí, dochází ke snižování hmotnosti a velikosti mozku, snižuje se tloušťka mozkové kůry a rozšiřují se mozkové komory. Rozdíly mezi stárnutím a AD (zde bývá postižení větší) jsou nápadnější u presenilní formy. [14]

### 3.1.3 Genetické abnormality způsobující AD

U některých forem familiární AD byly popsány mutace genu pro APP, který je lokalizován na 21. chromozomu.

Mutaci mohou podlehnout také geny pro presenilin 1 a presenilin 2. Gen pro presenilin 1 je lokalizován na chromozomu 14. a nese informaci pro tvorbu proteinu presenilin 1. Gen pro presenilin 2 je uložen na 1. chromozomu. Preseniliny jsou transmembránové proteiny, jejichž funkcí je mezibuněčná signalizace, přenos apoptických signálů a taktéž jsou součástí  $\gamma$ -sekretasy. [15]

Do genetických abnormalit můžeme zařadit i trizomii 21. chromozomu – Downův syndrom. Každá buňka těla člověka, trpícího tímto onemocněním, obsahuje jeden chromozom navíc, takže místo obvyklých 46 chromozomů (ve 23 párech) jich mají 47 (22 párů a jednu trojici). Vzhledem k faktu, že na 21. chromozomu je uložen gen pro APP, je pravděpodobné i zvýšení jeho hladin a hladin jeho produktů. [16]

### 3.1.4 Rizikové faktory

Ačkoli není přesně známá příčina vzniku a rozvoje AD, předpokládá se, že je výsledkem více faktorů [7,12,22,23]. Ty označujeme jako rizikové faktory a řadíme mezi ně věk, výskyt AD v rodině, gen pro apolipoprotein E, pohlaví, obezitu, diabetes, kouření, hypertenzi, kardiovaskulární onemocnění, nižší dosažené vzdělání, poranění hlavy či mozku, osamělost, složení střevní mikroflóry, dlouhý spánek, užívání benzodiazepinů.

Některé rizikové faktory jako věk, pohlaví a rodinnou historii nemoci ovlivnit nemůžeme, některé však ano. Obezita, diabetes, kouření, hypertenze, kardiovaskulární onemocnění patří právě mezi tyto ovlivnitelné faktory. Pravidelná fyzická aktivita, zdravá strava a potažmo zdravý životní styl snižuje riziko kognitivního úpadku a může snížit riziko

vzniku demence [23,24]. Také celoživotní procvičování a trénink mozku a paměti redukuje riziko poklesu kognitivních funkcí [23].

#### 3.1.4.1 Věk

Nejpodstatnějším faktorem podporujícím rozvoj AD je věk. Většina lidí trpících tímto onemocněním je ve věku od 65 a výše. Platí zde přímá úměra – čím vyšší věk, tím vyšší pravděpodobnost rozvoje AD. Ačkoli vyšší věk je rizikovým faktorem, věk samotný není dostatečný k vyvolání tohoto onemocnění. [23]

#### 3.1.4.2 Výskyt AD v rodině

Výskyt AD v rodině zvyšuje riziko rozvoje AD. Jedinci, kteří mají rodiče či sourozence s touto nemocí, mají vyšší pravděpodobnost, že se u nich rozvine AD, ve srovnání s lidmi, kteří nemají příbuzné prvního stupně trpící AD. Obecně lze říci, že pokud se v rodině vyskytuje v podstatě jakékoliv dědičné onemocnění, hraje roli nejen genetika, ale také rodinné zázemí a životní styl. [23]

#### 3.1.4.3 Gen pro apolipoprotein E

Dalším z neovlivnitelných rizikových faktorů je gen pro apolipoprotein E a jeho produkt apolipoprotein E, který je zodpovědný za transport cholesterolu. Je totiž součástí lipoproteinu o velmi nízké hustotě (VLDL) a lipoproteinu o vysoké hustotě (HDL) a chylomikronů a slouží jako ligand pro vazbu na buněčné receptory. Tento gen se vyskytuje v několika podobách – apoE2, apoE3, apoE4. Člověk s formou apoE4 má vyšší riziko rozvoje AD v porovnání s člověkem s apoE3 formou a jedinec mající ve své genetické výbavě apoE2 má snížené riziko rozvoje této choroby oproti lidem s formou apoE3. Ovšem samotná alela pro apoE4 nezaručuje rozvoj AD. [23]

#### 3.1.4.4 Pohlaví

Riziko výskytu jakékoli demence u žen je 1,9krát vyšší než u mužů, riziko výskytu AD je u žen 3,1krát vyšší než u mužů [14]. A to pravděpodobně v důsledku postmenopauzálního deficitu estrogenu [25]. Zatímco incidence vaskulární demence byla vyšší u mužů nezávisle na věku, což představuje 25 až 30 % všech případů demence a pouze 10 až 15 % u žen [26].

#### 3.1.4.5 Nižší dosažené vzdělání

Lidé s nižším dosaženým vzděláním mají vyšší riziko rozvoje AD a jiných demencí ve srovnání s lidmi s vyšším vzděláním. Tito lidé mají totiž vyšší pravděpodobnost pracovat v zaměstnáních, jež jsou méně mysl stimuluující. Navíc, nižší dosažené vzdělání může mít za následek i nižší socioekonomickou životní úroveň, která může naopak zvyšovat riziko špatné výživy či snižovat dostupnost zdravotní péče. [23]

U lidí s dosaženým základním vzděláním se na syndromu demence kromě AD často spolupodílí vyšší výskyt alkoholické demence. [14]

#### 3.1.4.6 Traumatické poranění mozku

Také závažné a středně závažné traumatické poranění mozku zvyšují riziko rozvoje AD a jiných demencí [23].

#### 3.1.4.7 Kouření

Kouření, kromě karcinogenních účinků, také zvyšuje riziko kardiovaskulárních chorob a zhoršuje mozkovou perfuzi. Nikotin, na druhou stranu, jako agonista nikotinových receptorů, může zvyšovat jejich počet a tím příznivě ovlivňovat kognitivní funkce. Kuřáci jsou více ohroženi vznikem AD, méně i jinými typy demencí než nekuřáci. [27]

#### 3.1.4.8 Deprese

Uvádí se, že deprese je rizikovým faktorem i prodromem AD a jiných demencí, a je také běžnou komplikací demence ve všech stádiích. Deprese raného života je spojena se zvýšeným rizikem demence, deprese pozdního života je prodromem demence. [28]

#### 3.1.4.9 Osamělost

Určité studie také uvádí za jeden z rizikových faktorů osamělost. Tento termín označuje subjektivní úzkostný pocit odcizení. Samotné vnímání osamělosti je spojeno se zvýšeným rizikem kardiovaskulárního onemocnění, zvýšeným krevním tlakem, mortalitou způsobenou všemi příčinami a zvýšenou zánětlivou a metabolickou reakcí na stres. Osamělost je spojena s vyšší amyloidní zátěží, což je neuropatologický rys AD. Osamělost je také úzce spojena s depresí, která je spojena s vyšším rizikem rozvoje demence. [29]

#### 3.1.4.10 Nezdravá strava

Nadměrná konzumace potravin bohatých na jednoduché sacharidy, nasycené a *trans*-mastné kyseliny a nezpracované červené maso, hranolky aj. mají prozánětlivý vliv na mozek pacientů s AD. Zánětlivé procesy mohou být také urychleny kvůli obezitě středního věku, zejména v souvislosti s hypertenzí, dyslipidemií, aterosklerózou a DM2. [30]

#### 3.1.4.11 Složení střevní mikroflóry

Studie prováděné na zvířatech prokázaly, že antibiotika, mikrobiální infekce, probiotika a fekální transplantace mikrobioty mohou ovlivnit nejen složení střevní mikroflóry, ale také kognitivní chování nebo patogenezi AD [31,32].

Střevní bakterie jsou schopny vylučovat enormní množství lipopolysacharidů (složky membrány gramnegativních bakterií, využívající se k vyvolání zánětu) a amyloidů, které mohou přispívat k patogenezi AD, zejména během stárnutí, kdy jsou epitel gastrointestinálního traktu a hematoencefalická bariéra propustnější. Je tedy možné, že změny střevní mikroflóry související s věkem usnadňují zánětlivé procesy, které mohou přispívat k rozvoji AD. [32]

#### 3.1.4.12 Dlouhý spánek

Dlouhý spánek, v porovnání s normální dobou spánku, je spojen s vyšším rizikem vzniku AD i ostatních demencí [33].

#### 3.1.4.13 Užívání benzodiazepinů

Dále se objevují náznaky, že užívání benzodiazepinů může souviset se vznikem AD [12]. Ve studii bylo prokázáno, že riziko AD vzrůstá o 43–51 % u pacientů, kteří v minulosti užívali benzodiazepiny, a že toto riziko je vyšší při užívání dlouhodobě působících benzodiazepinů oproti krátkodobým. Problémem zůstává fakt, že příznaky, na které jsou benzodiazepiny předepisovány (úzkost, nespavost, depresivní epizody) mohou být již příznaky samotné demence. Vzhledem k tomu, že benzodiazepiny akutně zhoršují kognitivní funkce, mohlo dojít ke zkreslení výsledků studie. [12,34]

### 3.1.5 Klinický obraz

Mozkové změny, které jsou spojované s AD, mohou začínat již 20 i více let před nástupem symptomů. Počáteční změny je mozek schopen kompenzovat, ale jak poškození postupuje

začínají se postupně projevovat známky kognitivního úpadku. Později nastoupí onemocnění v plném rozsahu se všemi svými klinickými znaky. [23]

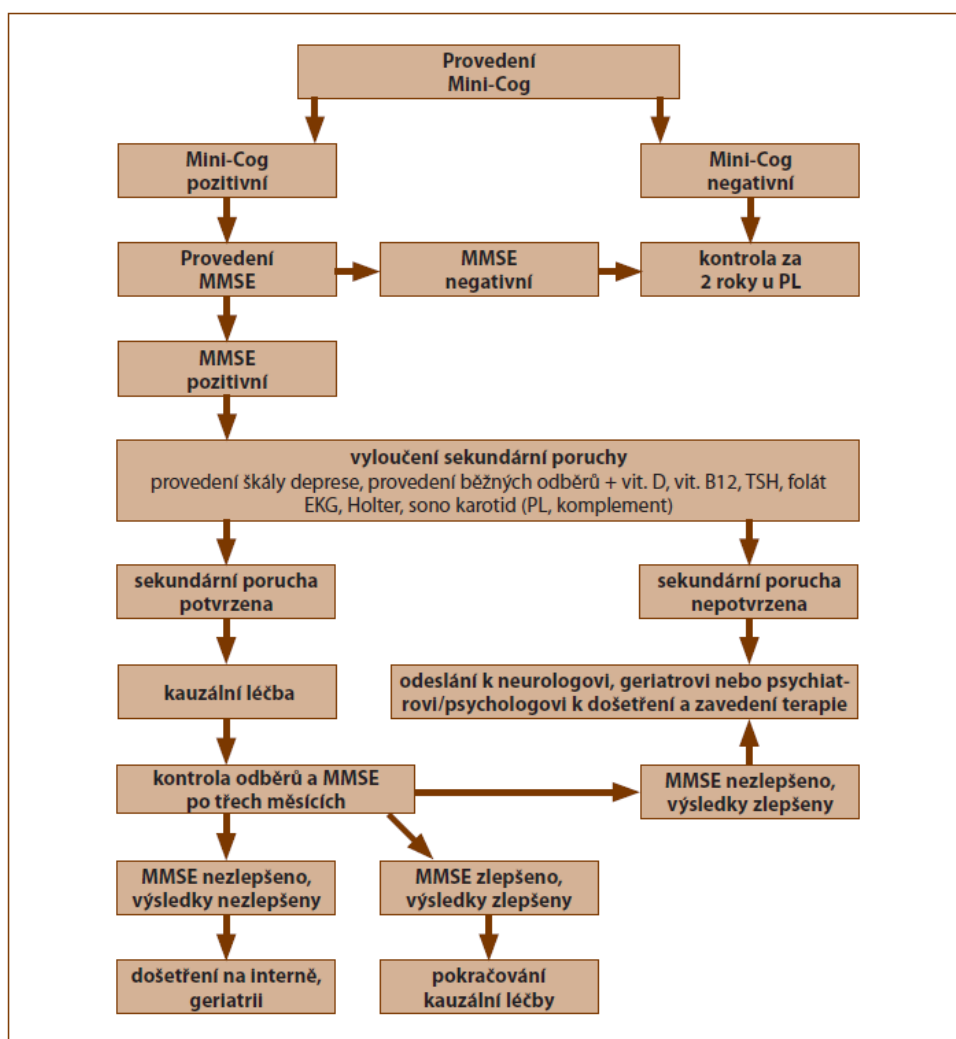
Jednotlivé symptomy AD se mohou mezi postiženými poněkud lišit. Nástup nemoci je plíživý a klinické obtíže jsou progresivní [23]. Nejběžnějším prvotním příznakem je zhoršování schopnosti zapamatovat si nové informace a výbavnost z paměti, proto v pozdějších stádiích nahrazují pacienti výpadky paměti konfabulacemi, tj. náhodnou vymyšlenou odpovědí, která sice zapadá do kontextu otázky či probíraného tématu a pacient je v té chvíli přesvědčen o pravdivosti svého tvrzení, ale ve skutečnosti toto tvrzení neodpovídá pravdě. Také dochází k drobným změnám osobnosti a chování. Postižený ztrácí zájem o své okolí, koníčky, stává se emočně oploštělým. Objevuje se egocentrismus, sobeckost a podezíravost. Výrazné jsou také poruchy motivace, například péče o sebe sama, proto bývají neupravení. Dochází ke ztrátě úsudku a objevují se problémy při každodenních činnostech ať už v práci či doma. Později nastupuje dezorientace jak časová, tak prostorová. Bývá zhoršená schopnost abstrakce, což se projeví například v tom, že pacienti nedokážou vyložit smysl přísloví. Postupem času výrazně chudne slovní zásoba i myšlení takto postižených pacientů. V řeči se mohou objevovat verbigerace (opakování jednoho slova víckrát za sebou), perseverace (ulpění na jediné myšlenku, kterou pacient neustále opakuje), palilalie (vícenásobné opakování vlastních zvuků, slabik, slov či vět, zejména těch posledních) a logoklonie (komolení slov, koncovek, či produkce slabik a slov nedávajících smysl). U pacientů s AD můžeme také pozorovat korové poruchy jako jsou afázie (narušení schopnosti porozumění a tvorby řeči), apraxie (ztráta schopnosti vykonávat koordinované, účelné a naučené pohyby), agnózie (porucha poznávání), deprese a deliria. V terminálních stádiích se u některých pacientů může rozvinout poruchy chůze nebo dokonce extrapyramidový hypertonicko-hypokinetický syndrom. Nemocný pak umírá na přidružená onemocnění nebo úrazy, většinou po několika letech. Pro pozvolný a nenápadný nástup bývá obtížné zjistit počátek onemocnění, což často zkreslí dobu trvání choroby [1].

### 3.1.6 Diagnostika

K léčbě a pozitivnímu ovlivnění každé nemoci je nutná správná a včasná diagnostika onemocnění. Zkušenost z praxe přitom říká, že u nemocného s časně diagnostikovanou a dobře léčenou demencí je možno až o dva roky oddálit pokročilá stadia onemocnění [10].

Vhodnou metodou časně diagnostiky, ať u kognitivních či jiných poruch, je screening, proto by se orientační vyšetření kognitivních funkcí mělo stát součástí pravidelné preventivní

prohlídky. U lidí starších 65 let jedenkrát za dva roky, u mladší populace, pokud pociťují deprese či změny osobnosti, pokud u nich dochází ke zhoršení chronických chorob, pokud se u nich vyskytují nevysvětlené pády a závratě. Vzhledem k možným poruchám paměti a změně náhledu je vhodné anamnézu doplnit i od blízkých či pečovatelů postižených osob. Vhodný je Mini-Cog test, který spočívá v zapamatování si tří slov a kreslení hodin. Při negativním výsledku tohoto testu následuje kontrola pacienta za 2 roky (u osob s vyšší inteligencí může tento test selhat), při pozitivním výsledku je nutno provést MMSE (krátká škála mentálního stavu) [3]. Pokud vyjde tento test negativně, následuje kontrola pacienta za 2 roky. Při pozitivním výsledku následuje vyšetření pacienta pomocí geriatrické škály deprese, laboratorní vyšetření – krevní obraz, biochemie včetně hladiny vitamínu D, vitamínu B<sub>12</sub>, folátu, tyreotropního hormonu; sono karotid, EKG případně EKG-Holter a podrobnější neurokognitivní vyšetření [10,22].



Obrázek 1: Schematické znázornění diagnostiky AD [10]

Všichni pacienti by měli absolvovat vyšetření mozku zobrazovací metodou (CT, MR), aby mohly být vyloučeny příčiny demence jako jsou nádory, intrakraniální hematomy či vaskulární poruchy [22]. SPECT (jednofotonová emisní počítačová tomografie) posuzuje metabolickou aktivitu mozkových buněk na základě prokrvení. PET (pozitronová emisní tomografie) prokazuje pokles metabolismu značené glukosy v hipokampu [3]. Přesnou diagnózu určí mozková biopsie či diagnóza *post mortem* [3,4].

### 3.1.7 Strategie léčby

V současné době ještě není příčina AD objasněna. Jsou sice známy neurodegenerativní děje vedoucí ke vzniku demence, ale není znám jejich spouštěč a také není plně známa jejich vzájemná podmíněnost. Proto kauzální terapie v současnosti není možná. [12]

AD sice ještě neumíme vyléčit, jsme ale schopni prodloužit lehká stádia a oddálit tak těžká stádia nemoci, a tím zlepšit kvalitu života nemocných, proto je třeba začít léčit co nejdříve. Problémem ale zůstává fakt, že nástup AD je nenápadný a plíživý, a příznaky jsou pokládány za běžné známky stárnutí. [35]

#### 3.1.7.1 Protektivní faktory

##### 3.1.7.1.1 NESTEROIDNÍ ANTIREVMATIKA-ANTIFLOGISTIKA

Nesteroidní antirevmatika-antiflogistika (NSAID) se většinou používají k úlevě od bolesti nebo zánětlivých stavů. Epidemiologické studie naznačily, že jejich použití může mít protektivní účinek na vývoj AD [36]. Tuto hypotézu podporují mechanismy účinku NSAID. NSAID blokují cyklooxygenasu, což vede ke snížení hladin prostaglandinů, prostacyklinu a tromboxanů, které jsou důležitými látkami v patogenezi AD. Kromě toho jsou NSAID také zapojeny do zpracování APP vedoucí ke snížení amyloidogenních forem. [37,38]

Přestože observační a epidemiologické studie naznačily přínosnou roli NSAID při snižování rizika AD či jejího rozvoje, metaanalýzy a randomizované kontrolované studie tento názor jednoznačně nepotvrdily. U lidí, s již existujícím kognitivním poklesem a diagnostikovanou AD, by neměly být NSAID podávány, protože nebyl prokázán žádný klinický důkaz jejich prospěchu. [39]

##### 3.1.7.1.2 ESTROGENNÍ SUBSTITUCE U ŽEN PO MENOPAUZE

Estrogen se dlouhodobě používá k léčbě fyzických příznaků menopauzy a při prevenci osteoporózy u žen po menopauze. Klinický výzkum naznačuje, že estrogen také hraje



významnou neuromodulační a neuroprotektivní roli. K četným estrogenním účinkům v mozku patří modulace synaptogeneze, zvýšený průtok krve mozky, ochrana před apoptózou, protizánětlivé účinky a antioxidační vlastnosti. Důkazy z epidemiologických studií podporují zlepšenou kognitivní funkci u žen s AD užívajících estrogenovou substituční terapii a také snížené riziko rozvoje AD u zdravých žen, které dostávají estrogenovou substituční terapii. Další klinické důkazy naznačují, že estrogen může modulovat specifické kognitivní funkce, jako je pracovní paměť a verbální učení a paměť. Výsledky z novějších kontrolovaných studií však neprokázaly trvale pozitivní účinek estrogenu na kognitivní funkce žen s AD. [25,40,41]

#### 3.1.7.1.3 ANTIOXIDANTY

Mezi tyto látky patří například vitamín E, retinol,  $\beta$ -karoten, kyselina lipová atd. AD je spojována s oxidačním stresem v mozku, vitamín E je lipofilní antioxidant, který prostupuje přes hematoencefalickou bariéru (HEB) do mozku, kde brání oxidaci. V jedné studii, pacienti s AD užívající vitamín E, vykazovali významné zpoždění ztráty kognitivních schopností spojené s onemocněním. Ovšem tento fakt byl zpochybněn jinými výzkumnými skupinami. U mnoha jiných nemocí se ukázalo, že lidé nereagují jednotně na léčbu vitamínem E. Jednotlivé reakce lze přisuzovat k expresi proteinů transportujících alfa-tokoferol. Což vede ke zvážení možnosti, že by mohly existovat dvě různé subpopulace, pokud jde o reakci na vitamín E, jako léčba u AD. [19]

U pacientů s AD byly zjištěny nízké hladiny vitamínu D. Když byl současně s memantinem podáván také vitamín D, byl jeho účinek lepší, než když byl podáván samostatně. [42]

Vitamín A hraje hlavní roli ve vývoji neuronů a zůstává přítomen v nervovém systému po celý život. Hraje také roli s beta-karotenem při ochraně a regeneraci neuronů během procesu neurodegenerace, inhibování tvorby a agregace A $\beta$  plaků. Studie prokázaly nízkou hladinu vitamínu A a betakarotenů u pacientů s AD ve srovnání se zdravými lidmi. [42]

#### 3.1.7.1.4 KOGNITIVNÍ TRÉNINK

Kognitivní trénink jako prevence vzniku a rozvoje AD se zdá být účinný, bohužel lidé s již přítomným kognitivním deficitem a s demencí z kognitivního tréninku neprofitují tak jednoznačně. Z toho důvodu je doporučováno využívat kognitivní trénink jen v časných stádiích demence a jen u pacientů, kteří k tomu jsou sami motivováni. [27]

#### 3.1.7.1.5 FYZICKÁ AKTIVITA

Střední a vysoká intenzita cvičení prokázala neuroprotektivní účinek prostřednictvím produkce antioxidantních enzymů a růstových faktorů, jako jsou nervové růstové faktory a růstový faktor vaskulárního endotelu a snížením produkce ROS, koncentrace A $\beta$  plaků, což vede ke zlepšení průtoku krve mozem a zlepšení paměti. [43]

Fyzická aktivita tak může snížit pravděpodobnost rozvoje demence a AD. Není ale jasné, zda je vztah závislý na dávce, ale zdá se, že vyšší fyzická aktivita vede ke snížení rizika. [44]

#### 3.1.7.1.6 MEDITACE

Výzkum naznačuje, že meditační technika zvaná *Kirtan Kriya* zlepšuje paměť a snižuje riziko AD tím, že zlepšuje spánek, snižuje depresi, zvyšuje pohodu, reguluje imunitní systém, zlepšuje metabolismus glukosy, také zlepšuje řadu aspektů duševního zdraví. [45]

#### 3.1.7.1.7 VČASNÁ LÉČBA DEPRESÍ

Deprese je spojena se zvýšeným rizikem AD. Pro prevenci demence a zlepšení prognózy pacienta je proto důležité zabránit a léčit depresi. [46]

Ve studii u pacientů s mírnou kognitivní poruchou a depresí v anamnéze byla dlouhodobá léčba selektivními inhibitory zpětného vychytávání serotoninu (SSRI) (přes 4 roky) spojena se zpožděným rozvojem AD, a to přibližně o 3 roky ve srovnání s krátkodobou léčbou SSRI, léčbou jinými antidepresivy nebo bez léčby a ve srovnání s pacienty s mírnou kognitivní poruchou, ovšem bez anamnézy deprese. Závěrem této studie je fakt, že dlouhodobá léčba SSRI může oddálit progresi z mírné kognitivní poruchy na AD. [47]

#### 3.1.7.1.8 VYŠŠÍ VZDĚLÁNÍ

Lidé s dosaženým vyšším vzděláním mají nižší riziko rozvoje AD a jiných demencí ve srovnání s lidmi s nižším vzděláním. [48] Lidé, kteří dosáhli vyššího stupně vzdělání si zároveň vytvořili tzv. kognitivní rezervu. To znamená, že jednotlivé neurony v mozku mají mezi sebou vyšší počet spojení, což následně umožňuje využití těchto alternativních komunikačních drah ke kompenzaci prvotních symptomů AD. [14]

#### 3.1.7.1.9 APOE2 A APOE3

Člověk s formou apoE2 má nižší riziko rozvoje AD v porovnání s člověkem s apoE3 formou a jedinec mající ve své genetické výbavě apoE3 má snížené riziko rozvoje této choroby oproti lidem s formou apoE4. [23]

#### 3.1.7.1.10 VELIKOST MOZKU

Čím větší je objem mozku premorbidně, tím větší je rezerva pro uchování kognitivních funkcí při postižení AD. [49]

### 3.1.7.2 Režimová opatření

Přístup musí být komplexní a měl by zahrnovat nejen individuální přístup k pacientovi samotnému, ale měl by taktéž zahrnovat i jeho rodinu a všechny ošetřující [50], kteří by měli poskytnout přiměřenou pomoc a také přizpůsobit komunikaci s nemocným – nenařizovat, ale přesvědčovat, být trpěliví, věnovat nemocným pozornost a stimulovat k duševní aktivitě [1]. Tato komplexnost by měla zahrnovat také správnou výživu a hydrataci nemocného, jeho celkovou dobrou kondici, vhodnou tělesnou aktivitu [35].

Vedle farmakoterapie je nutná i úprava životního prostředí, ve kterém pacient přebývá. Vybavení bytu by mělo být jednoduché, bezpečné a dostatečně prostorné [2]. Zvýraznění dveří, kam chceme, aby nemocný člověk chodil, či zamaskování dveří, kudy naopak nechceme, aby chodil, vyndání klíčů ze dveří, i tyto „nepodstatné“ detaily, hrají velkou roli [51].

Je také zapotřebí stanovení a dodržování denního režimu, díky kterému se nemocný bude schopen zorientovat v čase [52].

Také je zapotřebí, aby měl pacient osobu (nejlépe rodinný příslušník), která bude léčbu koordinovat a zajišťovat např. seznam aktuálních užívaných léků a jeho předkládání při lékařské kontrole [35].

Lze využít muzikoterapie, která pozitivně ovlivňuje kognitivní (paměť, pozornost) a behaviorální (úzkost, deprese) symptomy AD [53].

### 3.1.7.3 Farmakoterapie

Samotná farmakoterapie zahrnuje více přístupů, které se často kombinují a vzájemně doplňují. Současné léčebné postupy využívají inhibitory acetylcholinesterasy, cholinomimetika, léčiva ovlivňující glutamátové receptory, nootropní farmaka, léčiva s vazodilatačními účinky,

protizánětlivě působící léčiva, modulátory imunitního systému, antioxidanty, látky ovlivňující tvorbu A $\beta$  a další. [54]

### 3.1.7.3.1 INHIBITORY CHOLINESTERAS

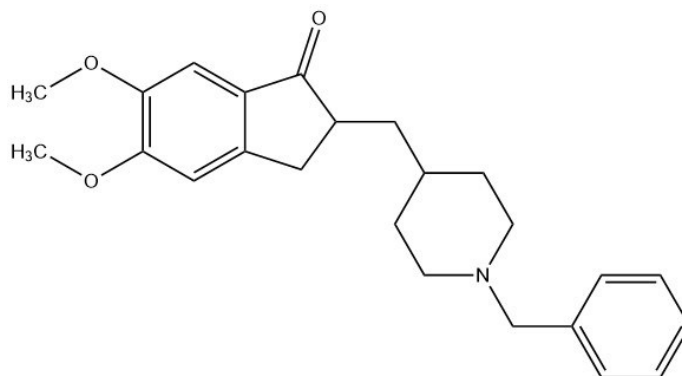
Do skupiny kognitiv – léčiva zlepšující pozornost a kapacitu paměti, jsou řazeny inhibitory cholinesteras ze skupiny nepřímých cholinomimetik. AChE je enzym lokalizovaný především na membráně nervových zakončeních, jehož úkolem je rozklad ACh v synaptické štěrbině na cholin a acetát (kyselina octová). Výsledkem inhibice tohoto enzymu je zvýšení koncentrace ACh v synaptické štěrbině, což vede ke stimulaci muskarinových či nikotinových receptorů. S rozvojem AD aktivita tohoto enzymu klesá a na odbourávání ACh se pak může ve větší míře podílet i BChE, se stejným účinkem avšak nacházející se v plazmě, kůži, GIT, játrech a dalších místech [12].

Podobně jako v ostatních státech jsou v ČR k léčbě mírné až středně těžké AD používány 3 léčiva z této skupiny.

#### DONEPEZIL

Donepezil – inhibitor AChE piperidinového typu s velmi malou afinitou k BChE. Výhodou jeho použití je dobrá biologická dostupnost, dlouhý biologický poločas (70–80 hodin) a minimální vedlejší účinky. Je ovšem metabolizován pomocí CYP3A4 a v menší míře také CYP2D6 na dva účinné metabolity. [12]

Inhibice acetylcholinesterasy donepezilem je do určité míry tkáňově specifická – inhibice je slabší v hladkém a příčně pruhovaném svalstvu a v myokardu než v CNS. Zlepšení kognitivních funkcí se obvykle projeví během 12 týdnů od zahájení terapie. [54]

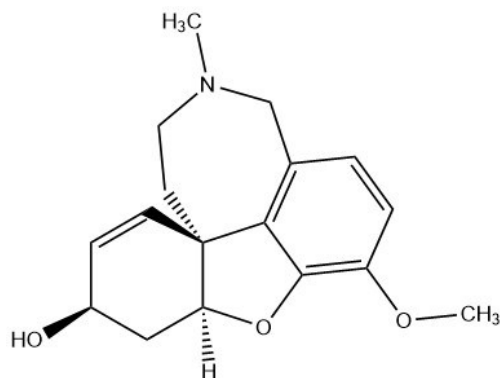


Obrázek 2: donepezil

## GALANTHAMIN

Galanthamin byl poprvé izolován jako alkaloid z rostliny *Galanthus woronowii* Losinsk., ovšem dnes už je běžně syntetizován. Struktura je tvořena benzofurobenzazepinovým skeletem. [11]

Galanthamin je kompetitivní inhibitor mozkových AChE, zatímco inhibice BChE je minimální. Jeho dalším mechanismem účinku je alosterická modulace nikotinových receptorů, čímž zvyšuje uvolňování a produkci ACh a přenos nervových vzruchů. Biologický poločas je kolem 7 hodin. Je odbouráván enzymatickým systémem CYP2D6 a CYP3A4. [12]

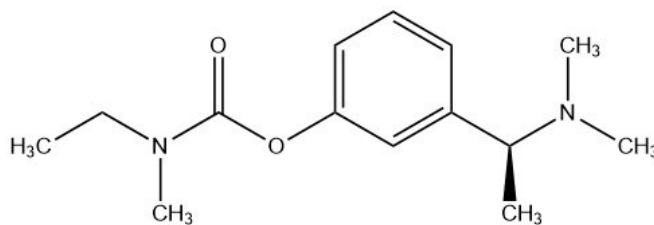


Obrázek 3: galanthamin

## RIVASTIGMIN

Protože rivastigmin přímo interaguje s aktivním místem (karbamyluje) AChE, jedná se o kompetitivní inhibitor AChE, který je odvozen od kyseliny karbamové. Karbamát je více stabilní a hydrolyzuje pomaleji než acetát, proto je biologický poločas 2–4 hodiny (v závislosti na lékové formě), ale samotný účinek trvá déle [12]. Díky přítomnosti terciární aminoskupiny je umožněn jeho průnik přes hematoencefalickou bariéru, a tak působí v CNS. [11]

Indikací rivastigminu je vedle mírné až středně těžké AD také mírná až středně těžká demence doprovázející Parkinsonovu chorobu [12].

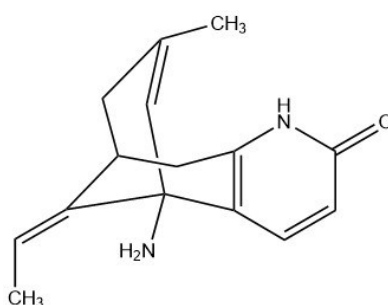


Obrázek 4: rivastigmin

## HUPERZIN A

Levotočivá forma huperzinu – obsahová látka z nati vrance pilovitého (*Lycopodium serratum* Thunb.), účinkuje jako reverzibilní inhibitor AChE. V současné době se alkaloid využívá u léčby AD v Číně. [56]

Huperzin A má lepší biologickou dostupnost při orálním podání, prochází rychleji přes HEB a má delší působení než ostatní používaná léčiva. Také působí jako antagonist NMDA receptorů a chrání tak neurony před toxicitou glutamátu. Po podání se mohou objevit nežádoucí účinky, které jsou ale menší než u jiných léčiv využívajících se pro zlepšení kognitivních funkcí. [57]



Obrázek 5: huperzin A

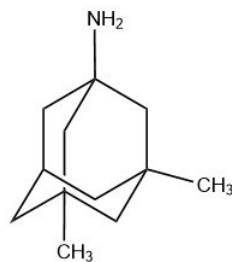
### 3.1.7.3.2 ANTAGONISTÉ NMDA RECEPTORŮ

Do skupiny kognitiv můžeme zařadit také blokátory NMDA receptorů. Receptor – buněčná makromolekula, která je spojena přímo a specificky s přenosem chemického signálu uvnitř a mezi buňkami. NMDA receptor pak řadíme do skupiny excitačních ionotropních receptorů (ligandem otevíraných iontových kanálů). K aktivaci tohoto receptoru je nutné současné navázání glutamátu i glycinu, což následně vede k otevření kalciových kanálů a k proudění vápenatých iontů do buněk. Tyto receptory hrají zásadní roli v procesech učení a paměti, konkrétně se podílejí na synaptické plasticitě. Ovšem nadměrná stimulace těchto receptorů vede k nadměrnému přísunu  $\text{Ca}^{2+}$  iontů do buněk, následně jsou aktivovány některé proteinkinasy, fosfatasy a proapoptotické faktory a dochází tak až k neuronální apoptóze. Tímto mechanismem pak v pozdějších stádiích AD dochází k excitotoxicitě. [12]

## MEMANTIN

Derivát adamantanu memantin je nekompetitivní antagonist NMDA receptorů. Jejich blokádu brání aktivaci NMDA receptorů při zvýšené hladině glutamové kyseliny, která je přítomna v CNS u AD a má tak neuroprotektivní účinky. [11]

Memantin se po perorálním podání dobře vstřebává a z malé části se metabolizuje v játrech, zbytek je vyloučen v nezměněné podobě močí a v daleko menší míře i žlučí. Jeho biologický poločas je 60–80 hodin a prodlužuje se při zvýšení pH moči. [54]



Obrázek 6: memantin

### 3.1.7.3.3 NOOTROPNÍ LÉČIVA

Ke zlepšení mozkových funkcí, zlepšení koncentrace, učení a zmírnění poruch paměti jsou používána také nootropní léčiva jejichž výsledkem dochází zpravidla ke zvýšení využití energie neurony, zlepšení průtoku krve mozkem či inaktivaci volných kyslíkových radikálů.

## GINKGO BILOBAE EXTRACTUM

Standardizovaný extrakt z listů jinanu dvoulaločného Egb761 zvyšuje syntézu ACh a jeho uvolňování v CNS, má antioxidační a vazodilatační účinky. Dále zvyšuje průtok krve mozkem, očním pozadím a dalšími tkáněmi včetně končetin. Možnou nevýhodou tohoto extraktu může být schopnost snížení agregace trombocytů snížením hladin tromboxanu A<sub>2</sub>. [57]

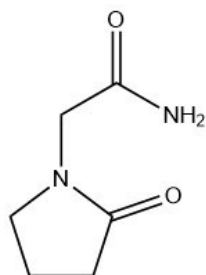
Extrakt Egb761 se obvykle používá u počínajících demencí, kde ještě nejsou indikovány inhibitory AChE, anebo je tento extrakt podáván do kombinace s inhibitory AChE či memantinem. Užívání extraktu vedlo ke zlepšení kognitivních funkcí u pacientů trpících demencí. Účinek je závislý na dávce, výrazně vyšší efekt byl prokázán u dávek 240 mg denně. [58]

## PIRACETAM

Základem struktury piracetamu a od něj odvozené skupiny racetamů je substituovaný laktam kyseliny  $\gamma$ -aminomáselné [11]. Mechanismus účinku spočívá ve zvýšení tvorby ATP v mozku,

stabilizaci trombocytů a zlepšení reologických vlastností krve, snížení adhezivity erytrocytů, ve zvýšení cholinergní transmise a uvolňování dopaminu. [54]

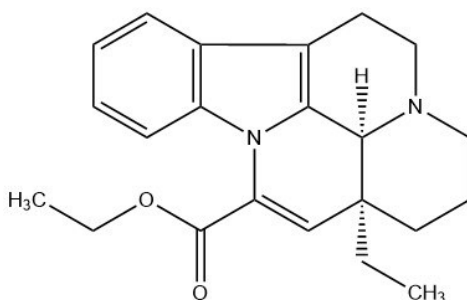
Stinnou stránkou tohoto léčiva vedle možných nežádoucích účinků je fakt, že se v organismu nebiotransformuje a vylučuje se v nezměněné podobě prakticky úplně močí. Snadno se tak dostává nejen do odpadních vod a může tak představovat budoucí problém životního prostředí. [59]



Obrázek 7: piracetam

## VINPOCETIN

Derivát přírodního alkaloidu vinkaminu, je využíván pro zlepšení paměti, zvýšení cerebrálního krevního průtoku, pro zlepšení metabolismu mozkové tkáně při kognitivních odchylkách a AD, prevenci morbidity a mortality po iktu a snížení rizika jejího vzniku a kinetóz. [57]



Obrázek 8: vinpocetin

### 3.1.7.3.4 POTENCIÁLNÍ LÉČIVA

Přírodní produkty rostlin jako alkaloidy, flavonoidy, terpenoidy, polyfenoly aj. mohou mít na náš organismus různé účinky, mimo jiné mohou působit protizánětlivě, antioxidantně, mohou také zlepšovat kognitivní funkce mozku. A protože současná léčba AD klasickými léčivy způsobuje také značné nežádoucí účinky, pokoušíme se nalézt vhodnější léčiva.



## *SALVIA LAVANDULAEFOLIA*

Tento druh šalvěje obsahuje především dvě hlavní obsahové látky a to 1,8-cineol a kafr. Tyto terpeny vykazují inhibiční cholinesterasovou aktivitu, alosterickou modulaci GABA<sub>A</sub>, nikotinových a muskarinových receptorů. Ovšem u některých z těchto mechanismů účinku závisí jejich celková účinnost na synergických interakcích mezi jejich monoterpenovými složkami. [60]

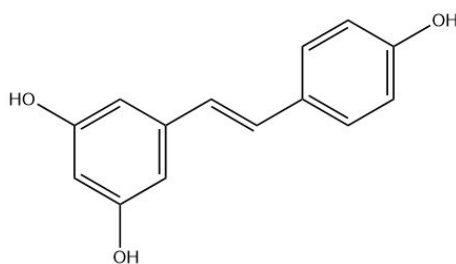
Studie dokazují, že užíváním standardizovaného extraktu *S. lavandulaefolia* lze zlepšit kognitivní funkce u zdravých jedinců (i nad 65 let) [60,61].

## RESVERATROL

Biologicky aktivní formou je (*E*)-izomer. Protizánětlivý účinek v důsledku inhibice COX-1 a COX-2 je vyšší než u acetylsalicylové kyseliny a ibuprofenu. Snižuje aktivitu zánětlivých cytokinů a tím vede ke snížení mortality na kardiovaskulární onemocnění. [57]

Resveratrol inhibicí ribonukleosidreduktasy má negativní vliv na buněčnou proliferaci. Působí vazodilatačně, indukuje apoptózu některých buněk, interferuje s procesy krevní koagulace – snižuje agregaci trombocytů, příznivě ovlivňuje aterogenní index, má neuroprotektivní účinky a antioxidační účinky. Resveratrol snižuje tvorbu proteinů potřebných pro proliferaci viru *Herpes simplex* a inhibuje tak jeho replikaci. Stilbenová struktura je zodpovědná za inhibiční monoaminoxidasovou aktivitu. [62]

Účinnost, bezpečnost a farmakokinetika resveratrolu byla dokumentována ve více než 244 klinických studiích, přičemž v současné době probíhá dalších 27 klinických studií. Uvádí se, že resveratrol potenciálně zlepšuje terapeutický výsledek u pacientů trpících diabetes mellitus, obezitou, kolorektálním karcinomem, rakovinou prsu, mnohočetným myelomem, metabolickým syndromem, hypertenzí, AD, mrtvicí, kardiovaskulárními chorobami, ledvinami, zánětlivými onemocněními a rinofaryngitidou. Bohužel ve 2. fázi klinického hodnocení resveratrolu nebyly prokázány žádné významné účinky při terapii AD. [63,64]



Obrázek 9: resveratrol

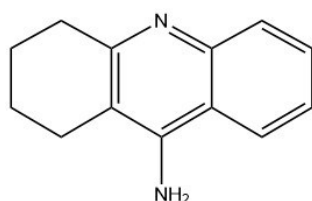
### 3.1.8 Potenciální zásahy

Rozšíření znalostí patogeneze AD podpořilo hledání nových léčebných postupů bližších kauzální terapii tohoto onemocnění.

#### 3.1.8.1 Inhibitory cholinesteras

Během AD je sníženo uvolnění ACh, léčba nemoci pomocí inhibitorů AChE spočívá v tom, že snížené množství ACh je kompenzováno jeho prodlouženým účinkem. U AD se ale kromě AChE uplatňuje ještě další enzym, který je za normálních podmínek naprosto minoritní – BChE. Proto se z hlediska terapie ukazují jako nejúčinnější látky schopné blokovat oba tyto enzymy. [56]

Prvním používaným inhibitorem cholinesteras byl takrin, ten byl ale stažen z trhu z důvodu hepatotoxicity a gastrointestinální toxicity. V současné době jsou vyvíjeny jeho deriváty, které mají zachovanou terapeutickou účinnost, ale jsou méně toxické. [65–67]



Obrázek 10: takrin

#### 3.1.8.2 Inhibitory monoaminoxidasy B

Monoaminoxidasa A katalyzuje biodegradaci neurotransmiterů jako jsou noradrenalin, dopamin, serotonin, tyramin. Monoaminoxidasa B (MAO-B) se více uplatňuje při biodegradaci dopaminu. Blokace těchto enzymů vede ke zvýšení koncentrace noradrenalinu, serotoninu a dopaminu v cytoplazmě neuronů v mozku. [7]

U pacientů s AD byla pozorována zvýšená exprese MAO-B v astrocytech vedle amyloidních plaků. Vysoká aktivita MAO-B může vést ke zvýšené tvorbě kyslíkových radikálů,

čímž může přispívat k patologii AD. Snížení oxidačního stresu vyvolaného ROS inhibicí aktivity MAO-B proto může oddálit progresi onemocnění. [68]

Sembragilin je silný, selektivní, dlouhodobě působící a reverzibilní inhibitor MAO-B vyvinutý pro potenciální léčbu AD [68]. Ve studii se ovšem neprojeví žádné rozdíly mezi léčenými skupinami tímto léčivem a placebem a to ani v nežádoucích účincích ani v ovlivnění ADAS-Cog (stupnice určená na hodnocení závažnosti symptomů AD, využívá se k hodnocení kognitivních funkcí) [69,70].

### 3.1.8.3 Látky snižující tvorbu A $\beta$

$\beta$ -Amyloidní hypotéza vedla k zaměření výzkumu na ovlivnění kaskády tohoto proteinu. Komplikací vývoje inhibitorů  $\beta$ - a  $\gamma$ -sekretas je nutnost přestupu těchto látek přes HEB a fakt, že sekretasy štěpí přes sto jiných substrátů. Jedním z těchto substrátů  $\gamma$ -sekretasy je i Notch protein, který reguluje buněčnou proliferaci, diferenciaci a růst buněk. Díky tomu neselektivní inhibitory  $\gamma$ -sekretas vykazovaly mnoho nežádoucích účinků jako je hematotoxicita, gastrointestinální obtíže, kožní reakce, změny barvy vlasů. Proto byla vyvinuta druhá generace selektivních inhibitorů  $\gamma$ -sekretas (tzv. Notch šetřící inhibitory), které, ač měly lepší bezpečnostní profil, v klinických studiích nejsou příliš nadějně. [65,71,72]

$\beta$ -Sekretasa je dalším zajímavým terapeutickým cílem terapie AD. Četné studie prokázaly shodné patofyziologické mechanismy mezi AD a diabetes mellitus, jako je oxidační stres, mitochondriální dysfunkce, zánět a inzulinová rezistence. Jsou proto zkoušeny látky používané jako perorální antidiabetika pioglitazon a rosiglitazon [73]. V závěrečných fázích klinických studií je další inhibitor  $\beta$ -sekretasy memapsin 2 [74], další nové molekuly jsou intenzivně syntetizovány a preklinicky zkoušeny [65].

Také jsou zkoušeny látky stimulující aktivitu  $\alpha$ -sekretasy. Zvýšení aktivity tohoto enzymu může vést ke snížení produkce A $\beta$  zvýšením proteolýzy APP neamyloidní cestou, jejímž výsledkem jsou nepatogenní fragmenty. Na druhé straně je výsledek chronické upregulace pozorovaný při štěpení jiných substrátů zprostředkovaných  $\alpha$ -sekretasou stále nedefinovaný. [65,72]

#### 3.1.8.4 Látky zvyšující clearance A $\beta$

Aktivní i pasivní imunoterapie využívá strategii založené na zvýšené clearance A $\beta$  či prevenci jeho agregace v mozku. Preklinické studie u zvířat prokázaly účinnost imunoterapie. Klinické studie s lidskými pacienty ukázaly taktéž značnou účinnost, ale i nežádoucí účinky. [75]

Aktivní imunizace zahrnuje vakcinaci pacienta příslušným antigenem, jejímž cílem je vytvoření vlastní imunitní odpovědi organismu. Klinická studie, která zkoušela aktivní vakcínu proti A $\beta$  byla zastavena z důvodu nedostatečného účinku a nežádoucím účinkům. [65]

Při pasivní imunizaci jsou pacientovi intravenózně podány imunoglobuliny. Jedná se o směs přirozených lidských imunoglobulinů včetně protilátek proti A $\beta$ , které brání tvorbě A $\beta$ , napomáhají jeho vylučování z mozku a chrání neurony před toxicitou způsobenou A $\beta$ . Tyto imunoglobuliny nerozpoznávají chemické složení A $\beta$ , ale identifikují jeho špatné složení nebo terciální strukturu, a tak nechávají „zdravé“ molekuly intaktní. [76]

Ovlivnit hladinu A $\beta$  můžeme i nepřímo metodou plazmaferézy. Tato metoda je založena na předpokladu, že existuje dynamická rovnováha mezi poměrem A $\beta$  v likvoru a v periferní krvi. Mechanismus této léčby funguje na jednoduchém principu, a to, že snížení hladin v periferní krvi vede ke snížení hladin v likvoru [77]. Tento nový směr se jeví jako nadějný, ale praktickému širokému využití bude určitě bránit zejména procedurální složitost léčby (zajištění centrálního žilní přístupu, doba léčby, monitorace pacienta, personální zatížení). [76]

Insulin a A $\beta$  jsou 2 kompetitivní substráty insulin degradabilního enzymu (IDE), které jsou spojovány s rozvojem AD. IDE je spojen s odstraňováním A $\beta$ , vývoj aktivátorů IDE by proto mohl být jedním z možných lékových zásahů proti tomuto onemocnění. [21]

#### 3.1.8.5 Terapie zaměřená na $\tau$ -protein

Terapie se snaží modulovat fosforylaci  $\tau$ -proteinu a bránit tak jeho agregaci. Glykogensyntasa-kinasa 3 (GSK-3) je zodpovědná za fosforylaci, a tedy inaktivaci glykogensynthasy, kontrolu metabolismu glykogenu, regulaci buněčné proliferace a buněčného cyklu. Aktivace GSK-3 způsobuje hyperfosforylaci  $\tau$ -proteinu, která vede k agregaci  $\tau$ -proteinu a tvorbě neurofibrilárních klubíček [78]. Prvním GSK-3 inhibítorem bylo lithium, u kterého ale nebyl prokázán jeho účinek na kognici [65].

### 3.1.8.6 Serotonergní látky

U pacientů s pokročilou formou AD mohou být zapotřebí vyšší dávky inhibitorů AChE, tato strategie je ale omezena zvýšenými nežádoucími účinky v důsledku periferních cholinergních účinků (např. nevolnost, zvracení a průjem). Proto se zkoumá možnost kombinace antagonisty 5-HT<sub>6</sub> receptorů a inhibitorů AChE pro usnadnění centrálního cholinergního přenosu, což dále zvyšuje kognitivní zpracování a výkonnost, ale bez vyvolání periferních cholinergních vedlejších účinků. [79]

Serotoninové 5-HT<sub>6</sub> receptory jsou odpovědné za kognitivní procesy a paměť. Blokáda těchto receptorů zvyšuje uvolňování ACh a zlepšuje tak cholinergní transmissi. [65]

Idalopirdin je nový selektivní antagonist 5-HT<sub>6</sub> receptorů, který je testován v kombinaci s donepezilem. Klinické studie ale neprokázaly žádný příznivý účinek idalopirdinu jako doplňkového léku při léčbě donepezilem. [79]

### 3.1.8.7 Agonisté nikotinových receptorů

Centrální cholinergní systém hraje důležitou roli v kognitivních funkcích, výsledky studií naznačují, že nikotinové receptory jsou zapojeny do patofyziologie AD. Zkoušen byl například vareniklin, agonista nikotinových receptorů a látka používaná k odvykání kouření. Studie ovšem neprokázaly pozitivní efekt na kognitivní funkce. [80]

### 3.1.8.8 Antagonisté receptorů pro konečné produkty pokročilé glykace

Koncové produkty pokročilé glykace (AGEs) po vazbě na své buněčné receptory (rAGEs) mohou vést k chronickému oxidačnímu stresu a zánětu [65]. Na tyto receptory je schopen se vázat také A $\beta$  [81]. Azeliragon působí jako antagonist rAGEs, jehož účinnost potvrdily klinické studie [81,82].

### 3.1.8.9 Léčiva interagující s mitochondriálními enzymy

Několik mitochondriálních proteinů interaguje přímo s A $\beta$ , což pravděpodobně ovlivňuje mitochondriální metabolismus. Jedním takovým proteinem je enzym amyloid vázající alkoholdehydrogenasa (ABAD), známý také jako 17 $\beta$ -hydroxysteroidní dehydrogenasa typu 10 (HSD10). Fyziologickou funkcí ABAD je získávání energie  $\beta$ -oxidací mastných kyselin, pokud jsou nízké hladiny glukosy nebo pokud je metabolismus glukosy výrazně snížen. ABAD má poměrně malou substrátovou specifitu a experimentálně pro něj bylo popsáno mnoho potenciálních substrátů. [83–85]

Způsob, kterým A $\beta$  po navázání na ABAD způsobuje svou neurotoxicitu není zcela objasněn, ale existuje zde několik teorií. První teorie předpokládá, že ABAD po navázání na A $\beta$  produkuje toxické aldehydy 4-hydroxynonenal (HNE) a malondialdehyd (MDA), které za normálních podmínek naopak detoxikuje. Další teorie předpokládá, ABAD po interakci s A $\beta$  ve zvýšené míře metabolizuje hormon estradiol, který působí protektivně vůči toxickým účinkům A $\beta$ . Toxicita interakce ABAD s A $\beta$  může být také zprostředkována proteinem endofilinem I (EP-I), a který má v důsledku této interakce zvýšenou expresi. EP-I aktivuje enzym JNK (c-Jun *N*-terminální kinasa), který je součástí proapoptotické signální kaskády, což může vést k zániku buňky. [83]

Možné přístupy k léčbě AD představují jak přímá inhibice ABAD enzymu, tak narušení interakce A $\beta$  s ABAD.

#### **3.1.8.10 Neurotropní faktory, neutrofiny**

Do skupiny neurotropních faktorů označované také jako neutrofiny, patří nervový růstový faktor (NGF), neurotrofický faktor odvozený z mozku (BDNF), neurotrofin-3 (NT-3), NT-4/5 a NT-6. Tyto proteiny ovlivňují přežití a proliferaci vybraných neuronů v centrálním a periferním nervovém systému. [86]

Je popsána souvislost mezi dysbalancí NGF a neurodegenerací u AD, v mozcích pacientů byly zjištěny snížené koncentrace BDNF. [63]

#### **3.1.8.11 Látky ovlivňující zánětlivé procesy**

K léčbě AD byly zkoušeny i deriváty NSAID. Testovány byly např. naproxen, lornoxikam, rofekoxib, tarenflurbil, ovšem studie skončily negativním výsledkem – nebylo prokázáno významné zlepšení paměti, kognitivních funkcí či schopnosti vykonávat běžné denní aktivity. [65,87,88]

#### **3.1.8.12 Statiny**

Některé studie prokázaly vliv statinů (inhibitory 3-hydroxy-3-methylglutaryl-koenzym A reduktasy) ve snížení incidence AD a redukce neuropatologických změn [89–92].

## 3.2 *Vinca minor*

**Český název:** Barvínek menší, Brčál menší

### 3.2.1 Taxonomické zařazení

Říše: Plantae

Oddělení: Magnoliophyta

Třída: Rosopsida

Řád: Gentianales

Čeleď: Apocynaceae

Rod: *Vinca*

Druh: *Vinca minor* L. [94]



Obrázek 11: *Vinca minor* L. [95]



© Lubomír Opletal

Obrázek 12: *Vinca minor* L. květ [95]



© Lubomír Opletal

Obrázek 13: *Vinca minor* L. list [95]



### 3.2.2 Botanická charakteristika

*Vinca minor* L. je plazivá vytrvalá bylina s poléhavými na bázi dřevnatíci lodyhami s kožovitými stálezelenými elipsovými až kopinatými vstřícnými listy. Nekvetoucí stonky jsou plazivé, kvetoucí stonky vystoupavé. Jednotlivé květy vyrůstají z úžlabí listů na dlouhé stopce. Pětídílný kalich přechází v pětícípou doleva stočenou korunu. Korunní lístky jsou modré, někdy přecházejí do růžova, mohou být i bílé. Kvete v dubnu až červnu. Oddenek je plazivý, plodem jsou měchýřky. Drogou je nať, která se sbírá před rozkvetem. [93,96–98]

V České republice se můžeme setkat s *V. minor*, který díky častému vysazování na zahradách a hřbitovech často zplaňuje. Ve volné přírodě je poměrně vzácný, a je proto i chráněný. [93,96]

### 3.2.3 Využití v lidovém léčitelství

V našem prostředí je *V. minor* považován za jedovatou rostlinu, a proto se od jeho užívání v lidovém léčitelství ustupuje [93].

Léčba barvínkem se využívá především kvůli jeho vlivu na kardiovaskulární systém – snižuje krevní tlak, zlepšuje prokrvení srdečního svalu při ischemii, působí mírně močopudně, snižuje hladinu krevního cukru. Využívá se také jako adstringens, zejména při krvácení z nosu, kdy se jeden lístek barvínku pokrčí, stočí do roličky a vloží se do krvácející nosní dírky. [96]

### 3.2.4 Obsahové látky

*V. minor* a ostatní rostliny z čeledi Apocynaceae jsou bohatým zdrojem indolových alkaloidů (0,3 - 1 %), vedlejšími látkami jsou flavonoidní glykosidy a třísloviny. Z *V. minor* bylo dosud izolováno přes 45 alkaloidů. [99]

#### 3.2.4.1 Indolové alkaloidy

Biosyntéza indolových alkaloidů vychází z aminokyseliny tryptofanu. Rozlišujeme 5 typů: ergotové, pyrroloindolové, chinolinové, jednoduché indolové, jednoduché  $\beta$ -karbolinové a terpenové. Vinca alkaloidy patří mezi terpenové alkaloidy.

#### 3.2.4.2 Vinca alkaloidy

Jako Vinca alkaloidy označujeme alkaloidy rodu *Vinca*, jedná se o jednu z nejvýznamnějších skupin terpenových alkaloidů. Z chemického hlediska se jedná o dimery s indolovým

a dihydroindolovým seskupením. Dále je dělíme na eburnaminový, ajmalinový, sarpaginový, akuamminový a oxindolový typ.

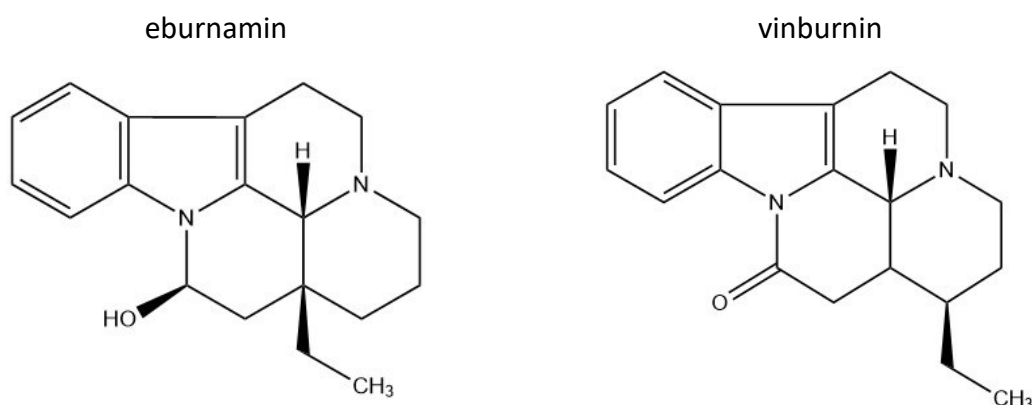
### 3.2.4.2.1 EBURNAMINOVÝ TYP

Základní skelet tvořen tetrahydrofuranovým kruhem s (20*R*, 21*R*) [(20*β*, 21*β*)] konfigurací nazýváme eburnan. Enantiomerem tj. optickým antipodem s konfigurací (20*S*, 21*S*) [(20*α*, 21*α*)] eburnanu je vinkan. [100]

Alkaloidy eburnaminového typu byly poprvé izolovány z barvínku menšího Zabolatnayaou a nezávisle i Schlittlerem a Furlenmejerem. První farmakologické studie byly provedeny Raymondem-Hametem a Quevauvillerem, kteří popsali příznivý vliv vinkaminu na cirkulaci snížením krevního tlaku, srdečního výdeje a srdečního tepu. Při podávání vinkaminu pacientům stěžujícím si na závratě, bolesti či motání hlavy došlo k ústupu těchto potíží, což je vysvětlováno rozšířením mozkových cév. [100]

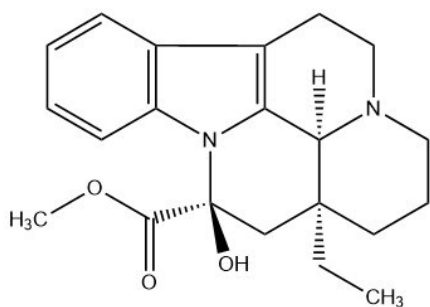
Do této skupiny patří: eburnamin, vinkamin, epivinkamin, apovinkamin, deoxyvinkamin, vinkaminol, epivinkaminol, vinpocetin, vindeburnol, vinburnin (L-eburnamonin), eburnamenin. [100,101]

Tabulka 1: Alkaloidy eburnaminového typu

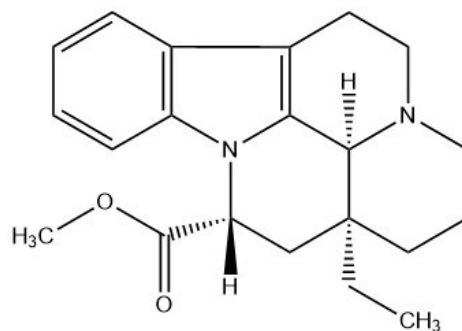


Tabulka 1: Alkaloidy eburnaminového typu (pokračování).

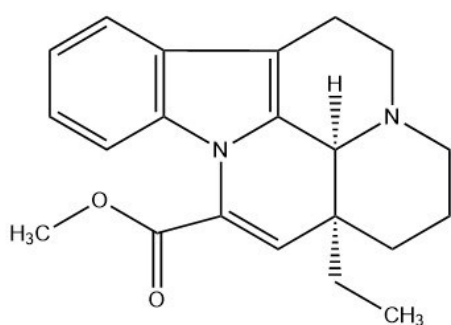
vinkamin



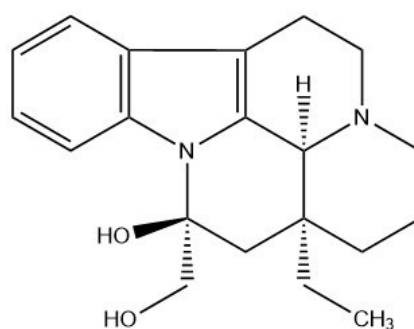
deoxyvinkamin



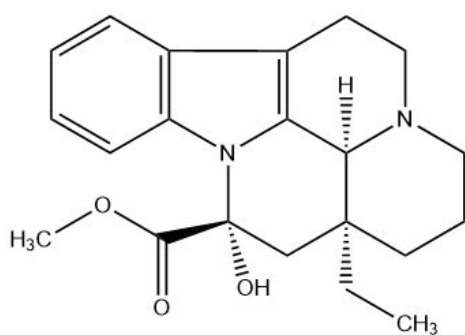
apovinkamin



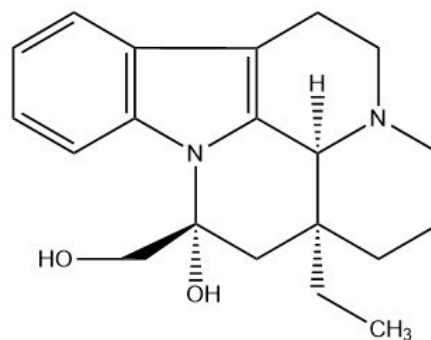
vinkaminol



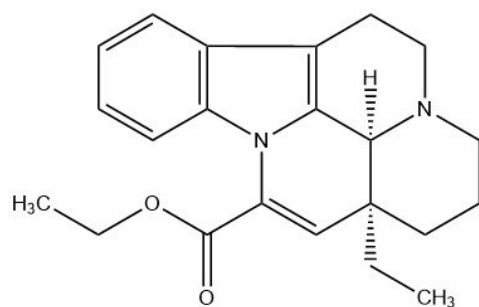
epivinkamin



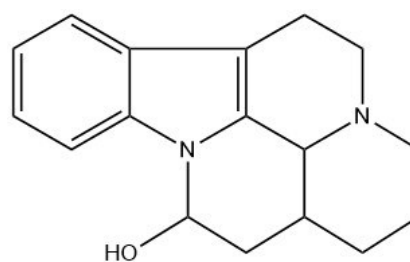
epivinkaminol



vinpocetin



vindeburnol

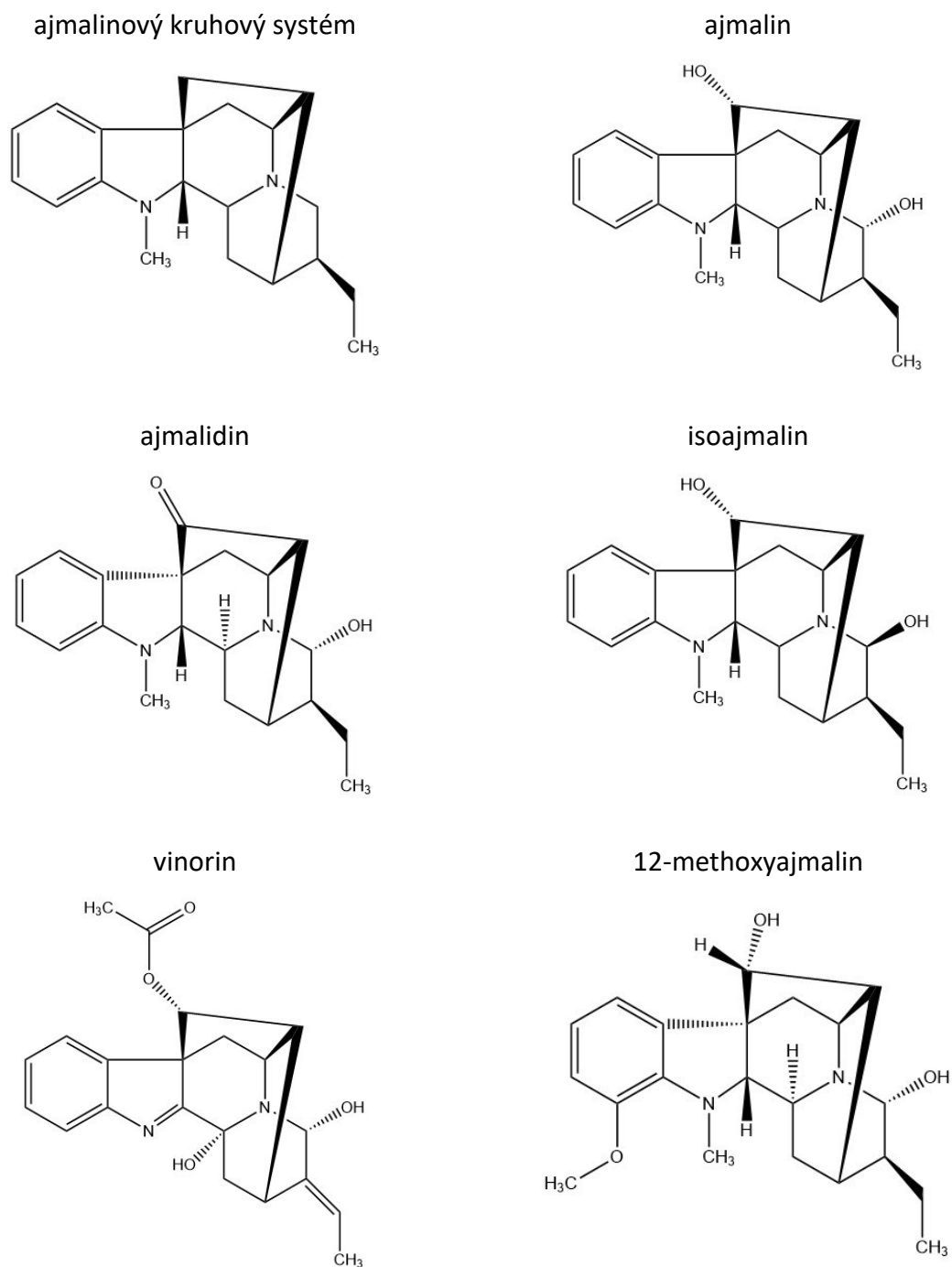


### 3.2.4.2 AJMALINOVÝ TYP

Ajmalinové alkaloidy obsahují polycyklický ajmalinový kruhový systém. Ajmalinový typ Vinca alkaloidů se vyskytuje v čeledi Apocynaceae. Nejhojněji se vyskytují v rodu Rauwolfia, ale najdeme je i v dalších rodech. [102]

Řadíme sem například: ajmalidin, ajmalin, isoajmalin, vinorin, vincamajorein, 12-methoxyajmalin a další. [102]

Tabulka 2: Alkaloidy ajmalinového typu

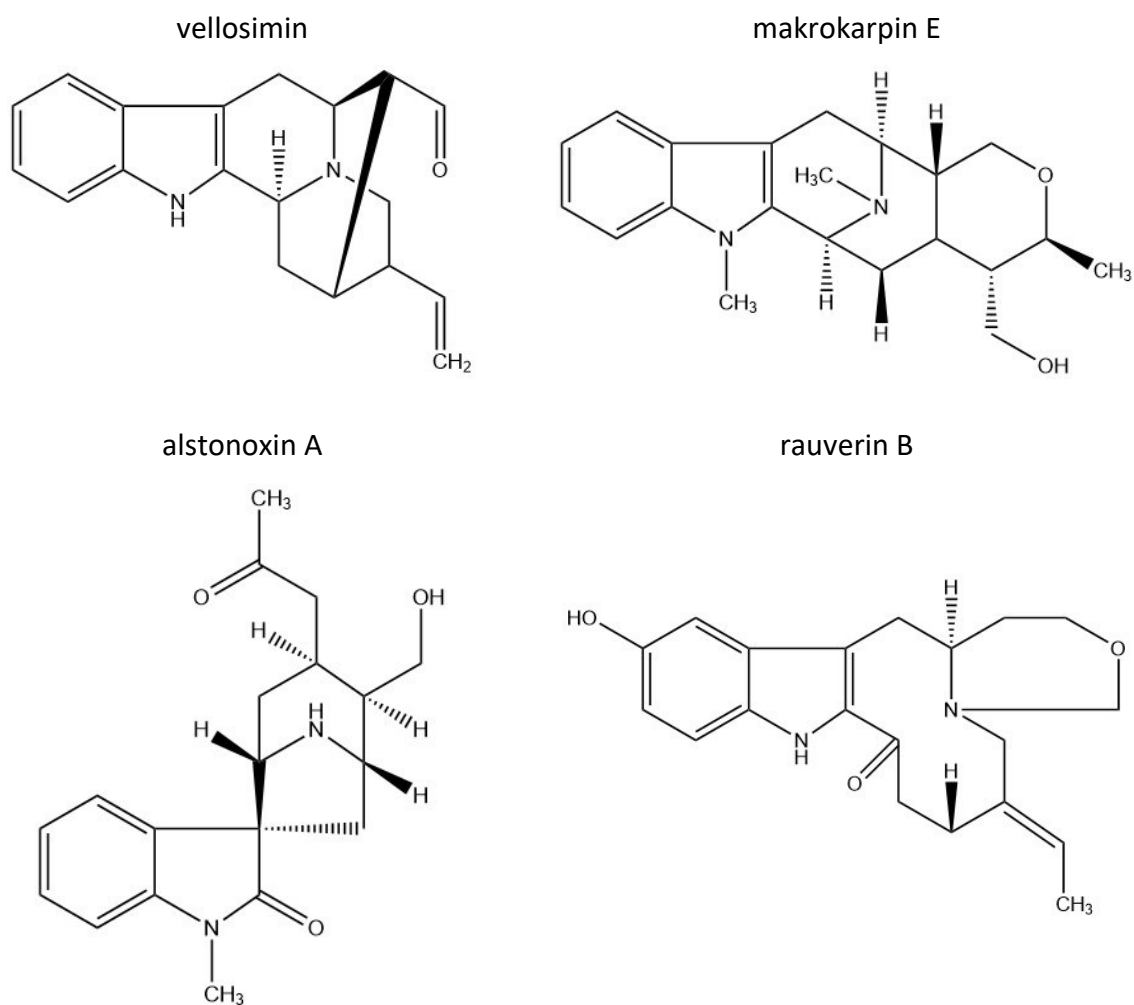


### 3.2.4.2.3 SARPAGINOVÝ TYP

Sarpaginové alkaloidy jsou strukturně podobné ajmalinovému typu alkaloidů. V současnosti do této skupiny řadíme více než 200 látek, z nichž 120 látek jsou monomerní indoly, zbytek pak tvoří bisindolové alkaloidy. Indolové alkaloidy sarpaginového typu jsou rozšířeny ve 25 druzích rostlin, především čeledi Apocynaceae. [103]

Do této skupiny řadíme: vellosimin, makrokarpin E, alstonoxin A, rauverin B a další [103].

Tabulka 3: Alkaloidy sarpaginového typu

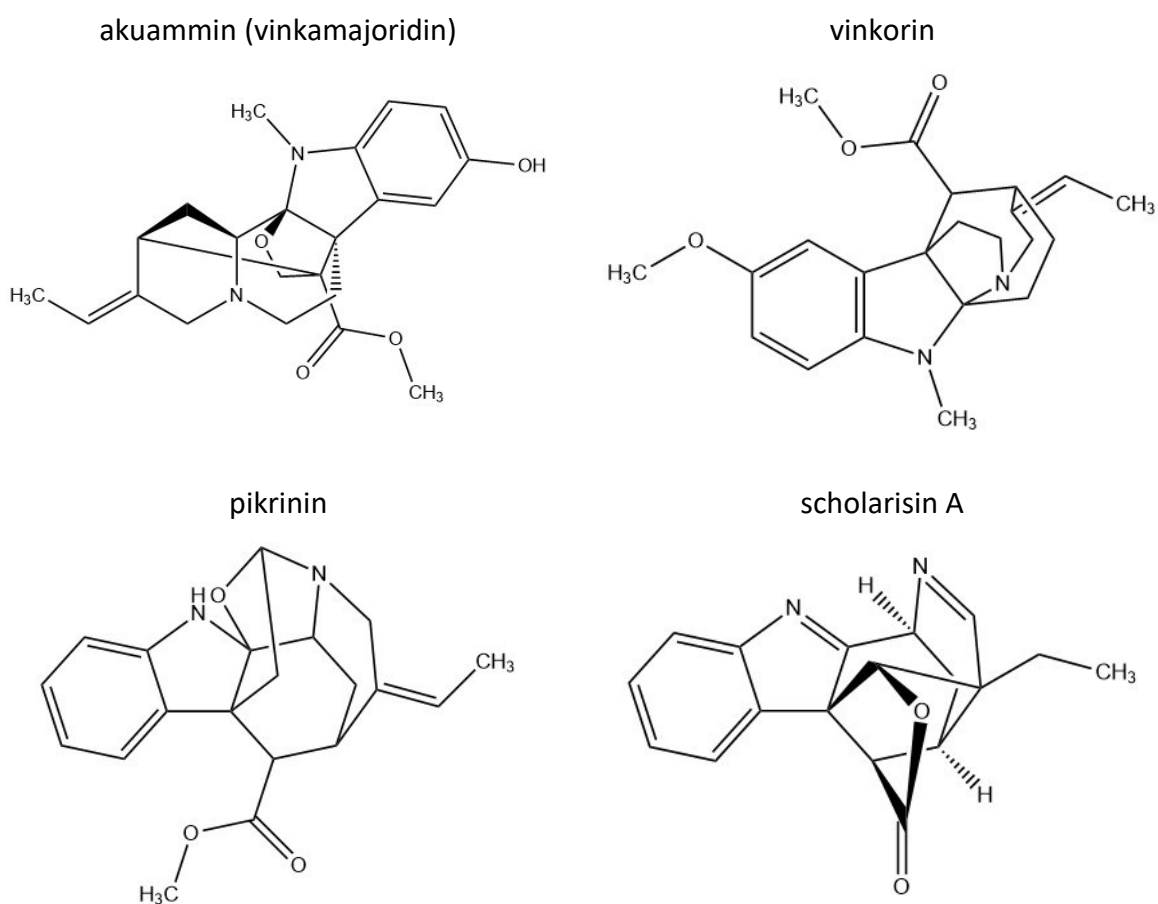


### 3.2.4.2.4 AKUAMMINOVÝ TYP

Akuammin, izolovaný ze semen *Picralima nitida* (Apocynaceae), byl popsán jako 5-hydroxy-*N*-methylindolin se sumárním vzorcem  $C_{22}H_{26}O_4N_2$  [104]. Později byl izolován vinkamajoridin z rostliny *Vinca major* a byl také popisován jako 5-hydroxy-*N*-methylindolin o stejném sumárním vzorci. Následné důkazové reakce potvrdily, že se jedná o jednu a tu samou látku. [105]

Do této skupiny můžeme kromě akuamminu zařadit také vinkorin, pikrinin, scholarisin A a další. [106]

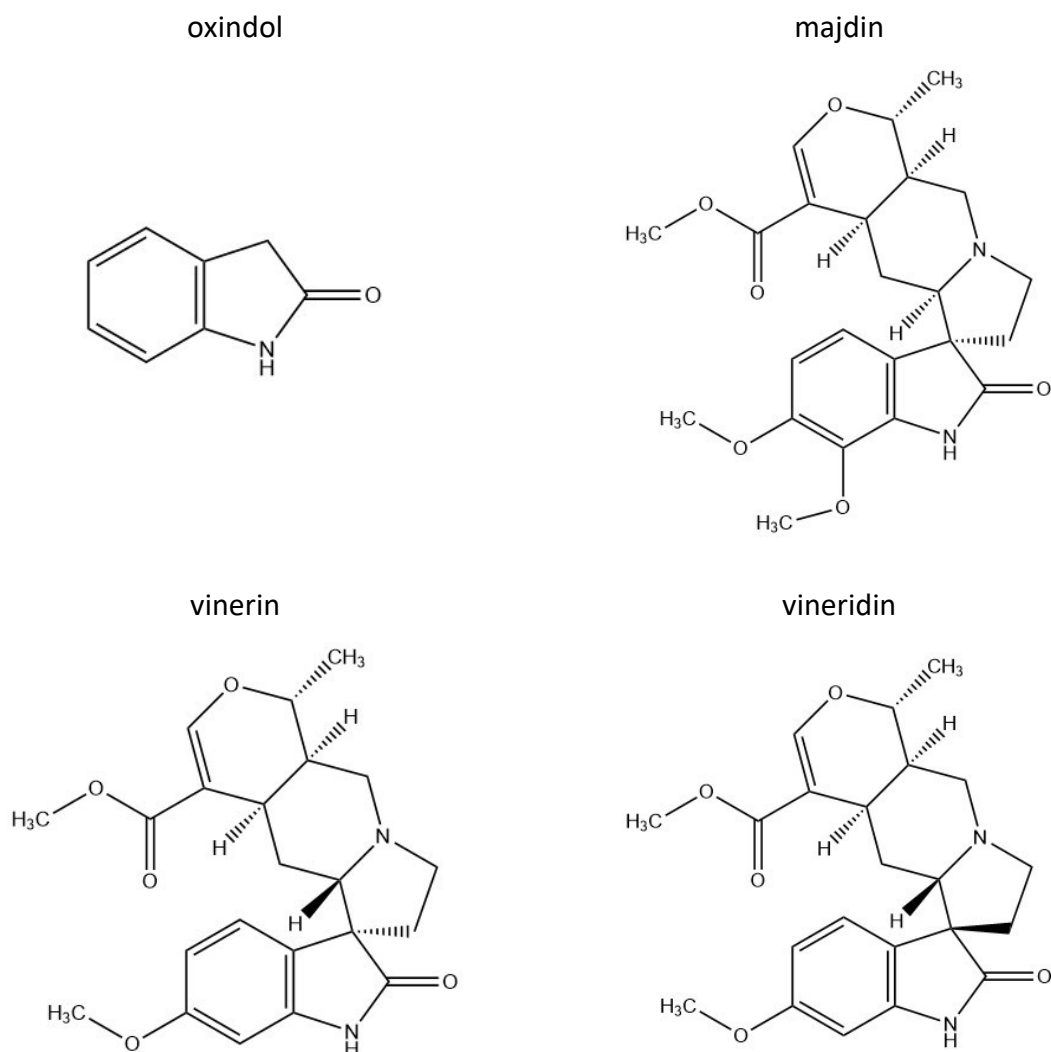
Tabulka 4: Alkaloidy akuamminového typu



### 3.2.4.2.5 OXINDOLOVÝ TYP

Do skupiny oxindolového typu patří isomajdin, majdin, herbalin, hervin [107–109], a ve své struktuře obsahují oxindol. Oxindol je složen z benzenového jádra, na které je připojen pyrrolidin, vzniká tak 2,3-dihydroindol, který v poloze 2 obsahuje oxoskupinu [110].

Tabulka 5: Alkaloidy oxindolového typu



## 3.2.5 Aktivita alkaloidů v rodu Vinca

### VINKAMIN

U vinkaminu byl prokázán vliv na oběhový systém, konkrétně alkaloid snižuje krevní tlak a ovlivňuje srdeční výdej a tep [111,112]. Studie popisují pozitivní účinek vinkaminu v léčbě mozkové ischemie a hypoxie díky jeho vazodilatačnímu působení na mozkové cévy, čímž zlepšuje prokrvení mozku. Má vliv na produkci ATP a efektivní využití glukosy a kyslíku

[113,114]. Vinkamin může zlepšit dopaminergní, serotoninergní a noradrenergní funkce a má také neuroprotektivní účinek daný pravděpodobně svou antioxidační aktivitou [9].

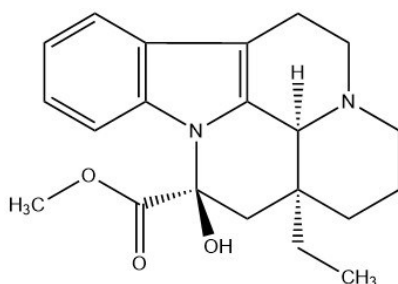
Neurodegenerativní nemoci spojené se stárnutím jsou charakterizovány nerovnováhou stopových prvků v mozku. Železo je potřebné pro normální neuronální funkce (role v oxidativním metabolismu, biosyntéze neurotransmiterů a tvorbě myelinu). Koncentrace tohoto prvku se zvyšuje s pokročilým věkem a při neurodegenerativním onemocnění, u kterých zprostředkovává oxidační poškození a buněčnou smrt [115]. Bylo prokázáno snížení koncentrace železa v mozku po použití vinkaminu [9].

Na základě předchozích klinických studií zaměřujících se na léčbu závratí a zvonění v uších vinkaminem, a které naznačují pozitivní vliv vinkaminu na střední ucho, je předpokládán a zkoumán také vliv vinkaminu na kochleární funkce poškozené Meniérovou chorobou. [116]

Vinkamin vykazuje silnou antioxidační aktivitu a snižuje hladiny ROS. Také vykazuje protizánětlivý účinek snížením exprese IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ . [117]

Vinkamin a jeho syntetické deriváty mohou také působit jako blokátory napěťově řízených Na<sup>+</sup> kanálů v mozku, proto byla zkoumána také možnost jejich využití jako potenciálních antikonvulsiv. [118]

Byla zkoumána i antidiabetická a antihyperlipidemická aktivita vinkaminu. Studie na diabetických myších potvrdila pozitivní účinek vinkaminu. Tento účinek byl dokonce srovnatelný s účinkem glibenklamidu. [119]



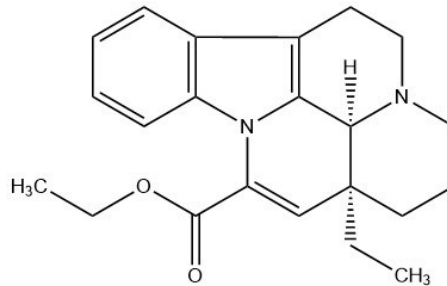
Obrázek 14: vinkamin

## VINPOCETIN

Tento syntetický derivát přírodního alkaloidu vinkaminu, zvyšuje průtok a mikrocirkulaci krve v mozku zlepšením plasticity erytrocytů, snížením cerebrálního vaskulárního odporu a inhibicí agregace trombocytů. Zvýšením účinku adenosinu může také neurony chránit před rozvojem hypoxie, neovlivňuje však periferní průtok. Stimuluje cerebrální metabolismus, zlepšuje



utilizaci kyslíku a glukózy. Vede ke zvýšení dostupnosti dopaminu a noradrenalinu v CNS a celkově zvyšuje obrat mozkových katecholaminů. V Evropě má charakter léčiva, zatímco v USA je dostupný jako doplněk stravy. [57,117,118]

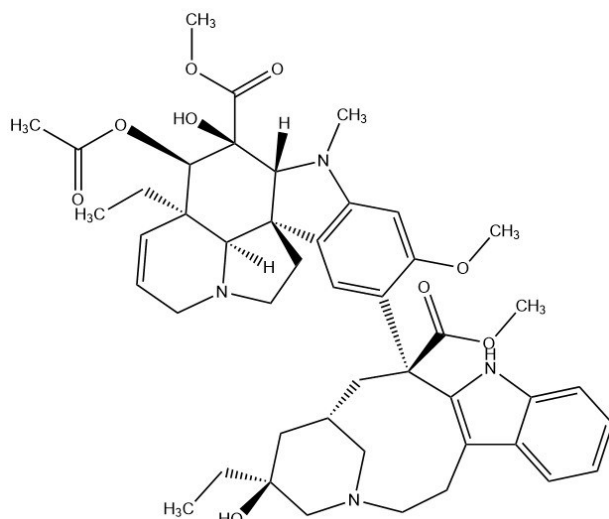


Obrázek 15: vinpocetin

### VINBLASTIN

Vinblastin spolu s vinkristinem patří mezi tzv. fázově specifická cytostatika – působí v M-fázi buněčného cyklu, ve které zastavuje buněčné dělení. Zastavují mitózu interakcí s mikrotubulárním systémem – blokují polymeraci mikrotubulárního proteinu a brání tak vzniku dělicího vřeténka. Toto narušení mitózy vede k aktivaci kontrolních bodů mitotického vřeténka, k zástavě mitózy a případně až k mitotické buněčné smrti, a to především rychle dělících se nádorových buněk. Nicméně i tak se projeví nežádoucí účinky zahrnující neurotoxicitu (periferní neuropatie, zastřené vidění, bolesti hlavy, poruchy nervosvalového přenosu...), hyperurikémie, útlum krvevorbny (leukopenie, trombocytopenie, anémie) či zvýšený výskyt infekčních onemocnění. Indikací jsou hodgkinské i nehodgkinské lymfomy, histiocytóza X a testikulární karcinomy [54].

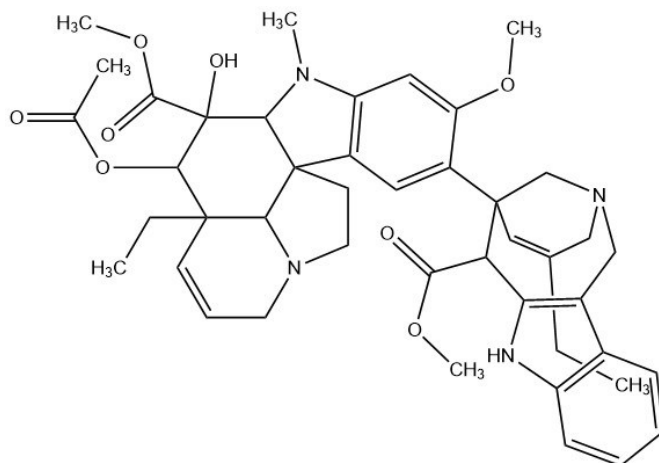
Právě množství nežádoucích účinků vede k terapeutickému využití polosyntetických derivátů jako je např. vinorelbin.



Obrázek 16: vinblastin

### VINORELBIN

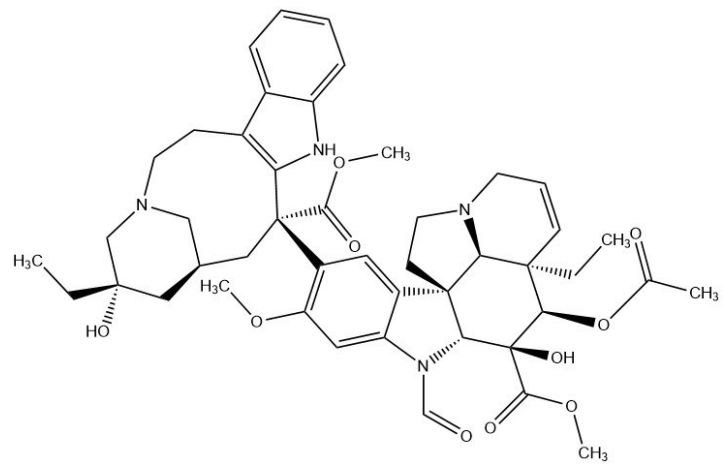
Vinorelbin je derivát vinblastinu s modifikovanou základní strukturou, ovšem s vlastnostmi vinkristinu. Nepůsobí na mikrotubuly axonální, ale převážně na mikrotubuly buněčné, díky čemuž je méně neurotoxický. Jeho indikací je nemalobuněčný bronchogenní karcinom, pokročilý karcinom prsu, karcinom prostaty (po selhání hormonální terapie).



Obrázek 17: vinorelbin

### VINKRISTIN

Odlišností vinkristinu je, kromě chemické struktury, širší spektrum účinnosti. Mezi jeho indikace patří akutní lymfoblastická leukémie, hodgkinské i nehodgkinské lymfomy, neuroblastom, Wilmsův tumor, mnohočetný myelom, rabdomyosarkom, meduloblastom a Ewingův sarkom. [54]



Obrázek 18: vinkristin

## 4 Experimentální část

### 4.1 Materiál a rozpouštědla pro izolaci alkaloidů

#### 4.1.1 Rozpouštědla

- aceton p. a. (Ing. Petr Švec – Penta) ( $\text{CH}_3\text{COCH}_3$ )
- benzín lékařský lékopisné kvality ČL 2017 (Ing. Petr Švec – Penta) (Bz)
- cyklohexan p. a. (Ing. Petr Švec – Penta) (CHx)
- diethylamin p. a. (Lach-Ner, Fisher Scientific) (DEA)
- diethylether p. a. (Lach-Ner) ( $\text{Et}_2\text{O}$ )
- dichlormethan p. a. (Ing. Petr Švec – Penta) (DCM)
- ethylacetát p. a. (Ing. Petr Švec – Penta) (EtOAc)
- chloroform p. a. (Ing. Petr Švec – Penta) ( $\text{CHCl}_3$ )
- methanol p. a. (Ing. Petr Švec – Penta) (MeOH)
- n-hexan p. a. (Ing. Petr Švec – Penta) (*n*-Hx)
- toluen p. a. (Ing. Petr Švec – Penta) (To)

#### 4.1.2 Chemikálie a pomocné látky

- hydroxid amonný 25% p. a. (Lachema) ( $\text{NH}_4\text{OH}$ )
- kyselina chlorovodíková 35% p. a. (Lachema) (HCl)
- křemelina Celite 535 John's Manville (Sigma-Aldrich)
- uhličitan sodný bezvodý p. a. (Ing. Petr Švec – Penta) ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )

#### 4.1.3 Detekční činidla

Dragendorffovo činidlo – vzniká smícháním roztoku A a roztoku B v poměru 1:1.

Roztok A vzniká rozpuštěním 20 g kyseliny vinné a 1,7 g dusičnanu bismutitého zásaditého v 80 ml vody. Roztok B vzniká rozpuštěním 16 g jodidu draselného ve 40 ml vody. Detekční roztok se vytvoří smísením 5 ml zásobního roztoku (roztok A+B) s roztokem 10 g kyseliny vinné v 50 ml vody.

Mayerovo činidlo vzniklo rozpuštěním 5 g KI ve 30 ml vody a přidáním 1,35 g  $\text{HgCl}_2$  v prášku. Bylo mícháno do rozpuštění vzniklé sraženiny. Činidlo bylo uchováváno v lednici při 2–8 °C.

#### 4.1.4 Vytvářecí soustavy pro TLC

- DCM + MeOH + NH<sub>4</sub>OH (95:5:0,1)
- CHX + CH<sub>3</sub>COCH<sub>3</sub> + NH<sub>4</sub>OH (70:30:0,2)
- CHX + CH<sub>3</sub>COCH<sub>3</sub> + NH<sub>4</sub>OH (40:60:2)
- *n*-Hx + CH<sub>3</sub>COCH<sub>3</sub> + NH<sub>4</sub>OH (60:40:0,2)

#### 4.1.5 Adsorbenty a materiál pro chromatografii

- neutrální oxid hlinitý HPLC Flash grade 32–63 μm (Alfa Aesar, Fisher Scientific)
- neutrální Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> Across 50–200 μm (deaktivovaný 6 % vody)
- silikagel 60 40–63 μm (Merck Millipore)
- komerční TLC hliníkové desky silikagel 60 F254, tloušťka vrstvy adsorbentu 0,2 mm (Merck Millipore)
- polypropylenové (PP) kartridže 40 × 150 mm (Büchi, Švýcarsko)
- komerční PP Sepacore kartridž (Silikagel 40–63 μm, 120 g) (Büchi, Švýcarsko)
- skleněná předkolona 26 × 100 mm (Büchi, Švýcarsko)

#### 4.1.6 Použité přístroje

- vakuová odparka Rotavapor R-114 (Büchi, Švýcarsko)
- UHPLC systém UPLC I-Class (Waters, Millfor, USA) spojený s hmotnostním spektrometrem s vysokým rozlišením (HRMS) Synapt G2-Si (Waters, Manchester, Velká Británie) založený na Q-TOF
- spektrometr VNMR S500 (Varian, USA)
- polarimetr Automatic P 3000
- Sepacore Flash X10 systém (Büchi, Švýcarsko)

### 4.2 Metody

#### 4.2.1 Obecné postupy

##### 4.2.1.1 Příprava a čištění rozpouštědel

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

#### 4.2.1.2 Odpařování rozpouštědel

Získané frakce nebo čisté látky rozpuštěné ve větších objemech rozpouštědel byly odpařovány za sníženého tlaku na vakuové odparce při teplotě do 40 °C. Vzorky rozpuštěné v několika málo ml ve skleněných vialkách byly zbavovány rozpouštědel odfukováním proudem vzduchu na vodní lázni při teplotě cca 60 °C. Finální dosušení bylo provedeno ve vakuovém exsikátoru za sníženého tlaku nad sušícími perlami ze silikagelu.

#### 4.2.1.3 Uchovávání vzorků

Získané odparky frakcí a vzorky alkaloidů byly v průběhu jejich zpracování uchovávány v chladničce při 2–8°C.

#### 4.2.1.4 Příprava desek pro preparativní TLC

Na skleněné desky 15 × 15 cm určené pro preparativní TLC byla nalita suspenze silikagelu (6,5 g silikagel + 20 ml vody) a rovnoměrně rozetřena. Poté se hotové desky sušily po dobu 24 hodin.

#### 4.2.1.5 Preparativní TLC chromatografie

Vzorky byly nanášeny na připravené skleněné nebo komerční hliníkové desky po rozpuštění tak, aby byl start nejméně 1 cm od okrajů, a aby množství směsi nepřesahovalo 3 mg.cm<sup>-1</sup> u skleněných laboratorně připravovaných preparativních desek a 1 mg.cm<sup>-1</sup> u komerčních hliníkových desek. Podle toho byl zvolen odpovídající počet desek. Po nanesení a odpaření rozpouštědel byly desky vyvíjeny v nasycených komorách (doba nasycení min. 20 min). Některé desky byly vyvíjeny opakovaně stejnou mobilní fází nebo i jinou, ale vždy až po odpaření rozpouštědel. Po vyvinutí byly chromatogramy detekovány pod UV ( $\lambda = 254$  a 366 nm), zóny byly označeny preparativní jehlou. Zóny o stejném retenčním faktoru (R<sub>f</sub>) ze všech použitých desek byly vyškrábány, smíchány se stejným objemovým množstvím křemeliny a v koloně eluovány MeOH.

#### 4.2.1.6 Detekce alkaloidů na chromatografických deskách

Pro detekci alkaloidů na TLC deskách byla použita UV lampa při vlnových délkách 254 a 366 nm. Přítomné alkaloidy, obsahující ve struktuře aromatický systém, se na desce pod UV zářením zbarví tmavě, případně fluorescencí. Dále byl proveden postřik Dragendorffovým činidlem, kdy se alkaloidní skvrny zbarví do oranžova až červeno-oranžové barvy.

Přítomnost alkaloidů ve vodné fázi byla zjišťována pomocí Mayerova činidla. Po okyselení vodné fáze obsahující alkaloidy zředěnou HCl na pH 2–3, bylo k roztoku přidáno několik kapek činidla. V případě přítomnosti alkaloidů vznikla v roztoku bílá sraženina.

#### 4.2.1.7 Flash chromatografie

Flash chromatografie byla provedena Sepacore Flash X10 systémem (Büchi), který se skládá ze dvou binárních pump C-605, UV detektoru C-640, frakčního kolektoru C-660 a řídicí jednotky C-60. Celý systém je ovládán PC, programem SepacoreControl 1.2.

První flash separace byla provedena na aktivním neutrálním oxidu hlinitém HPLC Flash grade 32–63  $\mu\text{m}$  (Alfa Aesar). Separovaná frakce byla rozpuštěna v DCM a MeOH a smíchána s 4násobným množstvím oxidu hlinitého. Odpařením rozpouštědel ze suspenze na vodní lázni za stálého míchání při teplotě 50 °C byl připraven roztěr. Před separací alkaloidů byla nejprve polypropylenová (PP) kartridž 40 × 150 mm, naplněná neutrálním oxidem hlinitým, kondicionována promytím mobilní fázi odpovídající 3 – 5násobku mrtvého objemu kolony. Následně byla před kartridž (kolonu) zapojená skleněná předkolona obsahující roztěr. Jednotlivé frakce byly jímány do 50 ml válců podle nastaveného objemu sběru. Průtok činil 30 ml/min. Vlnové délky UV detektoru byly nastaveny na 220, 254, 280 a 366 nm (vlnové délky byly nastaveny podle předchozího přeměření absorpčních spekter alkaloidů PDA detektorem, který je součástí LC-MS Waters systému).

Při druhé flash chromatografii byl použit silikagel 60 40–63  $\mu\text{m}$  (Merck Millipore). Jednotlivé frakce byly jímány do 50 ml válců podle nastaveného objemu sběru. Průtok činil 60 ml/min. Vlnové délky UV detektoru byly nastaveny 254, 280, 290 a 366 nm.

#### 4.2.1.8 LC-MS analýza

Vzorky (0,2–0,3 mg) byly rozpuštěny v 1 ml MeOH čistoty LC-MS a měřeny pomocí systému Waters Autopurification<sup>TM</sup> HPLC-MS (Milford, USA). Přístroj sestává z modulů Waters Sample Manager 2767, Systém fluidics Organizer, binární gradientové pumpy Waters 2545, Waters 2998 detektoru s diodovým polem a Waters Acquity qDa hmotnostního spektrometru. Vzorky byly analyzovány při laboratorní teplotě. Na separaci byla použita kolona s reverzní fází XSelect<sup>®</sup> CSH<sup>TM</sup> C18 OBD<sup>TM</sup> (100 mm × 4,6 mm i. d., 5  $\mu\text{m}$ ) (Milford, USA). Jako mobilní fáze byly použity voda s 0,1% kyselinou mravenčí (rozpouštědlo A) a MeOH s 0,1% kyselinou mravenčí (rozpouštědlo B). Průtok mobilní fáze byl 1 ml/min. Eluční program s gradientem byl

naprogramován následovně (v/v): 0 min 5% B, 5 min 100% B, 8,5 min 5% B, poté 1,5 minuty v počátečních podmínkách pro ekvilibraci. Optimální hodnoty parametrů ESI-MS byly: kapilární napětí – 0,8 kV; teplota próby – 600 °C; kuželové napětí – 15V. LC / MS hmotnostní spektra byla zaznamenána v rozmezí od 200–800 m/z. Pro detekci PDA byl rozsah detektoru nastaven od 190 do 700 nm. LC ESI-MS analýzy byly provedeny v pozitivním iontovém režimu. Eluce sloučenin nastává v pořadí od více polárních k méně polárním, s narůstající eluční silou mobilní fáze. V průběhu chromatografické analýzy zůstává koncentrace kyseliny mravenčí konstantní.

#### 4.2.1.9 NMR analýza

Pro měření NMR spekter byl použit spektrometr VNMR S500, měření probíhalo za teploty 25 °C. Přístroj pracoval při frekvenci 499,87 MHz pro jádra  $^1\text{H}$  a 125,70 MHz pro jádra  $^{13}\text{C}$ . Chemické posuny byly zaznamenávány jako hodnoty  $\delta$  vyjádřené v pars per milion (ppm) a byly vztaheny na hodnoty vnitřního standardu (TMS). Spektra byla měřena v různých prostředích. V  $\text{CDCl}_3$  byly hodnoty chemického posunu pro atomy  $^1\text{H}$   $\delta = 7,26$  ppm a pro  $^{13}\text{C}$   $\delta = 77,0$  ppm. V  $\text{CD}_3\text{OD}$  byly pro  $^1\text{H}$   $\delta = 3,30$  ppm a pro  $^{13}\text{C}$   $\delta = 49,0$  ppm. Naměřená data jsou ve výsledcích uváděna v pořadí: chemický posun ( $\delta$ ), integrovaná intenzita  $^1\text{H}$  NMR spekter, multiplicita (s = singlet, d = dublet, t = triplet, q = kvartet, dd = dublet dubletů, m = multiplet, bs = široký singlet) a interakční konstanta J (v Hz).

#### 4.2.1.10 Optická otáčivost

Optická otáčivost izolovaných sloučenin byla měřena v  $\text{CHCl}_3$  na polarimetru Automatic P 3000 při laboratorní teplotě 25° C.

### 4.3 Izolace alkaloidů

#### 4.3.1 Separace frakce VM 215–258 (20,75 g)

Cílem mé diplomové práce byla separace vybrané frakce VM 215–258, která byla získána separací sumárního alkaloidního extraktu, připravená Ing. Miroslavem Ločárkem během jeho doktorského studia. Popis přípravy alkaloidního výtřepku a jeho separace je popsána v diplomové práci Mgr. Anety Vítovcové. [120]

Vybraná frakce VM 215–258 byla před separací na Sepacore Flash systému přečištěna rozpuštěním v 5% HCl (200 ml), přefiltrována přes křemelinu a naředěna destilovanou vodou



na objem 500 ml. Okyselená vodná fáze byla následně vytřepávána 4× Et<sub>2</sub>O (150 ml). K vodné fázi byl nejprve přidán EtOAc (300 ml), následně byla provedená alkalizace vodné fáze 10% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> na pH 9–10 a extrakce alkaloidů byla provedena 4× EtOAc (300 ml). Jelikož ve vodné fázi zůstávaly alkaloidy (jejich přítomnost byla potvrzena slabým zákalem po přidání Mayerova činidla), vytřepávání pokračovalo CHCl<sub>3</sub> (8× 300 ml). Po extrakci CHCl<sub>3</sub> ve vodné fázi již nebyly alkaloidy přítomny. Spojené EtOAc a CHCl<sub>3</sub> výtřepky byly odpařeny dosucha za sníženého tlaku na vakuové odparce a celková hmotnost přečištěné frakce činila 10,9 g.

## 4.3.2 Flash chromatografie vybrané frakce VM 215–258

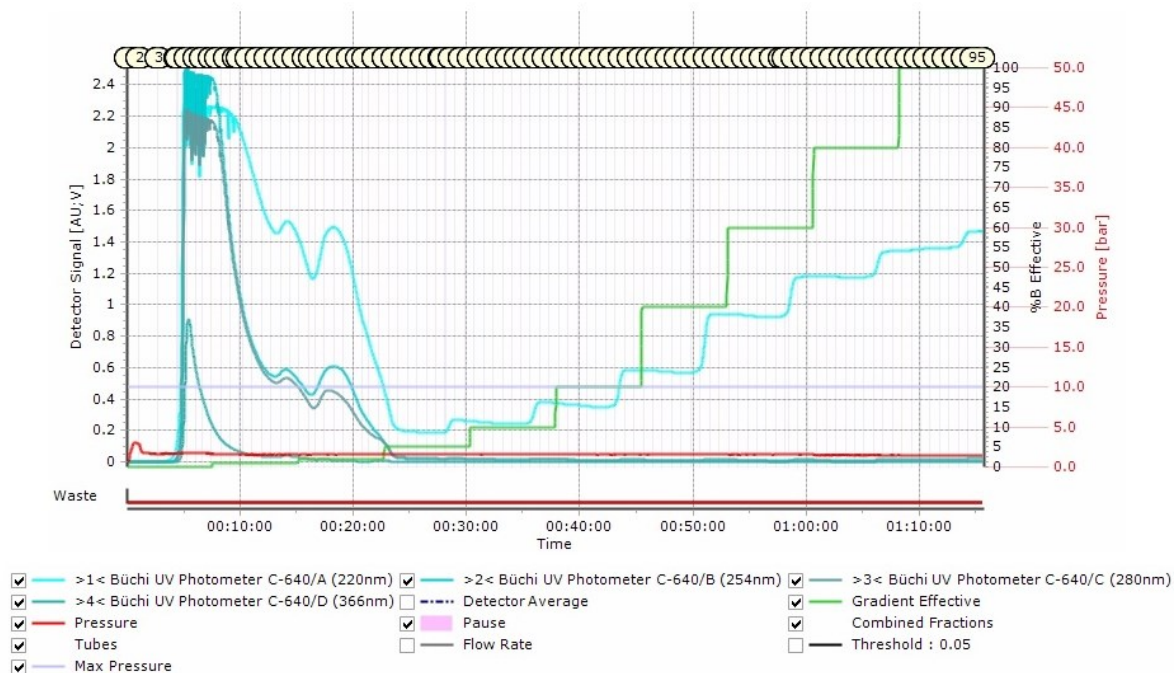
### 4.3.2.1 Separace na oxidu hlinitém

8,6 g alkaloidní frakce VM 215–258 bylo separováno flash chromatografií na neutrální Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> HPLC Flash grade 32–63 μm (210 g), který byl naplněn do PP kartridže (40 × 150 mm). Roztěr byl umístěn do skleněné předkolony (26 × 100 mm). Eluce alkaloidů z předkolony probíhala stupňovitou elucí ve dvou krocích (detail nastavení skokovité eluce – tabulka 6).

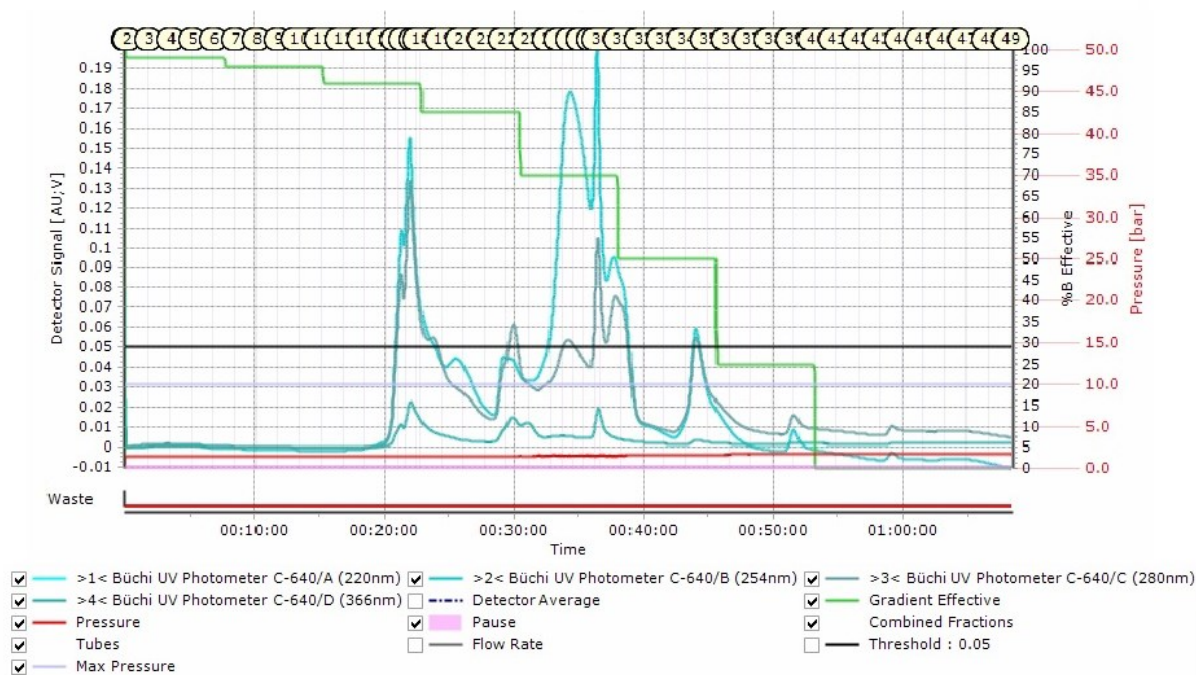
Tabulka 6: Detail nastavení stupňovité eluce provedené ve 2 navazujících krocích

1. krok eluce: DMC+EtOAc obsahující 0,25% DEA				2. krok eluce: MeOH + EtOAc obsahující 0,25% DEA			
Start % B	Konec % B	min	s	Start % B	Konec % B	min	s
0	0	7	30	100	100	0	5
0	1	0	5	100	98	0	5
1	1	7	30	98	98	7	30
1	2	0	5	98	96	0	5
2	2	7	30	96	96	7	30
2	5	0	5	96	92	0	5
5	5	7	30	92	92	7	30
5	10	0	5	92	85	0	5
10	10	7	30	85	85	7	30
10	20	0	5	85	70	0	5
20	20	7	30	70	70	7	30
20	40	0	5	70	50	0	5
40	40	7	30	50	50	7	30
40	60	0	5	50	25	0	5
60	60	7	30	25	25	7	30
60	80	0	5	25	0	0	5
80	80	7	30	0	0	7	30
80	100	0	5	Celkový čas: 01:00:45			
100	100	7	30				
Celkový čas: 01:15:45							

Jednotlivé frakce byly jímány frakčním kolektorem do zkumavek o objemu 50 ml. Separace frakce byla monitorována UV detektorem nastaveným na 4 příslušné vlnové délky a TLC na komerčních deskách silikagelu 60 F254 s vyvíjející soustavě CH<sub>x</sub> + CH<sub>3</sub>COCH<sub>3</sub> + NH<sub>4</sub>OH (40:60:2). Tímto způsobem bylo získáno 144 frakcí (obrázek 19, obrázek 20), eluáty s potenciálně stejným obsahem byly spojeny do celkem 15 frakcí (tabulka 7).



Obrázek 19: Flash chromatografie Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 1. část: A: DCM + DEA (100:0,25), směsi B: EtOAc + DEA (100:0,25)



Obrázek 20: Flash chromatografie Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 2. část: A: MeOH + DEA (100:0,25) a směsi B: EtOAc + DEA (100:0,25)

Tabulka 7: Podfrakce získané flash chromatografií frakce VM 215-258

číslo frakce	spojené frakce	odparek [mg]
1	4–21	7674
2	22–27	521,5
3	28–75	176,2
4	76–95	71
5	96–108	bez alkaloidů
6	109–114	136,6
7	115	29,9
8	116–119	157,1
9	120	62,4
10	121	33,7
11	122–123	31,5
12	124–128	376,8
13	129–132	464
14	133–139	362,3
15	140	230,3

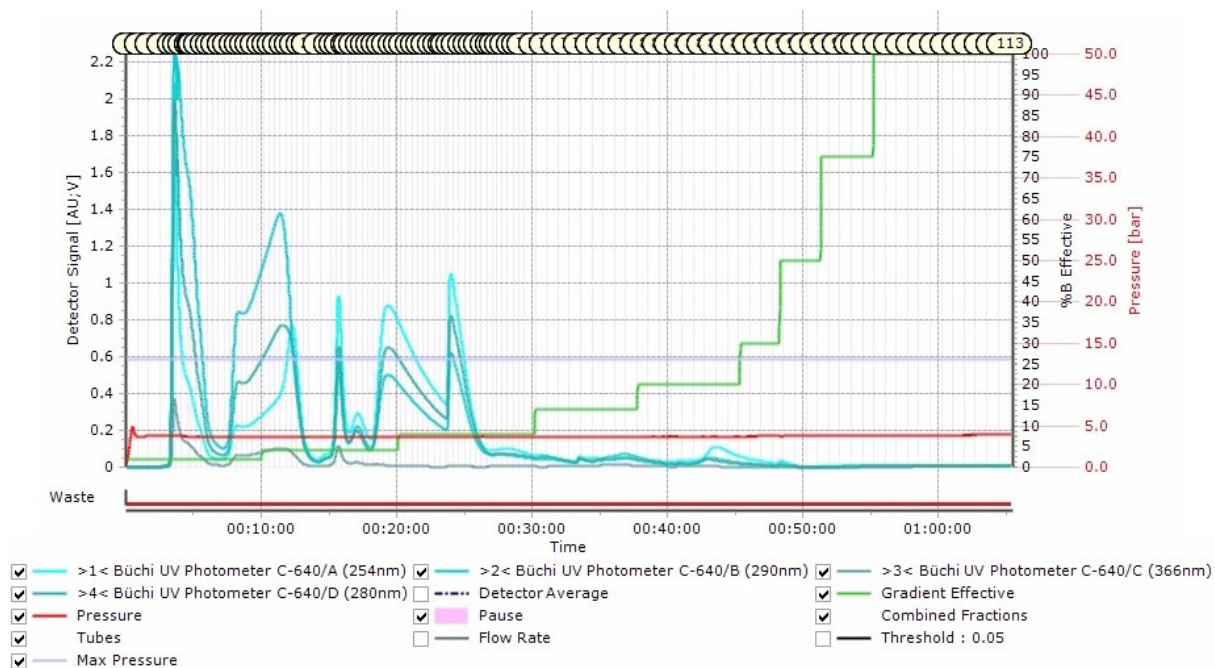
#### 4.3.2.2 Separace spojené frakce 4–21 (7,67 g) na silikagelu

Jelikož separace frakce VM 215–258 na oxidu hlinitém proběhla s nedostatečnou separací, byla spojená frakce 4–21 separována flash chromatografií na silikagelu 40–63  $\mu\text{m}$  (Sepacore kartridž hmotnost 120 g). Roztěr byl připraven rozpuštěním podfrakce v DCM a MeOH a přidáním silikagelu v poměru 2:1 ku váze frakce a odpařením rozpouštědel do sucha. Eluce alkaloidů z předkolony probíhala stupňovitou elucí za použití směsí mobilní fáze A: DCM a B: MeOH +  $\text{NH}_4\text{OH}$  (100:0,1). Detail nastavení eluce je popsán v tabulce 8.

Tabulka 8: Nastavení skokové eluce použitím mobilní fáze A (DCM) a B (MeOH + NH<sub>4</sub>OH (100:0,1)).

Start % B	Konec % B	min	s
2	2	10	0
2	4	0	5
4	4	10	0
4	8	0	5
8	8	10	0
8	14	0	5
14	14	10	0
14	20	0	5
20	20	10	0
20	30	0	5
30	30	10	0
30	50	0	5
50	50	10	0
50	75	0	5
75	75	10	0
75	100	0	5
100	100	10	0
Celkový čas: 01:18:10			

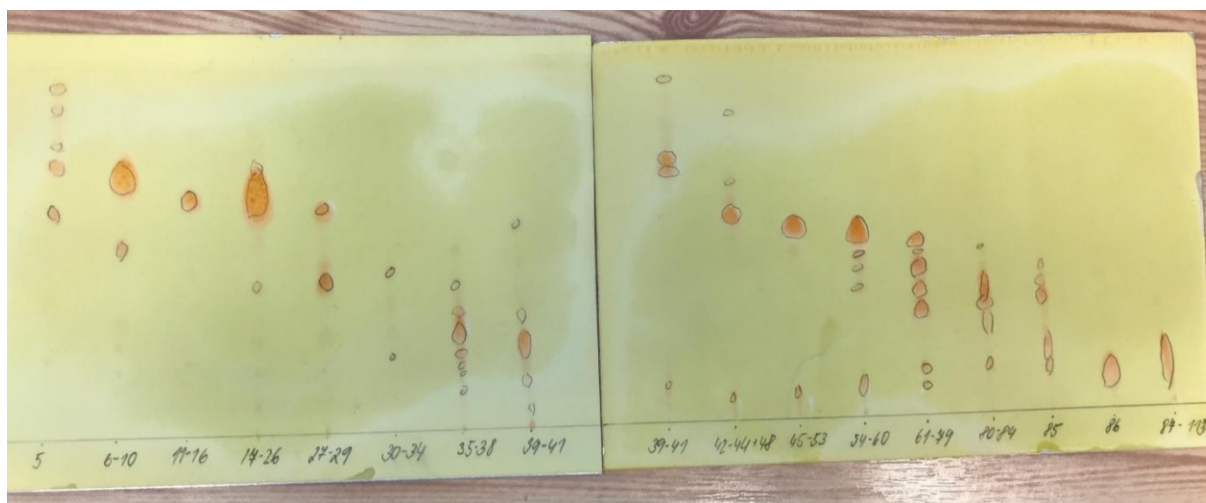
Frakce byly sbírané frakčním kolektorem na základě nastavení UV detektoru na příslušné vlnové délky a monitorovány a TLC na komerčních silikagelových deskách v soustavě DCM + MeOH + NH<sub>4</sub>OH (95:5:0,1). Bylo získáno 113 frakcí (obrázek 21), eluáty s obsahem potenciálně stejných alkaloidů byly spojeny do celkem 16 frakcí (obrázek 22, tabulka 9).



Obrázek 21: Flash chromatografie: silikagel, A: DCM, B: MeOH + NH<sub>4</sub>OH (100:0,1)

Tabulka 9: Podfrakce získané flash separací spojené frakce 4-21 na silikagelu

číslo frakce	spojené frakce	odparek [mg]
1	5	307,8
2	6–10	1192,2
3	11–16	157,4
4	17–26	1487,7
5	27–29	293,1
6	30–34	82,6
7	35–38	217
8	39–41	120,1
9	42–44 + 48	493,6
10	45–53	1064,3
11	54–60	803,6
12	31–79	479
13	80–84	80,4
14	85	18,4
15	86	43,7
16	87–113	168,5



Obrázek 22: souhrnný chromatogram ve směsi DCM + MeOH + NH<sub>4</sub>OH (95:5:0,1)

#### 4.3.2.2.1 Separace alkaloidů z vybraných podfrakcí ze spojené frakce 4-21

Pro další zpracování byly použity frakce č. 17–26, 27–29 a 45–53.

#### Separace alkaloidů z frakce 17–26

Frakce 17–26 (1,48 g) byla dělena na silikagelu na 30 litých deskách preparativní TLC 15×15 cm. Jako vyvíjecí směs byla použita soustava CH<sub>x</sub> + CH<sub>3</sub>COCH<sub>3</sub> + NH<sub>4</sub>OH (70:30:0,2), počet vyvíjení 1×. Celkem byly získány 3 zóny:

- 17–26/1 m = 79 mg (směs nejméně 3 látek); R<sub>f</sub> = 0,6
- 17–26/2 m = 784 mg (téměř čistá sloučenina); R<sub>f</sub> = 0,55
- 17–26/3 m = 223 (směs látek), R<sub>f</sub> = 0,30

Podfrakce 17–26/2 byla přečištěna ve směsi To + EtOAc (1:1) přes vrstvu neutrálního Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> Across 50–200 μm (deaktivovaný 6 % vody). Po odpaření byla frakce krystalizována za horka z To, získané nažloutlé krystaly byly promyty směsí Bz + To (9:1). Byla získána sloučenina označena jako **AV-1** (243 mg).

#### Separace alkaloidů z frakce 27–29

Frakce 27–29 (293 mg) byla separována na 6 litých deskách 15×15 cm na silikagelu. Jako vyvíjecí směs byla použita soustava *n*-Hx + CH<sub>3</sub>COCH<sub>3</sub> + NH<sub>4</sub>OH (60:40:0,2), počet vyvíjení 3×. Bylo získáno 5 zón:

- 27–29/1 m = 3,2 mg (směs látek, dále nepokračováno), R<sub>f</sub> = 0,75
- 27–29/2 m = 95 mg (směs látek, dále nepokračováno), R<sub>f</sub> = 0,63
- 27–29/3 m = 11,2 mg (směs látek, dále nepokračováno), R<sub>f</sub> = 0,55

- 27–29/4 m = 63 mg (téměř čistá sloučenina),  $R_f = 0,42$
- 27–29/5 m = 11mg (směs sloučenin, dále nepokračováno),  $R_f = 0,25$

Podfrakce 27–29/4 byla podrobena opakované preparativní TLC na 4 komerčních deskách se silikagelem, jako vyvíjecí směs byla použita soustava  $n\text{-Hx} + \text{CH}_3\text{COCH}_3 + \text{NH}_4\text{OH}$  (60:40:0,2), počet vyvíjení 3×. Byla získána oranžovohnědá čistá amorfní sloučenina **AV-3** (21,8 mg).

### Separace z frakce 45–53

Frakce 45–53 (1,04 g) byla podrobena krystalizaci z  $\text{Et}_2\text{O}$ , získané sněhově bílé krystaly, které byly promyty směsí 20%  $\text{Et}_2\text{O}$  v lékařském benzínu (destilační frakce benzínu o t. v. 40–60 °C). Celkově bylo získáno 134 mg krystalické sloučeniny **AV-2**.

## 4.4 Materiál a chemikálie pro stanovení cholinesterasové inhibiční aktivity izolovaných alkaloidů

### 4.4.1 Chemikálie pro stanovení inhibiční aktivity

- acetylthiocholin jodid 10mM roztok, Sigma-Aldrich
- butyrylthiocholin jodid 10mM roztok, Sigma-Aldrich
- dimethylsulfoxid pro biologické testy, Sigma-Aldrich (DMSO)
- galanthamin hydrobromid 95% (Changsha Organic Herb Inc., China)
- fysostigmin 99% (Sigma-Adrich)
- 5mM roztok 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina  $\geq 98\%$ , Sigma-Aldrich (DTNB)

### 4.4.2 Pufry

- fosfátový pufr 5mM, pH 7,4
- fosfátový pufr 5mM, pH 7,4 s obsahem 150 mM NaCl
- fosfátový pufr 100 mM, pH 7,4

### 4.4.3 Přístroje

- centrifuga Boeco U-32 R, Boeco, Germany a rotor Hettich 611, Hettich, Německo
- reader Synergy™ HT Multi-Detection Microplate Reader, BioTek, USA

### 4.4.4 Biologický materiál

Jako zdroj lidské AChE byl použit hemolyzát lidských erytrocytů a jako zdroj lidské BChE byla použita lidská plazma.

## 4.5 Stanovení inhibiční aktivity alkaloidů

### 4.5.1 Příprava plazmy a hemolyzátu

Hemolyzát a plazma byly získány z čerstvé krve, která byla odebrána a následně smíchána s citronanem sodným v poměru 1:9 (odpovídá 2 ml 3,4% citronanu na 18 ml krve) z důvodu zábrany koagulace. Následně byla krev rovnoměrně rozdělena do zkumavek. Byla provedena centrifugace rychlostí 4000 ot.min<sup>-1</sup> při teplotě 4 °C po dobu 10 min. Došlo k oddělení plazmy, která byla zdrojem BChE.



Z usazených erytrocytů se odsály zbytky plazmy a sediment byl zředěn 5mM fosfátovým pufrům o pH 7,4 s obsahem 150mM NaCl. Vzniklá suspenze byla dostatečně promíchána a rozdělena do zkumavek. Následně byla provedena jejich centrifugace za stejných podmínek. Erytrocyty byly promyty centrifugací celkem 3×, poté byla odstraněna promývací kapalina a byl přidán 5mM fosfátový pufr o pH 7,4 v poměru 1:9 (erytrocyty a fosfátový pufr). Tato směs byla převedena do Erlenmayerovy baňky a za stálého míchání na magnetické míchačce byla nechána hemolyzovat.

Po skončení procesu hemolýzy byla změřena aktivita hemolyzátu. Hodnoty absorbance AChE v hemolyzátu i BChE v plazmě byly upraveny pomocí 5mM fosfátového pufru podle potřeby. Hemolyzát i plazma, které byly získány, byly uchovávány při teplotě -22 °C.

#### 4.5.2 Stanovení cholinesterasové inhibiční aktivity

Hodnoty inhibiční aktivity byly stanoveny pomocí Ellmanovy spektrofotometrické metody s použitím DTNB. Metoda je založena na hydrolýze esterů thiocholinu cholinesterasou za vzniku thiocholinu a příslušné kyseliny. Thiolová skupina thiocholinu následně reaguje s DTNB za vzniku žlutého zbarvení (dochází ke vzniku 5-sulfanyl-2-nitrobenzoové kyseliny). Následně je sledován spektrofotometrickou metodou nárůst absorbance po dobu 1 min při vlnových délkách  $\lambda = 436$  nm pro AChE a  $\lambda = 412$  nm pro BChE.

Ke stanovení aktivity enzymů bylo pipetováno na mikrotitrační destičku 8,3  $\mu$ l hemolyzátu pro AChE, nebo 8,3  $\mu$ l krevní plazmy pro BChE. Následně bylo přidáno 283  $\mu$ l 5mM DTNB a 8,3  $\mu$ l DMSO. Směs byla důkladně promíchávána v mikrotřepačce po dobu 1 min a poté inkubována 5 min při 37 °C. Následně bylo přidáno 33,3  $\mu$ l roztoku 10nM acetylthiocholin jodidu nebo 10nM butyrylthiocholin jodidu jako substrátu a při vlnové délce  $\lambda = 436$  nm pro AChE a  $\lambda = 412$  nm pro BChE byla zjišťována hodnota absorbance.

Ke stanovení inhibiční aktivity izolovaných látek bylo pipetováno na mikrotitrační destičku 8,3  $\mu$ l hemolyzátu pro AChE, nebo 8,3  $\mu$ l krevní plazmy pro BChE. Následně bylo přidáno 283  $\mu$ l 5mM DTNB a 8,3  $\mu$ l roztoku látek s DMSO v sestupné koncentraci 40mM, 10mM, 4mM, 1mM a 0,4mM. Směs byla dostatečně promíchávána v mikrotřepačce po dobu 1 min a poté inkubována 5 min při 37 °C. Následně bylo přidáno 33,3  $\mu$ l roztoku 10mM acetylthiocholin jodidu, nebo 10mM butyrylthiocholin jodidu a hodnoty naměřené absorbance byly po 2 min odečteny.

Výpočet hodnot  $IC_{50}$  byl provedený v programu GraphPad Prism. Poté byly získané hodnoty porovnány se známými hodnotami  $IC_{50}$ . Procenta inhibice byla vypočítána podle vzorce:

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

% I – procenta inhibice

$\Delta A_{BL}$  – nárůst absorbance u slepého vzorku za 1 min

$\Delta A_{SA}$  – nárůst absorbance u měřeného vzorku za 1 min

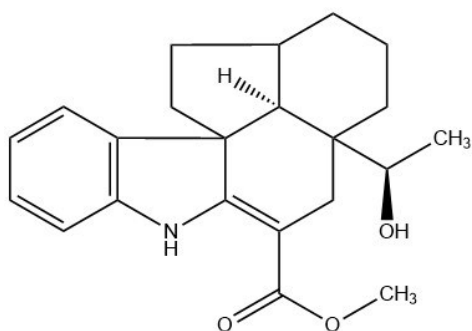
## 5 Výsledky

### 5.1 Strukturní analýza

#### 5.1.1 AV-1 (–)-minovincinin

Sumární vzorec: C<sub>21</sub>H<sub>26</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

Molekulová hmotnost: 354,44 g.mol<sup>-1</sup>



Obrázek 23: (–)-minovincinin

##### 5.1.1.1 LC-MS analýza

ESI-MS m/z % [M+H]<sup>+</sup> 355.

##### 5.1.1.2 NMR analýza

Sloučenina byla určena na základě porovnání NMR spekter s literaturou. [121]

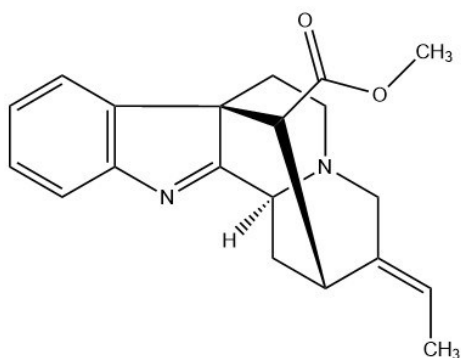
##### 5.1.1.3 Optická otáčivost

$[\alpha]_D^{25} = -356^\circ$  (c 0,267; CHCl<sub>3</sub>)

#### 5.1.2 AV-2 (+)-striktamin

Sumární vzorec: C<sub>20</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Molekulová hmotnost: 322,40 g.mol<sup>-1</sup>



Obrázek 24: (+)-stryktamin

### 5.1.2.1 LC-MS analýza

ESI-MS m/z % [M+H]<sup>+</sup> 323 (100), 324 (46). [M+Na]<sup>+</sup> 345 (8).

### 5.1.2.2 NMR analýza

Sloučenina byla určena na základě porovnání NMR spekter s literaturou. [122]

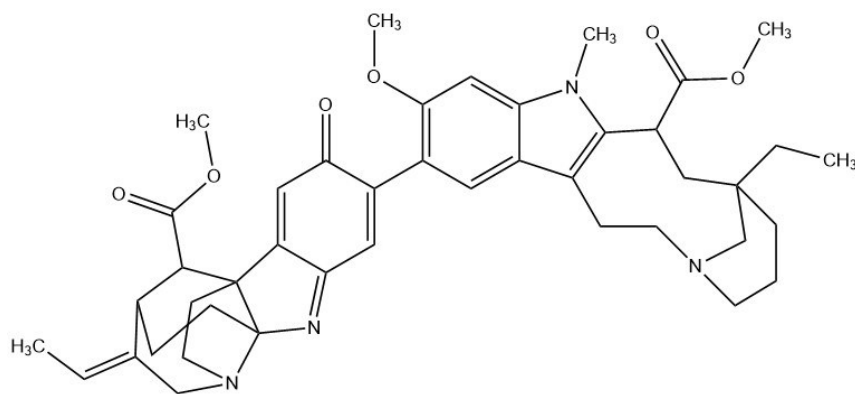
### 5.1.2.3 Optická otáčivost

$[\alpha]_D^{25} = +66^\circ$  (c 0,302; CHCl<sub>3</sub>)

## 5.1.3 AV-3 nová sloučenina

Sumární vzorec: C<sub>43</sub>H<sub>52</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub>

Molekulová hmotnost: 720,91 g.mol<sup>-1</sup>



Obrázek 25: AV-3

### 5.1.3.1 LC-MS analýza

ESI-MS m/z % [M+H]<sup>+</sup> 721.

### 5.1.3.2 NMR analýza

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 7.40 (1H, s), 7.31 (1H, s), 6.77 (1H, s), 6.63 (1H, s), 6.16 (1H, d, *J* = 10.3 Hz), 5.45 (1H, q, *J* = 7.0 Hz), 4.04 (1H, d, *J* = 15.4 Hz), 3.86 (3H, s), 3.81 – 3.77 (1H, m, overlap), 3.80 (3H, s, overlap), 3.66 (3H, s), 3.59 (3H, s), 3.04 (1H, d, *J* = 15.4 Hz), 2.98 – 2.81 (4H, m), 2.81 – 2.78 (1H, m), 2.78 – 2.69 (2H, m), 2.65 – 2.50 (2H, m), 2.49 – 2.43 (1H, m), 2.40 (1H, d, *J* = 14.5 Hz), 2.36 – 2.30 (1H, m), 2.29 (1H, d, *J* = 11.9 Hz), 2.02 – 1.92 (2H, m), 1.93 – 1.85 (3H, m), 1.83 – 1.72 (1H, m), 1.68 – 1.60 (1H, m, overlap), 1.66 (3H, dd, overlap, *J* = 7.0 Hz, *J* = 1.8 Hz), 1.58 – 1.50 (1H, m), 1.44 – 1.32 (1H, m), 1.13 – 0.96 (3H, m), 0.71 (3H, t, *J* = 7.4 Hz)

<sup>13</sup>C NMR (125.7 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 187.5, 175.0, 172.7, 164.6, 158.0, 153.8, 146.5, 139.3, 138.5, 135.9, 130.8, 123.3, 123.0, 121.5, 120.3, 118.1, 112.3, 104.0, 91.8, 60.9, 59.1, 56.8, 56.2, 54.1, 53.8, 53.5, 52.2, 51.9, 50.3, 41.0, 39.0, 38.9, 35.7, 35.7, 35.1, 35.1, 31.1, 27.7, 26.7, 26.7, 23.1, 13.8, 7.5

### 5.1.3.3 Optická otáčivost

$[\alpha]_D^{25} = -326^\circ$  (c 0,086; CHCl<sub>3</sub>)

## 5.2 Inhibiční aktivita izolovaných alkaloidů

Tabulka 100: Inhibiční aktivita izolovaných alkaloidů

Alkaloid	AChE (IC <sub>50</sub> μM)	BChE (IC <sub>50</sub> μM)
AV-1 (–)-minovincinin	>100	>100
AV-2 (+)-striktamin	>100	>100
AV-3 (nová sloučenina)	>86,3 ± 2,3	>100
Standardy		
Galanthamin	1,71 ± 0,06	42,30 ± 1,30
Fysostigmin	63,0 ± 1,0 × 10 <sup>-3</sup>	130,0 ± 4,0 × 10 <sup>-3</sup>

## 6 Diskuse

Frakce VM 215–258 z rostliny *Vinca minor* L. byla pomocí flash chromatografie rozdělena do 15 frakcí. Prvotní dělení na oxidu hlinitém neprobíhalo optimálně, výhodnější pro separaci bylo použití  $\text{SiO}_2$ , při kterém byla spojená frakce 4–21 mnohem lépe separována (obr. 21), což může být dáno silnější adsorpcí indolových alkaloidů tohoto typu na silikagel (na oxidu hlinitém došlo prakticky k eluci za daných podmínek, neboť z původních 8,6 g frakce bylo najednou eluováno 7,67 g alkaloidů).

Naopak, polárnější alkaloidy frakce VM 215–258 se na oxidu hlinitém mnohem lépe separovaly (obr. 20). Porovnáme-li oba použité adsorbenty, tak oxid hlinitý se pro flash chromatografii nepoužívá tak často jako silikagel, který má i větší sorpční kapacitu než oxid hlinitý [123]. Silikagel je i cenově dostupnější, univerzálnější (lze na něm separovat široké spektrum sloučenin), a proto nepřekvapí, že je nejrozšířenějším používaným adsorbentem pro separaci organických sloučenin, včetně látek přírodního původu.

Z vybraných podfrakcí byly krystalizací získány 3 alkaloidy: (–)-minovincinin, (+)-striktamin, AV-3 (nová látka). Jejich struktura byla určena na základě LC-MS, NMR a optické otáčivosti.

Minovincinin byl již dříve izolován z *V. minor*, *V. erecta*, *Alstonia venenata* [124–126]. Za normálních okolností je minovincinin v rostlině ve stopovém množství, ovšem ošetření rostliny methyl-jasmonátem vede k indukci oxidačních enzymů ve *V. minor*. Jedná se o vinca alkaloid eburnaminového typu.

Striktamin – alkaloid sarpaginového typu byl poprvé izolován z rostliny *Rhazya stricta*, následně byl také izolován z dalších zástupců čeledi Apocynaceae jako například *Alstonia scholaris*, *Rauvolfia yunnanensis*, *Catharanthus roseus* nebo *Amsonia sinensis* [127–132]. Striktamin izolovaný z rostliny *Alstonia scholaris* vykazoval inhibiční aktivitu na virus herpes simplex a adenovirus [133,134].

Sloučenina AV-3, strukturně patřící mezi alkaloidy sarpaginového typu, byla izolovaná poprvé. Možná i díky zpracování objemného množství rostlinného materiálu (příprava alkaloidního extraktu probíhala z 62 kg nati).

Získané látky proto byly testovány na inhibiční aktivitu na lidské enzymy AChE a BChE a porovnány se standardy galanthaminem a fysostigminem. Galanthamin je alkaloid se silnou inhibiční aktivitou vůči AChE ( $1,71 \pm 0,06 \mu\text{M}$ ), ale vůči BChE je jeho inhibiční aktivita nižší

( $42,30 \pm 1,30 \mu\text{M}$ ). Fysostigmin vykazuje inhibiční aktivitu jak vůči AChE, tak vůči BChE ( $63,0 \pm 1,0 \times 10^{-3} \mu\text{M}$ ,  $130,0 \pm 4,0 \times 10^{-3} \mu\text{M}$ ). Izolované alkalody (-)-minovincinin a (+)-striktamin nevykazovaly žádnou aktivitu vůči AChE a BChE. Vzorek AV-3 vykazoval mírnou inhibiční aktivitu vůči AChE ( $86,3 \pm 2,3 \mu\text{M}$ ).

Závěrem lze konstatovat, že z hlediska inhibice lidských cholinesteras žádná z izolovaných látek nemá vlastnosti, které by se potenciálně daly využít v léčbě AD, nicméně nelze vyloučit bez dalšího studia biologických aktivit těchto sloučenin, že tyto látky mohou příznivě ovlivňovat tuto nemoc jiným mechanismem účinku.

## 7 Seznam použité literatury

- [1] R. Jiráček, Demence, MAXDORF s.r.o., Praha, 1999.
- [2] Z. Seidl, Neurologie pro studium i praxi, 2., GRADA Publishing, Praha, 2017.
- [3] Z. Seidl, J. Obenberger, Neurologie pro studium i praxi, GRADA Publishing, Praha, 2004.
- [4] V. Pidrman, Demence, GRADA Publishing, Praha, 2007.
- [5] F. Šťastný, Alois Alzheimer: příběh jedné nemoci, Vesmír 86 (2007). <https://vesmir.cz/cz/casopis/archiv-casopisu/2007/cislo-4/alois-alzheimer-pribeh-jedne-nemoci.html> (staženo 7.11.2019).
- [6] O. Mátl, M. Mátlová, Zpráva o stavu demence 2016, Česká alzheimerovská společnost. (2016). <http://www.alzheimer.cz/res/archive/004/000480.pdf?seek=1492589048> (staženo 7.11.2019).
- [7] J. Martínková, Farmakologie pro studenty zdravotnických oborů, 1., GRADA Publishing, Praha, 2007.
- [8] E. Martino, G. Casamassima, S. Castiglione, E. Cellupica, S. Pantalone, F. Papagni, M. Rui, A.M. Siciliano, S. Collina, Vinca alkaloids and analogues as anti-cancer agents: Looking back, peering ahead, Bioorg. Med. Chem. Lett. 28 (2018).
- [9] A.-H.A. Fayed, Brain Trace Element Concentration of Rats Treated with the Plant Alkaloid, Vincamine, Biol. Trace Elem. Res. 136 (2010).
- [10] Doporučené postupy pro praktické lékaře Demence, Společnost všeobecného lékařství ČLS JEP. (2018), <https://www.svl.cz/files/files/Doporucene-postupy/2017/DP-Demence.pdf> (staženo 2.2.2020).
- [11] M. Doležal, Farmaceutická chemie léčiv působících na centrální nervový systém, Karolinum, Praha, 2016.
- [12] FI prosinec 2014, Státní ústav pro kontrolu léčiv, <http://www.sukl.cz/sukl/fi-prosinec-2014> (staženo 9.2.2020).



- [13] L. Fialová, A. Bartoš, J. Švarcová., D. Doležil, I. Malbohan, Stanovení tau proteinu v mozkomíšním moku pacientů s roztroušenou sklerózou dvěma soupravami ELISA, Česká společnost klinické biochemie, <http://www.cskb.cz/res/file/KBM-pdf/2011/2011-2/KBM-2-11-113-Fialova.pdf> (staženo 7.12.2019).
- [14] F. Koukolík, R. Jirák, Alzheimerova nemoc a další demence, GRADA Publishing, Praha, 1998.
- [15] M. Giri, M. Zhang, Y. Lü, Genes associated with Alzheimer's disease: an overview and current status, *Clin. Interv. Aging.* 11 (2016).
- [16] X.-Q. Chen, W.C. Mobley, Alzheimer Disease Pathogenesis: Insights From Molecular and Cellular Biology Studies of Oligomeric A $\beta$  and Tau Species, *Front. Neurosci.* 13 (2019).
- [17] P.R. Angelova, A.Y. Abramov, Role of mitochondrial ROS in the brain: from physiology to neurodegeneration, *FEBS Lett.* 592 (2018).
- [18] R. Ricciarelli, E. Fedele, The Amyloid Cascade Hypothesis in Alzheimer's Disease: It's Time to Change Our Mind, *Curr. Neuropharmacol.* 15 (2017).
- [19] J. Viňa, J. Sanz-Ros, Alzheimer's disease: Only prevention makes sense, *Eur. J. Clin. Invest.* 48 (2018).
- [20] L. Richterová, Reaktivní sloučeniny kyslíku, Bakalářská práce, Masarykova univerzita v Brně, Přírodovědecká fakulta, doc. RNDr. Petr Zbořil, CSc. (2010). [https://is.muni.cz/th/o0s2s/BP\\_Reaktivni\\_slouceniny\\_kysliku.pdf](https://is.muni.cz/th/o0s2s/BP_Reaktivni_slouceniny_kysliku.pdf) (staženo 3.3.2020).
- [21] M. Zeman, R. Jirák, Alzheimerova choroba a diabetes mellitus typu 2, *Neurol. Praxi.* 13 (2012). <http://solen.cz/doi/10.nnnn/neu.2012.028.html> (staženo 4.3.2020).
- [22] R. Jirák, Stará a nová diagnostická kritéria pro Alzheimerovu chorobu v podmínkách ČR, *Neurol. Praxi.* 12 (2011). <http://solen.cz/doi/10.nnnn/neu.2011.033.html> (staženo 3.12.2019).
- [23] 2016 Alzheimer's disease facts and figures, *Alzheimers Dement. J. Alzheimers Assoc.* 12 (2016).

- [24] M. Sharma, Preventing Alzheimer's Disease: Some Light in the Darkness, *J. Am. Coll. Cardiol.* 74 (2019).
- [25] J.P. Kesslak, Can estrogen play a significant role in the prevention of Alzheimer's disease?, in: K.A. Jellinger, R. Schmidt, M. Windisch (Eds.), *Ageing Dement. Curr. Future Concepts*, Springer Vienna, Vienna, 2002.
- [26] L. Fratiglioni, M. Viitanen, E. von Strauss, V. Tontodonati, A. Herlitz, B. Winblad, Very Old Women at Highest Risk of Dementia and Alzheimer's Disease: Incidence Data from the Kungsholmen Project, *Stockholm, Neurology.* 48 (1997).
- [27] K. Sheardová, D. Hudeček, Prevence demence a životní styl, *Neurol. Praxi.* 12 (2011). <http://solen.cz/doi/10.nnnn/neu.2011.109.html> (staženo 5.3.2020).
- [28] S. Bennett, A.J. Thomas, Depression and dementia: Cause, consequence or coincidence?, *Maturitas.* 79 (2014).
- [29] A. Sundström, A. Nordin Adolfsson, M. Nordin, R. Adolfsson, Loneliness increases the risk of all-cause dementia and Alzheimer's disease, *J. Gerontol. B. Psychol. Sci. Soc. Sci.* (2019).
- [30] K. Szczechowiak, B.S. Diniz, J. Leszek, Diet and Alzheimer's dementia – Nutritional approach to modulate inflammation, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 184 (2019).
- [31] Z. Rezaeiasl, M. Salami, G. Sepehri, The Effects of Probiotic Lactobacillus and Bifidobacterium Strains on Memory and Learning Behavior, Long-Term Potentiation (LTP), and Some Biochemical Parameters in  $\beta$ -Amyloid-Induced Rat's Model of Alzheimer's Disease, *Prev. Nutr. Food Sci.* 24 (2019).
- [32] C. Jiang, G. Li, P. Huang, Z. Liu, B. Zhao, The Gut Microbiota and Alzheimer's Disease, *J. Alzheimers Dis. JAD.* 58 (2017).
- [33] L. Fan, W. Xu, Y. Cai, Y. Hu, C. Wu, Sleep Duration and the Risk of Dementia: A Systematic Review and Meta-analysis of Prospective Cohort Studies, *J. Am. Med. Dir. Assoc.* 0 (2019).

- [34] S. Billiotti de Gage, Y. Moride, T. Ducruet, T. Kurth, H. Verdoux, M. Tournier, A. Pariente, B. Begaud, Benzodiazepine use and risk of Alzheimer's disease: case-control study, *BMJ*. 349 (2014).
- [35] V. Franková, Optimalizace léčby Alzheimerovy choroby, *Prakt. Lékárenství*. 12 (2016). <http://solen.cz/doi/10.nnnn/lek.2016.013.html> (staženo 15.12.2019).
- [36] J. Benito-León, I. Contador, S. Vega, A. Villarejo-Galende, F. Bermejo-Pareja, Non-steroidal anti-inflammatory drugs use in older adults decreases risk of Alzheimer's disease mortality, *PLoS ONE*. 14 (2019).
- [37] C. Zhang, Y. Wang, D. Wang, J. Zhang, F. Zhang, NSAID Exposure and Risk of Alzheimer's Disease: An Updated Meta-Analysis From Cohort Studies, *Front. Aging Neurosci*. 10 (2018).
- [38] B.P. Imbimbo, V. Solfrizzi, F. Panza, Are NSAIDs Useful to Treat Alzheimer's Disease or Mild Cognitive Impairment?, *Front. Aging Neurosci*. 2 (2010).
- [39] M.M. Ali, R.G. Ghouri, A.H. Ans, A. Akbar, A. Toheed, Recommendations for Anti-inflammatory Treatments in Alzheimer's Disease: A Comprehensive Review of the Literature, *Cureus*. 11 (2019).
- [40] B. Cholerton, C.E. Gleason, L.D. Baker, S. Asthana, Estrogen and Alzheimer's Disease: The Story So Far, *Drugs Aging*. 19 (2002).
- [41] S. Merlo, S.F. Spampinato, M.A. Sortino, Estrogen and Alzheimer's disease: Still an attractive topic despite disappointment from early clinical results, *Eur. J. Pharmacol*. 817 (2017).
- [42] J.P. Teixeira, A.A. de Castro, F.V. Soares, E.F.F. da Cunha, T.C. Ramalho, Future Therapeutic Perspectives into the Alzheimer's Disease Targeting the Oxidative Stress Hypothesis, *Molecules*. 24 (2019).
- [43] W.-W. CHEN, X. ZHANG, W.-J. HUANG, Role of physical exercise in Alzheimer's disease, *Biomed. Rep*. 4 (2016).
- [44] S.P. Cass, Alzheimer's Disease and Exercise: A Literature Review, *Curr. Sports Med. Rep*. 16 (2017).

- [45] D.S. Khalsa, Stress, Meditation, and Alzheimer's Disease Prevention: Where The Evidence Stands, *J. Alzheimers Dis.* 48 (2015).
- [46] Y. Gao, C. Huang, K. Zhao, L. Ma, X. Qiu, L. Zhang, Y. Xiu, L. Chen, W. Lu, C. Huang, Y. Tang, Q. Xiao, *Retracted*: Depression as a risk factor for dementia and mild cognitive impairment: a meta-analysis of longitudinal studies: Depression and cognitive function, *Int. J. Geriatr. Psychiatry.* 28 (2013).
- [47] C. Bartels, M. Wagner, S. Wolfsgruber, H. Ehrenreich, A. Schneider, for the Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative, Impact of SSRI Therapy on Risk of Conversion From Mild Cognitive Impairment to Alzheimer's Dementia in Individuals With Previous Depression, *Am. J. Psychiatry.* 175 (2018).
- [48] W. Xu, L. Tan, H.-F. Wang, M.-S. Tan, L. Tan, J.-Q. Li, Q.-F. Zhao, J.-T. Yu, Education and Risk of Dementia: Dose-Response Meta-Analysis of Prospective Cohort Studies, *Mol. Neurobiol.* 53 (2016).
- [49] Premorbid brain size as a determinant of reserve capacity against intellectual decline in Alzheimer's disease, *Am. J. Psychiatry.* 154 (1997).
- [50] M.E. de Vugt, F. Stevens, P. Aalten, R. Lousberg, N. Jaspers, I. Winkens, J. Jolles, F.R.J. Verhey, Do caregiver management strategies influence patient behaviour in dementia?, *Int. J. Geriatr. Psychiatry.* 19 (2004).
- [51] N.L. Mace, P.V. Rabins, *Alzheimer : rodinný průvodce péčí o nemocné s Alzheimerovou chorobou a jinými demencemi : ztráta paměti, změny chování a nálad, jak vydržet v roli ošetřovatele, každodenní péče o blízké s demencí či ztrátou paměti, 1.*, Stanislav Juhaňák - Triton, Praha, 2018.
- [52] J. Vlček, *Klinická farmacie*, GRADA Publishing, Praha, 2010.
- [53] N. Garcia-Casares, R.M. Moreno-Leiva, J.A. Garcia-Arnes, [Music therapy as a non-pharmacological treatment in Alzheimer's disease. A systematic review], *Rev. Neurol.* 65 (2017).
- [54] Autorský kolektiv, *Compendium Léčiva používaná v podmínkách ČR, 5.*, PharmDr. Rostislav Šimek, Praha, 2018.

- [55] J. Martin, Z. Kršková, J. Dušek, Huperzin A a jiné přírodní látky v léčbě Alzheimerovy choroby, *Prakt. Lékárenství*. 7 (2011). <http://solen.cz/doi/10.nnnn/lek.2011.009.html> (staženo 5.3.2020).
- [56] L. Opletal, Přírodní látky a jejich biologická aktivita NUTRACEUTIKA Sekundární metabolity rostlin, 1., Karolinum, Praha, 2016.
- [57] H.-F. Zhang, L.-B. Huang, Y.-B. Zhong, Q.-H. Zhou, H.-L. Wang, G.-Q. Zheng, Y. Lin, Přehled systematických souhrnů studií: využití extraktu z Ginkgo biloba v léčbě mírného kognitivního poškození a demence, *Neurol. pro Praxi*. (2018).
- [58] W. Wilms, M. Woźniak-Karczewska, P.F.-X. Corvini, Ł. Chrzanowski, Nootropic drugs: Methylphenidate, modafinil and piracetam - Population use trends, occurrence in the environment, ecotoxicity and removal methods - A review, *Chemosphere*. 233 (2019).
- [59] D.O. Kennedy, Phytochemicals for Improving Aspects of Cognitive Function and Psychological State Potentially Relevant to Sports Performance, *Sports Med. Auckl. NZ*. 49 (2019).
- [60] A.B. Scholey, N.T.J. Tildesley, C.G. Ballard, K.A. Wesnes, A. Tasker, E.K. Perry, D.O. Kennedy, An extract of Salvia (sage) with anticholinesterase properties improves memory and attention in healthy older volunteers, *Psychopharmacology (Berl.)*. 198 (2008).
- [61] P. Patil, A. Thakur, A. Sharma, S.J.S. Flora, Natural products and their derivatives as multifunctional ligands against Alzheimer's disease, *Drug Dev. Res.* (2019).
- [62] A.P. Singh, R. Singh, S.S. Verma, V. Rai, C.H. Kaschula, P. Maiti, S.C. Gupta, Health benefits of resveratrol: Evidence from clinical studies, *Med. Res. Rev.* 39 (2019).
- [63] R.S. Turner, R.G. Thomas, S. Craft, C.H. van Dyck, J. Mintzer, B.A. Reynolds, J.B. Brewer, R.A. Rissman, R. Raman, P.S. Aisen, For the Alzheimer's Disease Cooperative Study, A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of resveratrol for Alzheimer disease, *Neurology*. 85 (2015).
- [64] J. Hroudová, Výzkum nových léčiv u Alzheimerovy choroby, *Prakt. Lékárenství*. (2017). <http://solen.cz/doi/10.36290/lek.2017.036.html> (staženo 5.3.2020).

- [65] V. Tumiatti, A. Minarini, M.L. Bolognesi, A. Milelli, M. Rosini, C. Melchiorre, Tacrine Derivatives and Alzheimers Disease, *Curr. Med. Chem.* 17 (2010).
- [66] M. Przybyłowska, S. Kowalski, K. Dzierzbicka, I. Inkielewicz-Stepniak, Therapeutic Potential of Multifunctional Tacrine Analogues, *Curr. Neuropharmacol.* 17 (2019).
- [67] E. Borroni, B. Bohrmann, F. Grueninger, E. Prinssen, S. Nave, H. Loetscher, S.J. Chinta, S. Rajagopalan, A. Rane, A. Siddiqui, B. Ellenbroek, J. Messer, A. Pähler, J.K. Andersen, R. Wyler, A.M. Cesura, Sembragiline: A Novel, Selective Monoamine Oxidase Type B Inhibitor for the Treatment of Alzheimer's Disease, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 362 (2017).
- [68] S. Nave, R.S. Doody, M. Boada, T. Grimmer, J.-M. Savola, P. Delmar, M. Pauly-Evers, T. Nikolcheva, C. Czech, E. Borroni, B. Ricci, J. Dukart, M. Mannino, T. Carey, E. Moran, I. Gilaberte, N.M. Muelhardt, I. Gerlach, L. Santarelli, S. Ostrowitzki, P. Fontoura, Sembragiline in Moderate Alzheimer's Disease: Results of a Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Phase II Trial (MAYfLower RoAD), *J. Alzheimers Dis.* 58 (2017).
- [69] E. Kolibas, V. Korinkova, V. Novotny, K. Vajdickova, D. Hunakova, ADAS-cog (Alzheimer's Disease Assessment Scale — cognitive subscale) — validation of the Slovak version, *Bratisl. lek. listy* 101 (2000). <http://bmj.fmed.uniba.sk/2000/10111-03.PDF> (staženo 3.5.2020).
- [70] W. Xia,  $\gamma$ -Secretase and its modulators: Twenty years and beyond, *Neurosci. Lett.* 701 (2019).
- [71] D. Kumar, A. Ganeshpurkar, D. Kumar, G. Modi, S.K. Gupta, S.K. Singh, Secretase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease: Long road ahead, *Eur. J. Med. Chem.* 148 (2018).
- [72] B. Cao, J.D. Rosenblat, E. Brietzke, C. Park, Y. Lee, N. Musial, Z. Pan, R.B. Mansur, R.S. McIntyre, Comparative efficacy and acceptability of antidiabetic agents for Alzheimer's disease and mild cognitive impairment: A systematic review and network meta-analysis, *Diabetes Obes. Metab.* 20 (2018).
- [73] A. Ghosh, N. Kumaragurubaran, L. Hong, G. Koelsh, J. Tang, Memapsin 2 (Beta-Secretase) Inhibitors: Drug Development, *Curr. Alzheimer Res.* 5 (2008).

- [74] C.A. Lemere, E. Masliah, Can Alzheimer disease be prevented by amyloid- $\beta$  immunotherapy?, *Nat. Rev. Neurol.* 6 (2010).
- [75] M. Vališ, D. Kalnická, Novinky ve farmakoterapii demencí, *Neurol. pro Praxi.* 12 (2011).
- [76] M. Boada, P. Ortiz, F. Anaya, I. Hernández, J. Muñoz, L. Núñez, J. Olazarán, I. Roca, G. Cuberas, L. Tárraga, M. Buendia, R.P. Pla, I. Ferrer, A. Páez, Amyloid-targeted therapeutics in Alzheimer's disease: use of human albumin in plasma exchange as a novel approach for Abeta mobilization, *Drug News Perspect.* 22 (2009).
- [77] L.C. dos Santos Picanco, P.F. Ozela, M. de Fatima de Brito Brito, A.A. Pinheiro, E.C. Padilha, F.S. Braga, C.H.T. de Paula da Silva, C.B.R. dos Santos, J.M.C. Rosa, L.I. da Silva Hagemelím, Alzheimer's Disease: A Review from the Pathophysiology to Diagnosis, New Perspectives for Pharmacological Treatment, *Curr. Med. Chem.* 25 (2018).
- [78] L. Frölich, A. Atri, C. Ballard, P.N. Tariot, J.L. Molinuevo, N. Boneva, M.A. Geist, L.L. Raket, J.L. Cummings, Open-Label, Multicenter, Phase III Extension Study of Idalopirdine as Adjunctive to Donepezil for the Treatment of Mild-Moderate Alzheimer's Disease, *J. Alzheimers Dis.* 67 (2019).
- [79] S.Y. Kim, S.H. Choi, H. Rollema, E.M. Schwam, T. McRae, S. Dubrava, J. Jacobsen, Phase II Crossover Trial of Varenicline in Mild-to-Moderate Alzheimer's Disease, *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* 37 (2014).
- [80] A.H. Burstein, I. Grimes, D.R. Galasko, P.S. Aisen, M. Sabbagh, A.M. Mjalli, Effect of TTP488 in patients with mild to moderate Alzheimer's disease, *BMC Neurol.* 14 (2014).
- [81] D. Galasko, J. Bell, J.Y. Mancuso, J.W. Kupiec, M.N. Sabbagh, C. van Dyck, R.G. Thomas, P.S. Aisen, Alzheimer's Disease Cooperative Study, Clinical trial of an inhibitor of RAGE-A $\beta$  interactions in Alzheimer disease, *Neurology.* 82 (2014).
- [82] O. Benek, K. Musílek, K. Kuča, Mitochondriální enzym ABAD a jeho role v rozvoji a léčbě Alzheimerovy nemoci, *Čes. slov. Farm.* 61 (2012). <https://www.prolekare.cz/casopisy/ceska-slovenska-farmacie/2012-4-7/mitochondrialni-enzym-abad-a-jeho-role-v-rozvoji-a-lecbe-alzheimerovy-nemoci-39241> (staženo 6.3.2020).

- [83] L. Hroch, P. Guest, O. Benek, O. Soukup, J. Janockova, R. Dolezal, K. Kuca, L. Aitken, T.K. Smith, F. Gunn-Moore, D. Zala, R.R. Ramsay, K. Musilek, Synthesis and evaluation of frentizole-based indolyl thiourea analogues as MAO/ABAD inhibitors for Alzheimer's disease treatment, *Bioorg. Med. Chem.* 25 (2017).
- [84] Aitken, Benek, McKelvie, Hughes, Hroch, Schmidt, Major, Vinklarova, Kuca, Smith, Musilek, Gunn-Moore, Novel Benzothiazole-based Ureas as 17 $\beta$ -HSD10 Inhibitors, A Potential Alzheimer's Disease Treatment, *Molecules.* 24 (2019).
- [85] S. Ciafrè, G. Ferraguti, P. Tirassa, A. Iannitelli, M. Ralli, A. Greco, G.N. Chaldakov, P. Rosso, E. Fico, M.P. Messina, V. Carito, L. Tarani, M. Ceccanti, M. Fiore, Nerve growth factor in the psychiatric brain, *Riv. Psichiatr.* 55 (2020).  
[https://www.rivistadipsichiatria.it/articoli.php?archivio=yes&vol\\_id=3301&id=32713](https://www.rivistadipsichiatria.it/articoli.php?archivio=yes&vol_id=3301&id=32713)  
(staženo 7.3.2020).
- [86] S. Karceski, S. Karceski, Can naproxen slow the progression of Alzheimer disease?, *Neurology.* 92 (2019).
- [87] R.C. Green, Effect of Tarenflurbil on Cognitive Decline and Activities of Daily Living in Patients With Mild Alzheimer Disease A Randomized Controlled Trial, *JAMA.* 302 (2009).
- [88] Brain Cholesterol, Statins and Alzheimer's Disease, *Pharmacopsychiatry.* 36 (2003).
- [89] B. Wolozin, Decreased Prevalence of Alzheimer Disease Associated With 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Coenzyme A Reductase Inhibitors, *Arch. Neurol.* 57 (2000).
- [90] M.A. Pappolla, Statins, incident Alzheimer disease, change in cognitive function, and neuropathology, *Neurology.* 71 (2008).
- [91] H. Jick, G. Zornberg, S. Jick, S. Seshadri, D. Drachman, Statins and the risk of dementia, *The Lancet.* 356 (2000).
- [92] L. Jahodář, *Farmakobotanika semenné rostliny*, Karolinum, Praha, 2011.
- [93] BioLib. <https://www.biolib.cz/cz/taxon/id40533/> (staženo 25.4.2020).
- [94] Daidalea. <https://apps.faf.cuni.cz/daidalea/PlantSpecies.asp?id=10024> (staženo 8.2.2020).



- [95] J. Janča, *Herbář léčivých rostlin 1. díl, 1.*, EMINENT, Praha, 1994.
- [96] J. Spilková, *Farmakognozie*, Karolinum, Praha, 2016.
- [97] D. Seidel, *Květiny: klíč ke spolehlivému určování - 3 znaky, 3.*, REBO Production, 2009.
- [98] F. Bahadori, G. Topcu, M. Boga, A. Turkekul, U. Kolak, M. Kartal, Indole Alkaloids from *Vinca major* and *V. minor* Growing in Turkey, *Nat. Prod. Commun.* 7 (2012).
- [99] Á. Vas, B. Gulyás, Eburnamine derivatives and the brain, *Med. Res. Rev.* 25 (2005).
- [100] V. Kováčik, I. Kompiš, Alkaloids from *Vinca minor* L. XXIII. Mass spectrometry of eburnamine-type alkaloids, *Collect. Czechoslov. Chem. Commun.* 34 (1969).
- [101] M. Lounasmaa, P. Hanhinen, The ajmaline group of indole alkaloids, in: *Alkaloids Chem. Biol.*, Elsevier, 2001.
- [102] O.A. Namjoshi, J.M. Cook, Sarpagine and Related Alkaloids, in: *Alkaloids Chem. Biol.*, Elsevier, 2016.
- [103] M.F. Millson, R. Robinson, A.F. Thomas, Notes on the alkaloids of Picralima, *Experientia.* 9 (1953).
- [104] M.M. Janot, J. Le Men, K. Aghoramurthy, R. Robinson, The identity of vincamajoridine and akuammine, *Experientia.* 11 (1955).
- [105] J.M. Smith, J. Moreno, B.W. Boal, N.K. Garg, Cascade Reactions: A Driving Force in Akuammiline Alkaloid Total Synthesis, *Angew. Chem. Int. Ed.* (2014).
- [106] I. Ognyanov, B. Pyuskyulev, I. Kompiš, T. Sticzay, G. Spiteller, M. Shamma, R.J. Shine, Alkaloids from *vinca herbacea* w.k.—X, *Tetrahedron.* 24 (1968).
- [107] I. Gülçin, Ş. Beydemir, F. Topal, N. Gagua, A. Bakuridze, R. Bayram, A. Gepdiremen, Apoptotic, antioxidant and antiradical effects of majdine and isomajdine from *Vinca herbacea* Waldst. and kit, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 27 (2012).
- [108] E. Ali, V.S. Giri, S.C. Pakrashi, The oxindole alkaloids of *Vinca elegantissima* Hort, *Experientia.* 31 (1975).

- [109] PubChem, Oxindole, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/321710> (staženo 1.2.2020).
- [110] J. Koch-Weser, P. Cook, I. James, Cerebral Vasodilators, *N. Engl. J. Med.* 305 (1981).
- [111] L. Vereczkey, Pharmacokinetics and metabolism of vincamine and related compounds, *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.* 10 (1985).
- [112] A. Spagnoli, G. Tognoni, ???Cerebroactive??? Drugs Clinical Pharmacology and Therapeutic Role in Cerebrovascular Disorders:, *Drugs.* 26 (1983).
- [113] D.L. Korol, P.E. Gold, Glucose, memory, and aging, *Am. J. Clin. Nutr.* 67 (1998).
- [114] D.J. Piñero, J.R. Connor, Iron in the Brain: An Important Contributor in Normal and Diseased States, *The Neuroscientist.* 6 (2000).
- [115] Y. Li, Q. Zou, J. Zhang, Vincamine exerts protective effect on spiral ganglion neurons in endolymphatic hydrops guinea pig models, *Am. J. Transl. Res.* 10 (2018).
- [116] L. Wu, M. Ye, J. Zhang, Vincamine prevents lipopolysaccharide induced inflammation and oxidative stress via thioredoxin reductase activation in human corneal epithelial cells, *Am. J. Transl. Res.* 10 (2018). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6079141/> (staženo 2.2.2020).
- [117] S.L. Erdő, P. Molnár, V. Lakics, J.Zs. Bence, Z. Tömösközi, Vincamine and vincanol are potent blockers of voltage-gated Na<sup>+</sup> channels, *Eur. J. Pharmacol.* 314 (1996).
- [118] H.S. Nandini, P.R. Naik, Antidiabetic, antihyperlipidemic and antioxidant effect of Vincamine, in streptozotocin-induced diabetic rats, *Eur. J. Pharmacol.* 843 (2019).
- [119] A. Vítovcová, Biologická aktivita sekundárních metabolitů rostlin IV. Alkaloidy Vinca minor L., Diplomová práce, Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta, Ing. Miroslav Ločárek (2016). <https://is.cuni.cz/webapps/zzp/detail/155458/> (staženo 125.2020).
- [120] W. Döpke, H. Meisel, Zur stereochemie eines neuen alkaloides aus vinca minor, *Tetrahedron Lett.* 11 (1970).

- [121] Z.-T. Chen, T. Xiao, P. Tang, D. Zhang, Y. Qin, Total synthesis of akuammiline alkaloid (+)-strictamine, *Tetrahedron*. 74 (2018).
- [122]  
[https://static1.buchi.com/sites/default/files/downloads/Flash\\_Cartridges\\_Data\\_Sheet\\_en\\_B\\_0.pdf?a0444cba1dba2b4c92915da2e716562ada8ab95a](https://static1.buchi.com/sites/default/files/downloads/Flash_Cartridges_Data_Sheet_en_B_0.pdf?a0444cba1dba2b4c92915da2e716562ada8ab95a) (staženo 12.5.2020).
- [123] M. Plat, J. Lemen, E. Fellion, M. Janot, Quatre Alcaloides Nouveaux Du Vinca Minor L. - Minovincine, Methoxy-Minovincine, Minovincinine, Et (-)-vincadifformine, Alcaloides Des Pervenches, .25., *Ann. Pharm. Fr.* 20 (1962).
- [124] M. Khalmirzaev, V. Malikov, S. Yunusov, Separation of Pseudokopsinine and Minovincinine from Vinca-Erecta, *Khimiya Prir. Soedin.* (1975).
- [125] B. Das, K. Biemann, Chatterj.a, A. Ray, P. Majumder, Alkaloids of Fruits of *Alstonia Venenata* R Br Echitovenidine and (+)-Minovincinine, *Tetrahedron Lett.* (1966).
- [126] H. Schnoes, K. Biemann, J. Mokry, I. Kompis, Chatterj.a, G. Ganguli, Strictamine, *J. Org. Chem.* 31 (1966).
- [127] H. Liu, B. Wu, Q. Zheng, X. Feng, New Indole Alkaloids from *Amsonia-Sinensis*, *Planta Med.* 57 (1991).
- [128] G. Chang-An, L. Xi-Kui, Indole Alkaloids from the Leaves of *Rauvolfia yunnanensis*, *Chem. J. Chin. Univ.-Chin.* 31 (2010).
- [129] L. Jain, S. Singh, M.B. Pandey, V.B. Pandey, Alkaloids of *Alstonia scholaris*, *J. Indian Chem. Soc.* 86 (2009).
- [130] A. Jossang, P. Fodor, B. Bodo, A new structural class of bisindole alkaloids from the seeds of *Catharanthus roseus*: Vingramine and methylvingramine, *J. Org. Chem.* 63 (1998).
- [131] L. Jain, M.B. Pandey, S. Singh, A.K. Singh, V.B. Pandey, A new indole alkaloid from *Alstonia scholaris*, *Nat. Prod. Res.* 23 (2009).
- [132] K. Pandey, C. Shevkar, K. Bairwa, A.S. Kate, Pharmaceutical perspective on bioactives from *Alstonia scholaris*: ethnomedicinal knowledge, phytochemistry, clinical status, patent space, and future directions, *Phytochem. Rev.* 19 (2020).

[133] W. Xu, W. Wang, X. Wang, Gold-Catalyzed Cyclization Leads to a Bridged Tetracyclic Indolenine that Represses  $\beta$ -Lactam Resistance, *Angew. Chem. Int. Ed.* 54 (2015).

## 8 Abstrakt

Vašíčková A.: Alkaloidy *Vinca minor* L. a jejich biologická aktivita (inhibice lidských cholinesteras) V. Diplomová práce, Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra farmaceutické botaniky, Hradec Králové 2020.

Z vybrané frakce VM 215–258 byly izolovány flash chromatografií a následnou preparativní TLC nebo krystalizací 3 alkaloidy. Jejich struktura byla určena na základě hmotnostní spektroskopie, NMR a optické otáčivosti a data byla porovnána s literaturou. Striktamin a minovincinin patří mezi alkaloidy již dříve izolované, alkaloid AV-3 je nově izolovaná sloučenina. Tyto čisté alkaloidy byly testovány na schopnost inhibovat lidské cholinesterasy a jejich inhibiční aktivita byla porovnána se standardy galanthaminem a fysostigminem. Sloučenina AV-3 vykazovala mírnou inhibiční aktivitu vůči BChE ( $IC_{50}$   $\mu$ M:  $> 86,3 \pm 2,3$ ), jinak se jedná o neaktivní sloučeniny, jejich  $IC_{50}$  vůči cholinesterasám byla  $>$  než 100  $\mu$ M.

Klíčová slova: *Vinca minor* L., vinca alkaloidy, minovincinin, striktamin, Alzheimerova demence, acetylcholinesterasa, butyrylcholinesterasa.

## 9 Abstract

Vašíčková A.: Alkaloids of *Vinca minor* L. and their biological activity (inhibition of human cholinesterases) V. Diploma thesis, Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Department of Pharmaceutical Botany, Hradec Králové 2020.

From the selected fraction VM 215–258 were isolated 3 alkaloids by flash chromatography followed, preparative thin layer chromatography and crystallization. Their structure was determined by mass spectroscopy, NMR and optical rotation, and the obtained data were compared with those in literature. Strictamine and minovincinine belong to alkaloids previously isolated, the alkaloid AV-3 has not been isolated yet. These alkaloids were tested for their ability to inhibit human cholinesterases and their inhibitory activity was compared to standards galanthamine and physostigmine. Compound AV-3 showed mild inhibitory activity against BChE ( $IC_{50} \mu M > 86.3 \pm 2.3$ ), other alkaloids were considered inactive, their  $IC_{50}$  values against cholinesterases were  $> 100 \mu M$ .

Key words: *Vinca minor* L. (Apocynaceae), vinca alkaloids, minovincinine, strictamine, Alzheimer's disease, acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase.