

UNIVERZITA KARLOVA  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ  
KATEDRA FARMACEUTICKÉ BOTANIKY

---



DIPLOMOVÁ PRÁCE

ALKALOIDY *VINCA MINOR* L. A JEJICH BIOLOGICKÁ AKTIVITA III.

Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Jakub Chlebek, Ph.D.

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

Hradec Králové, květen 2020

Dominika Valová

CHARLES UNIVERSITY

FACULTY OF PHARMACY IN HRADEC KRÁLOVÉ

DEPARTMENT OF PHARMACEUTICAL BOTANY

---



DIPLOMA THESIS

*VINCA MINOR* L. ALKALOIDS AND THEIR BIOLOGICAL ACTIVITY III.

Supervisor: PharmDr. Jakub Chlebek, Ph.D.

Head of Department: doc. Ing. Lucie Cahlíková, Ph.D.

Hradec Králové, May 2020

Dominika Valová

## PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala především svému školiteli PharmDr. Jakubovi Chlebkovi, Ph.D. za odborné vedení mé diplomové práce. Za vstřícnost, věnovaný čas a trpělivost, kterou mi věnoval při mé práci v laboratoři. Dále bych chtěla poděkovat prof. RNDr. Lubomíru Opletalovi, CSc. za změření inhibice cholinesteras; PharmDr. Daniele Hulcové, Ph.D. za změření inhibice glykogensynthasy kinasy  $3\beta$  a RNDr. Martině Hrabínové, Ph.D. za změření inhibice prolyl oligopeptidasy. Děkuji také doc. PharmDr. Jiřímu Kunešovi, CSc. a Mgr. Janě Maříkové za určení struktur alkaloidů pomocí NMR spekter. V neposlední řadě děkuji prof. PharmDr. Lucii Novákové, Ph.D. za změření HRMS.

## 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.

V Hradci Králové, květen 2020

Dominika Valová

## OBSAH

1	ÚVOD.....	11
2	CÍL PRÁCE.....	12
3	TEORETICKÁ ČÁST.....	13
3.1	Alzheimerova choroba .....	13
3.1.1	Epidemiologie.....	13
3.1.2	Etiologie.....	13
3.1.3	Klinický obraz.....	15
3.1.4	Diagnóza .....	15
3.1.5	Rizikové faktory .....	16
3.1.6	Léčba AD.....	16
3.2	<i>Vinca Minor</i> L. – barvínek menší .....	24
3.2.1	Taxonomické zařazení .....	24
3.2.2	Čeleď Apocynaceae .....	25
3.2.3	Rod <i>Vinca</i> .....	25
3.2.4	Botanická charakteristika <i>Vinca minor</i> L. ....	27
3.2.5	Nároky na prostředí.....	28
3.2.6	Využití v lidové medicíně.....	28
3.2.7	Sekundární metabolity .....	29
3.2.8	Alkaloidy <i>Vinca minor</i> L. a jejich biologická aktivita.....	38
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	43
4.1	Všeobecné postupy .....	43
4.1.1	Příprava a čištění rozpouštědel .....	43
4.1.2	Příprava litých desek na preparativní TLC.....	43
4.1.3	Tenkvrstvá chromatografie .....	43
4.1.4	Sloupcová chromatografie .....	43

4.1.5	Odpařování rozpouštědel.....	44
4.1.6	Detekce alkaloidů.....	44
4.1.7	Sušení a uchovávání izolovaných látek.....	44
4.2	Izolace alkaloidů.....	44
4.2.1	Rozpouštědla.....	44
4.2.2	Chemikálie.....	45
4.2.3	Pomocné látky.....	45
4.2.4	Detekční činidla.....	45
4.2.5	Vyvíjecí soustavy pro TLC.....	46
4.2.6	Chromatografické adsorbenty.....	46
4.2.7	Přístroje.....	46
4.3	Izolace alkaloidů.....	47
4.3.1	Rostlinný materiál.....	47
4.3.2	Příprava alkaloidního extraktu a frakce.....	47
4.4	Strukturní analýza.....	51
4.4.1	ESI-MS analýza.....	51
4.4.2	HMRS analýza.....	51
4.4.3	NMR analýza.....	51
4.4.4	Optická otáčivost.....	51
4.5	Stanovení biologické aktivity.....	52
4.5.1	Stanovení inhibice AChE a BuChE.....	52
4.5.2	Stanovení inhibice POP.....	54
4.5.3	Stanovení inhibice GSK-3 $\beta$ .....	55
5	VÝSLEDKY.....	57
5.1	Strukturní analýza.....	57
5.1.1	DV-1 (nová sloučenina).....	57

5.1.2	DV-2: Vincin .....	59
5.1.3	DV-3 (nová sloučenina) .....	60
5.2	Stanovení inhibiční aktivity .....	62
6	DISKUZE .....	63
7	ABSTRAKT .....	64
8	ABSTRACT .....	66
9	LITERARUTA .....	67

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AD	Alzheimerova choroba = Alzheimer's disease
ADINACO	ALzheimer's Disease and NATural COmpounds
ACh	acetylcholin
AChE	acetylcholinesterasa
ApoE	apolipoprotein E
APP	amyloidní prekurzorový protein
A $\beta$	$\beta$ -amyloidní protein
BuChE	butyrylcholinesterasa
CNS	centrální nervový systém
ESI/MS	elektrosprejová ionizace/hmotnostní spektrometrie
GIT	gastrointestinální trakt
GSK-3 $\beta$	glykogensyntasa kinasa 3 $\beta$
HEB	hematoencefalická bariéra
HRMS	hmotnostní spektrometrie o vysokém rozlišení
IACHÉ	inhibitory acetylcholinesteras
NMDA	<i>N</i> -methyl-D-aspartátová kyselina
NMR	nukleární magnetická rezonance
POP	prolyl oligopeptidasa
TLC	chromatografie na tenké vrstvě



## PŘEHLED OBRÁZKŮ

Obrázek 1 vzorec takrinu.....	17
Obrázek 2 vzorec rivastigminu .....	17
Obrázek 3 vzorec donepezilu .....	18
Obrázek 4 vzorec galantaminu .....	18
Obrázek 5 vzorec huperzinu A.....	19
Obrázek 6 vzorec memantinu .....	20
Obrázek 7 vzorec vinpocetinu .....	21
Obrázek 8 <i>Vinca minor</i> L.....	24
Obrázek 9 <i>Vinca major</i> L.....	26
Obrázek 10 <i>Vinca herbacea</i> Waldst. & Kit. ....	26
Obrázek 11 <i>Vinca erecta</i> Regel & Schmalh. ....	26
Obrázek 12 <i>Vinca difformis</i> Pourret.....	26
Obrázek 13 <i>Vinca soneri</i> Koyuncu .....	27
Obrázek 14 <i>Vinca ispartensis</i> Koyuncu & Eksi.....	27
Obrázek 15 list <i>Vinca minor</i> L.....	28
Obrázek 16 rostlina <i>Vinca minor</i> L. ....	28
Obrázek 17 květ <i>Vinca minor</i> L.....	28
Obrázek 18 větvička <i>Vinca minor</i> L. ....	28
Obrázek 19 vzorec vinkaminu .....	39
Obrázek 20 vzorec vinorelbinu.....	40
Obrázek 21 vzorec vinblastinu .....	40
Obrázek 22 vzorec vindesinu .....	41
Obrázek 23 vzorec vinfluninu .....	41
Obrázek 24 vzorec vinkristinu .....	42
Obrázek 25 podfrakce získané sloupcovou chromatografií frakce 48-81.....	49
Obrázek 26 kontrolní TLC podfrakce 42-48.....	50
Obrázek 27 vzorec DV-1 .....	57
Obrázek 28 vzorec DV-2: (-)-vincinu .....	59
Obrázek 29 vzorec DV-3 .....	60
Obrázek 30 HRMS DV-3.....	60

## PŘEHLED TABULEK

Tabulka 1 taxonomické zařazení <i>Vinca minor</i> L. ....	24
Tabulka 2 Ajmalinové alkaloidy .....	29
Tabulka 3 Akuamminové alkaloidy.....	30
Tabulka 4 Eburnaminové alkaloidy .....	30
Tabulka 5 Oxindolové alkaloidy.....	34
Tabulka 6 Sarpaginové alkaloidy .....	36
Tabulka 7 alkaloidy <i>Vinca minor</i> L. a jejich biologická aktivita .....	38
Tabulka 8 parametry chromatografického sloupce .....	48
Tabulka 9 podfrakce získané sloupcovou separací spojené frakce 48 – 81.....	48
Tabulka 10 hodnoty inhibičních aktivit .....	62

# 1 ÚVOD

Demencí, jejíž nejčastější formou je Alzheimerova choroba (AD), trpí ve světovém měřítku odhadem přibližně 47 milionů obyvatel. Počet nemocných bude s prodlužující se délkou života stoupat. V roce 2050 by podle odhadu Světové zdravotnické organizace mělo být již 136 milionů pacientů. Demence postihuje znatelně více ženy než muže, což souvisí s delší průměrnou délkou života žen. Většina pacientů s demencí je z méně rozvinutých států [1]. V České republice byla diagnostikována AD zhruba u dvou třetin pacientů trpících demencí. Přesto mezinárodní organizace (Alzheimer's Disease International) tvrdí, že i v nejvyspělejších státech polovina lidí s demencí není diagnostikována správně. Informace o stavu nemocných zůstává tak stále jen odhadem [2].

Spektrum používaných léčiv u AD je úzké, současná terapie zahrnuje léčbu kognitivních funkcí a přidružených onemocnění, mezi něž patří deprese, nespavost, poruchy chování a úzkost. Mezi kognitiva řadíme inhibitory cholinesteras (donepezil, rivastigmin, galantamin), které se používají pro lehkou až střední formu nemoci, v těžších stádiích potom antagonisty *N*-methyl-D-aspartátových receptorů (memantin). Léčba je pouze symptomatická, oddaluje těžší stádia nemoci a nesamostatnost pacientů [3].

Přírodním látkám je v poslední době věnováno stále více pozornosti. V této oblasti mezi významné čeledi patří čeleď Apocynaceae, která zahrnuje mnoho léčivých rostlin, které byly odedávna využívány v lidovém léčení a medicíně [4]. Tato diplomová práce se zabývá izolacemi indolových alkaloidů z *Vinca minor* L. (barvínku menšího) a jejich biologické aktivity vztahované k AD. Indolové alkaloidy jsou hlavními sekundárními metabolity *V. minor*, přičemž mezi majoritní alkaloidy patří vinkamin, působící antihypertenzivně, terapeutickým významem hrají důležitou roli alkaloidy vinkristin a vinblastin, které našly uplatnění v onkologii [5].

Výzkumná skupina ADINACO, pod záštitou Katedry farmaceutické botaniky, se dlouhodobě zabývá výzkumem sekundárních metabolitů izolovaných z rostlin v souvislosti s jejich potenciálním vlivem na patologické procesy spojené s AD a nádorovým bujením [6].

## 2 CÍL PRÁCE

Cílem této práce bylo:

- vypracování odborné rešerše na zadané téma,
- výběr vhodných chromatografických metod k izolaci alkaloidů,
- izolace alespoň jednoho alkaloidu v čisté formě z vybrané frakce získané na chromatografickém sloupci ze sumárního alkaloidního extraktu z *Vinca minor* L.,
- podílet se na stanovení struktury izolovaných sloučenin (příprava vzorků na MS, NMR analýzu a určení optické otáčivosti),
- podílet se na stanovení biologické aktivity (příprava vzorků na změření inhibice lidských cholinesteras, glykogensynthasy kinasy 3 $\beta$  a prolyl oligopeptidasy),
- zhodnocení dosažených dat a sepsání diplomové práce.

# 3 TEORETICKÁ ČÁST

## 3.1 Alzheimerova choroba

AD je primární neurodegenerativní onemocnění postihující parietotemporální oblast kůry mozku. Je nejběžnější příčinou demence představující 60–80 % všech případů [7]. Onemocnění poprvé popsal německý neuropatolog Alois Alzheimer roku 1906 na přednášce v Tübingenu, o rok později už nese choroba jeho jméno. Byla popsána jako vzácné presenilní onemocnění vyskytující se před 65. rokem věku [8].

### 3.1.1 Epidemiologie

Výskyt demence stoupá s věkem, ve většině případů v Evropě a USA je způsobena AD. Ve věku kolem 65 let ji trpí cca 2 % populace, ve věku kolem 80 let kolem 30 %. Ženy jsou zasaženy 2× častěji než muži [9]. Podle odhadů v roce 2020 v ČR trpí AD přibližně 183 tisíc lidí [2].

### 3.1.2 Etiologie

Příčina vzniku nemoci zatím není přesně známá, proto ji neumíme v současnosti léčit kauzálně [7]. Časná forma má většinou genetický výskyt, pozdější forma se vyskytuje bez zjevné příčiny. Od 2. poloviny 20. století se zkoumají různé mechanismy vzniku AD (cholinergní,  $\beta$ -amyloidní a teorie  $\tau$ -proteinu) a s ním související neuropatologický nález, ten je dán onemocněním, úrazem nebo jiným poškozením mozku, které vedou ke stálé nebo přechodné mozkové dysfunkci [10]. V poslední době se objevila teorie, podle níž je AD fakticky metabolickou chorobou, způsobenou nezdravým životním stylem. Kvůli souvislosti se sníženou citlivostí na inzulin v mozku se nazývá diabetem 3. typu [11].

#### 3.1.2.1 Cholinergní hypotéza

Již v počátku onemocnění dochází k poruše cholinergní aktivity CNS. Ubývá koncentrace mediátoru acetylcholinu (ACh) na nervových synapsích v důsledku snížení jeho syntézy enzymem cholinacetyltransferasou. Současně je snížen i počet nikotinových receptorů, zatímco počet muskarinových receptorů zůstává relativně nezměněn. Tento systém je důležitý m. j. pro mechanismy krátkodobé paměti a vstřípivosti paměti. ACh je odbouráván v synaptické štěrbině enzymem acetylcholinesterasou (AChE) nebo butyrylcholinesterasou (BuChE). BuChE

je tvořena v oblasti akumulací patologického  $\beta$ -amyloidního proteinu ( $A\beta$ ). Na základě této teorie byly do praxe zavedeny inhibitory acetylcholinesteras [12].

### 3.1.2.2 *$\beta$ -amyloidní hypotéza*

Teorie založena na souvislosti mezi štěpením transmembránově uloženého prekurzorového proteinu pro amyloid (APP) v mitochondriální membráně nejprve  $\beta$ -sekretasou a následně  $\gamma$ -sekretasou na tzv.  $A\beta$ . Následně dochází ke kumulaci hydrofobního  $A\beta$  do plaků, které se ukládají v nervových buňkách CNS a postupně způsobují jejich apoptózu. Platí přímá úměra mezi počtem plaků a funkčním postižením, tedy tíží demence [9,13].

### 3.1.2.3 *Teorie $\tau$ -proteinu*

Dalším významným patogenetickým faktorem je degradace intraneuronálního  $\tau$ -proteinu. Hyperfosforylací  $\tau$ -proteinu spouští aktivovaný enzym glykogensyntasa kinasa  $3\beta$  (GSK- $3\beta$ ) za účasti enzymu cyklindependentní kinasy 5 (CDK-5). Vlivem fosforylace tohoto proteinu dochází k polymeraci postižených neuronových vláken, která jsou podkladem tzv. neurofibrilárních uzlíčků. Postižené neurony podléhají apoptóze [14].

### 3.1.2.4 *Apolipoprotein E*

Apolipoprotein E (apoE), který je tvořen 299 aminokyselinami, zprostředkovává spojování lipoproteinů a transport cholesterolu. Gen pro apoE je polymorfní, vyskytující se ve třech alelách, které kódují 3 isoformy (apoE2, apoE3, apoE4) [15]. Alela genu pro apoE4 je hlavním rizikovým faktorem pro vznik onemocnění a je spojována s dědičným typem AD. Zvýšený výskyt apoE je patrný v senilních  $A\beta$  placích a neurofibrilárních shlucích v posmrtném vyšetření mozku nemocných. U homozygotních pacientů s alelou E4 je mnohem častěji výskyt senilních plaků než u jiných. Tudiž, apoE4 může přispívat k patogenezi AD. V menší míře může docházet k mutaci genů. ApoE4 v tomto případě interaguje s APP, presenilinem 1 nebo presenilinem 2 [16].

### 3.1.2.5 *Oxidační stres a volné radikály*

Volné kyslíkové radikály (peroxyd, hydroxyskupina, singletový kyslík a oxid dusnatý) jsou látky tělu vlastní, které mají krátké trvání i své fyziologické funkce. U neurodegenerativních změn, vaskulárních mozkových poruch, mozkových traumat i dalších druhů postižení mozkové tkáně

jsou volné kyslíkové radikály vytvářeny nadměrně a vedou pak k řadě poškození mozkové tkáně. Dochází k peroxidaci lipidů neuronálních membrán, k inaktivaci některých enzymů [17].

### 3.1.3 Klinický obraz

AD se dělí na 3 stádia, které se dále rozlišují podle stupně samostatnosti nemocného, resp. podle rozsahu péče o něj. Vzhledem k vleklému průběhu této formy demence jsou i přechody mezi jednotlivými stupni pozvolné [7].

Neurodegenerativní procesy začínají většinou řadu let před prvními příznaky AD. Postižený nebo jeho blízcí si často nejprve všimnou ztráty paměti, zpočátku především krátkodobé epizodní, později se připojuje i dlouhodobá. K tomu se přidruží vyjadřovací potíže a ubývajících schopnost orientace v čase a prostoru. U mnoha nemocných začíná docházet ke změnám osobnosti, která se zvláště výrazně projeví v pokročilém stadiu nemoci. Postupně má pacient problémy i s každodenními dovednostmi, jako jsou hygienické návyky či přijímání potravy, jsou inkontinentní a plně odkázáni na pomoc okolí [2]. V terminální fázi nemocný většinou pobývá v ošetrovatelském ústavu. Nemoc trvá několik let, liší se délkou a průběhem, je nevléčitelná a po 5–10 letech končí pacientovou smrtí [18].

### 3.1.4 Diagnóza

Potvrzení diagnózy lze provést pouze histologickým vyšetřením tkáně, biopsií nebo diagnózou *post mortem*. Dochází k rozsáhlému zániku neuronů, především v mozkové kůře, mnohé ze zbývajících buněk obsahují mikroskopické shluky tvořené neurofibrilami [19].

Mezi klinická kritéria pravděpodobnosti demence patří DMS-4 (Diagnostický a statistický manuál duševních poruch, 4. vydání) a MKN-10 (Mezinárodní statistická klasifikace nemocí a přidružených zdravotních problémů, 10. revize). Podle jejich definic je porucha paměti, trvající alespoň půl roku, dominantní příznak. Zároveň je přidružena další kognitivní porucha jako je afázie, apraxie, agnózie a porucha exekutivní funkce. Dohromady způsobují zřetelné snížení úrovně fungování v sociálním a pracovním prostředí oproti předchozí úrovni [20].

Onemocnění má chronický charakter, pro posuzování je třeba vyloučit akutní poruchy v rámci somatického onemocnění nebo zpomalení psychomotorického tempa při únavě [10].

### 3.1.5 Rizikové faktory

Riziko onemocnění demencí zvyšuje, vedle stáří a prokazatelných dědičných vloh, i několik dalších faktorů, ke kterým patří vysoký krevní tlak, diabetes, poruchy srdečního rytmu, příliš vysoká hladina cholesterolu a homocysteinu, deprese, poranění hlavy a mozku a cévní mozková příhoda. K tomu je nutno připočítat i špatnou životosprávu, kouření, nadměrnou konzumaci alkoholu, nedostatek pohybu, nadváhu a stejně tak i nepatrnou duševní a společenskou aktivitu [21].

### 3.1.6 Léčba AD

Zatím nebyly nalezeny žádné natolik účinné látky, které by chorobu vyléčily úplně. Léčba je zaměřena především na zlepšení nebo stabilizaci kognitivních (poznávacích) funkcí, takto působící skupina léčiv se označuje jako kognitiva. Mírná až středně těžká forma AD je indikací pro léčbu inhibitory AChE (IChE), u těžké demence je předepisován memantin, jako antagonist receptorů pro *N*-methyl-D-aspartátovou kyselinu (NMDA) [20]. Účinnost dlouhodobé léčby nootropiky (např. piracetam, pyritinol, nicergolin) není dostatečně podložena [7].

Druhou metodou je terapie nekognitivních poruch, především deprese, agresivního chování nebo nespavost. Vynecháváme látky s anticholinergní aktivitou [10].

Nefarmakologická léčba spočívá hlavně v kognitivním tréninku a aktivizaci pacienta [20].

#### 3.1.6.1 *Inhibitory acetylcholinesteras*

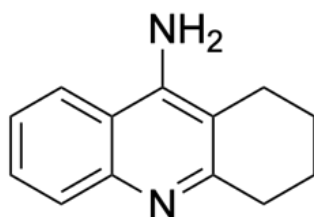
U pacientů s AD jsou postiženy především acetylcholinové mozkové neuronální dráhy vedoucí z bazální části předního mozku do mozkové kůry a hippocampu. Jejich hlavní úlohou je zajištění pozornosti, schopnosti učení, paměti. Prekurzory cholinu a IChE, působící v CNS, zvyšují nabídku ACh a zlepšují tak kognitivní schopnosti pacienta. Z klinických studií vyplývá dobrá účinnost reverzibilních inhibitorů rivastigminu, donepezilu a galantaminu a zároveň i jejich dobrá tolerance. Zlepšují schopnost vykonávat běžné denní aktivity pacientů, což vede ke zlepšení kvality života a k prodloužení období jejich soběstačnosti [22].



## Takrin

Prvním léčivem z této skupiny používaným u AD byl tetrahydroaminoakridin takrin, který měl ale závažné nežádoucí účinky, jako např. reverzibilní poruchy jaterních funkcí a nevýhodnou farmakokinetiku [23]. Byly zkoušeny i jiné deriváty, které však nebyly zavedeny do praxe, např. u nás 7-methoxytakrin [11].

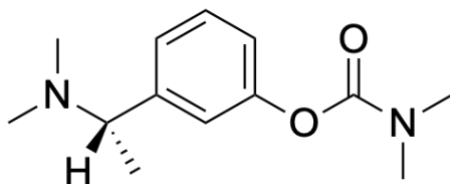
Nejčastější nežádoucí účinky, hlavně v období zvyšování dávek, jsou gastrointestinální příznaky – nechutenství, dyspepsie, průjemy, nauzea a zvracení, dále bradykardie, křeče, bolesti hlavy [12].



Obrázek 1 vzorec takrinu

## Rivastigmin

Rivastigmin je pseudoireverzibilním inhibitorem AChE a BuChE. Je jako jediný registrován také na léčbu demence u Parkinsonovy choroby. Jako všechny „stigminy“ patří i rivastigmin mezi deriváty karbamátového typu a jeho metabolizace probíhá samotnou AChE [24]. Má minimum lékových interakcí, a proto je vhodný pro pacienty užívající mnoho různých léčiv nebo antikoagulační léčbu. Terapie je symptomatická a indikace odpovídá mírné až středně těžké AD. Nově je k dispozici také ve formě transdermálních náplastí [25].

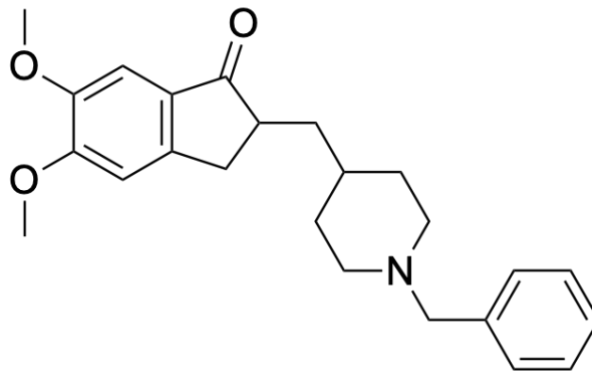


Obrázek 2 vzorec rivastigminu

## Donepezil

Donepezil je poměrně značně selektivní IACHe piperidinového typu. Existuje několik důkazů, že zároveň brání ukládání A $\beta$  v CNS, má antioxidantní vlastnosti a celkově neuroprotektivní

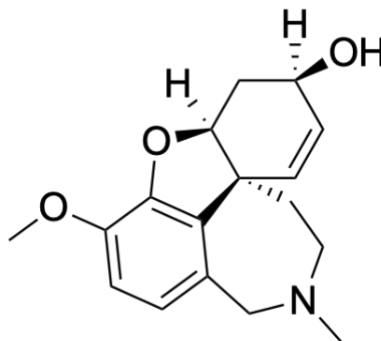
účinek [26]. Výhodou je velmi dlouhý biologický poločas dosahující 70 hodin. Jeho účinek přetrvává až 6 měsíců po ukončení terapie [27].



Obrázek 3 vzorec donepezilu

### *Galantamin*

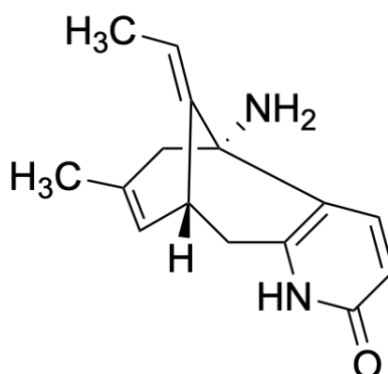
Dalším zástupcem IChE je galantamin s benzazepinovou strukturou. Původně byl izolován jako alkaloid z *Galanthus woronowii* Losinsk [28]. Jako jediný je navíc alosterickým modulátorem centrálních pre- i postsynaptických nikotinových receptorů, což ještě více zesiluje cholinergní přenos [29].



Obrázek 4 vzorec galantaminu

## Huperzin A

Z rostliny *Huperzia serrata* (Thunb. ex Murray) Trevisan byl izolován lykodinový alkaloid huperzin A, působící jako reverzibilní IChE a zároveň jako antagonist NMDA receptorů. Vedle ostatních IChE je huperzin A 2–8× účinnější dlouhodobě zvýšit hladinu ACh v cerebrálním kortexu. Připisují se mu i antioxidační účinky a zmírnění apoptických procesů způsobených neurotoxickým působením  $A\beta$  [30]. V Číně je dostupný jako léčivo první volby v léčbě AD, u nás není registrovaný, ale nachází se v některých doplňcích stravy [31].



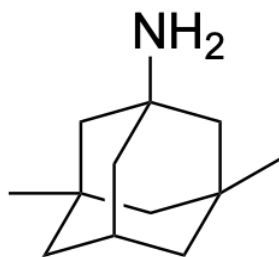
Obrázek 5 vzorec huperzinu A

### 3.1.6.2 Inhibitory NMDA receptorů

S postupující progresí AD dochází k poškození mozkového systému excitačních aminokyselin (glutamátového systému). Tento systém je velmi významný pro mechanismus učení a paměti. U AD a dalších neurodegenerativních onemocnění dochází k nadměrnému uvolňování molekul glutamátu i dalších excitačních kyselin. Na receptorové úrovni pak dochází k tvorbě přenosových šumů [9].

#### Memantin

Memantin je derivátem adamantanu. Je nekompetitivním parciálním antagonistou NMDA receptorů pro excitační neuromediátor glutamát. Memantin brání, vazbou uvnitř kanálu receptoru, aktivaci NMDA receptoru při zvýšené hladině glutamové kyseliny, která je přítomna v CNS při AD. Memantin zlepšuje krátkodobou paměť a používá se pro léčbu v pokročilejších stadiích choroby [32]. Jeho neuroprotektivní účinky jsou využívány také v léčbě Parkinsonovy nemoci, traumatech CNS aj. [33]. Nově bylo zjištěno, že memantin působí inhibičně na enzym GSK-3 $\beta$ , což je enzym spouštějící degeneraci intraneuronálního  $\tau$ -proteinu [34].



Obrázek 6 vzorec memantinu

### 3.1.6.3 Ostatní kognitiva – prekurzory syntézy ACh

#### *Lecitin*

Z ostatních kognitiv jsou někdy používány látky, které zvyšují aktuální lokální nabídku ACh. Jsou to především sójové lecitiny nebo cholin-alfoscerát. U těchto látek však nebyl prokázán dostatečný efekt, což je vysvětlováno především malou prostupností přes hematoencefalickou bariéru (HEB). Sójové lecitiny a cholin-alfoscerát se používají jako nutraceutika k zajištění dostatečného přívodu fosfolipidů nebo jako pomocná léčiva při základní terapii IChE či k zmírnění anticholinergních účinků při terapii některými antiparkinsoniky, antidepresivy a antipsychotiky [23].

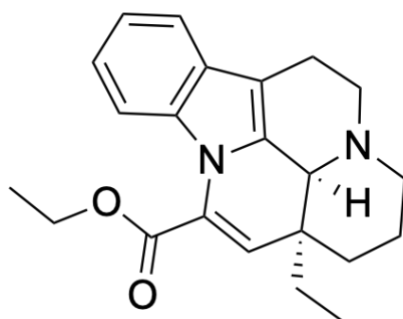
### 3.1.6.4 Nootropika

Mechanismus a účinnost nootropik nejsou dostatečně ověřeny. Do jisté míry však zlepšují oxidativní a glukosový metabolismus neuronů. Léčiva raději podáváme nitrožilní infúzí, jelikož u pacientů, kteří jsou neklidní a nejsou orientováni v čase ani místě, dochází k poddávkování vlivem zapomnětlivosti [35].

Ke klasickým nootropikům patří piracetam a pyritinol, ovlivňují metabolické procesy v nervových buňkách a zlepšují mikrocirkulaci. Dihydropyridinový blokátor vápenatých kanálů nimodipin zlepšuje prokrvení ischemických ložisek a brzdí také rozvoj demence. U starších pacientů jsou rozšířenými a osvědčenými léčivy dihydroergotoxin, nicergolin a vinpocetin. Tato léčiva příznivě ovlivňují příznaky mozkové ischemie a mnoho psychických příznaků související se stárnutím mozku [23].

## Vinpocetin

Vinpocetin je semisyntetický derivát vinkaminu, který byl poprvé syntetizován v 60. letech minulého století. Prochází přes HEB a dostává se tak přímo do mozku. Má antioxidační, vazodilatační a neuroprotektivní účinky, zlepšuje mikrocirkulaci, a zvyšuje tak vstřebávání a spotřebu glukosy a kyslíku, tím stimuluje metabolismus mozkové tkáně [36]. V současné době je registrován jako léčivý přípravek Cavinton<sup>®</sup>, který se používá při symptomatické léčbě cerebrovaskulárních poruch různého původu, jako je vaskulární demence nebo hypoperfúze způsobená ischemickými stavy [37].



Obrázek 7 vzorec vinpocetinu

## Ginkgo biloba

*Ginkgo bilobae extractum* je standardizovaný extrakt z listů jinanu dvoulaločnatého [38]. Jedná se o nootropikum s vazodilatačním a mírným antiagregačním účinkem, zároveň vychytává volné kyslíkové radikály. Využívá se především u starších pacientů při cerebrovaskulární nedostatečnosti, např. poruchy paměti, pozornosti, emoční labilita, dále při poruchách prokrvení, závratích, tinnitu [39].

### 3.1.6.5 *Další potenciální zásahy v léčbě AD*

Nově zkoumaná léčiva jsou převážně cílena na ovlivnění amyloidové kaskády za předpokladu, že primárním etiopatogenetickým mechanismem je ukládání neuritických plaků, které vznikají chybným štěpením APP  $\beta$ - a  $\gamma$ -sekretasou za vzniku neurotoxického A $\beta$  [31].

#### *Inhibitory sekretas*

Inhibitory  $\beta$ -sekretasy hůře procházejí přes HEB a ovlivnění kognitivních funkcí není příliš významné. Inhibitory  $\gamma$ -sekretasy mají závažné nežádoucí účinky na imunitní systém. Byly testovány i modulátory  $\gamma$ -sekretasy (tarenflurbil) a látky blokující oligomeraci a polymeraci částecek A $\beta$  (tramiprosat), které však neprokázaly významnou účinnost v léčbě AD a z těchto důvodů se žádná léčiva zatím klinicky neuplatnila [34].

#### *Imunizace*

Podstatou pasivní imunoterapie je zvýšení hladiny IgG protilátek bránící tvorbě A $\beta$  tak, že napomáhají vylučování A $\beta$  z mozku a mají protektivní efekt proti jeho neurotoxicitě. Účinnost je vyšší u časných stadií AD, kdy se ukládá toxický A $\beta$ . Ve fázi klinického testování je řada látek, jako jsou monoklonální protilátky (bapineuzumab, gantenerumab a solanezumab) nebo intravenózně podávané imunoglobuliny [40].

#### *Plazmaferéza*

Plazmaferéza snižuje sérovou koncentraci A $\beta$ , a nepřímo tím i v likvoru. Terapie se využívá za předpokladu dynamické rovnováhy mezi koncentrací A $\beta$  v krvi a likvoru. Léčba je náročná v několika ohledech, jako je personální zatížení, monitoring pacienta nebo zajištění centrálního žilního katétru. První dostupné výsledky však prokazují zlepšení kognitivních funkcí [41].

#### *Inhibitory prolyl oligopeptidasy*

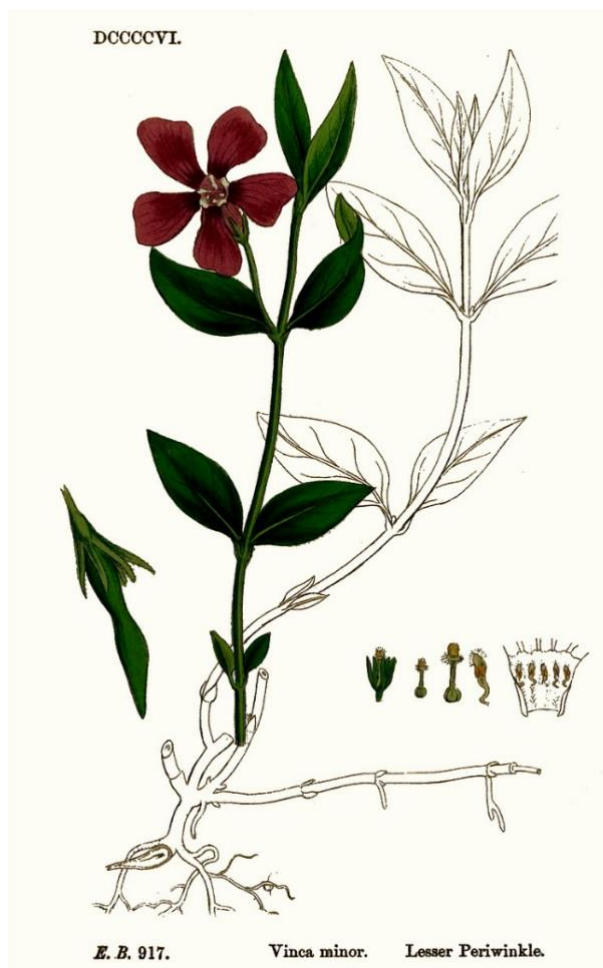
Prolyl oligopeptidasa (POP) je serinová peptidasa štěpící malé, peptidům podobné hormony, neuropeptidy a jiné buněčné faktory v místě, kde se nachází aminokyselina prolin. Tato peptidasa bývá spojována s fyziologickými procesy jako jsou učení a paměť, ale také s psychiatrickými onemocněními. Byl zjištěn vyšší výskyt POP v mozku u pacientů s AD [42]. Přesný mechanismus účinku dokazující zásah POP do tvorby paměti a učení nebyl potvrzen

a je stále zkoumán. Je možné, že inhibitory POP zlepšují paměť tím, že inhibují metabolismus endogenních neuropeptidů, které za normálních okolností zvyšují kognitivní vlastnosti [43].

### *Inhibitory GSK-3 $\beta$*

GSK-3 $\beta$  je považována za molekulární spojení mezi dvěma histopatologickými znaky nemoci, A $\beta$  a  $\tau$ -proteinem [9]. Její dysregulace podporuje zánětlivé procesy v mozkové tkáni. Selektivní inhibitory GSK-3 $\beta$  brání hyperfosforylaci a následné polymeraci intraneuronálního  $\tau$ -proteinu. Mezi zkoušenými látkami je tideglusib, výsledky zatím neprokazují dostatečné klinický efekt [44].

## 3.2 *Vinca Minor* L. – barvínek menší



Obrázek 8 *Vinca minor* L. [95]

### 3.2.1 Taxonomické zařazení

Tabulka 1 taxonomické zařazení *Vinca minor* L. [38]

Říše:	Plantae
Oddělení:	Magnoliophyta
Třída:	Rosopsida
Řád:	Gentianales
Čeleď:	Apocynaceae
Rod:	<i>Vinca</i> L.
Druh:	<i>Vinca minor</i> L. - barvínek menší



## 3.2.2 Čeleď Apocynaceae

☞ \* K(5) [C(5-4) A5] G(2) [5]

Čeleď zahrnuje vytrvalé byliny, polokeře a keříky, v tropech a částečně v subtropích převážně jako dřevinné liány, keře nebo stromy. Obsahové látky jsou zastoupeny kardioaktivními glykosidy, indolovými alkaloidy, sekoiridoidními a iridoidními monoterpeny, a také kaučuky (polyterpeny) rozptýlenými v latexu. Některé alkaloidy se využívají terapeuticky, jiné tvoří součást smrtelně jedovatých šípových jedů [33].

## 3.2.3 Rod *Vinca*

Rod *Vinca* zahrnuje 7 známých druhů rostoucích v Evropě, severozápadní Asii a severní Africe, mezi něž patří *Vinca minor* L., *Vinca major* L., *Vinca erecta* Regel & Schmalh., *Vinca herbacea* Waldst. & Kit., *Vinca difformis* Pourret, *Vinca soneri* Koyuncu [46] a poslední *Vinca ispartensis* Koyuncu & Eksi [47]. U nás rostou první dva jmenované, tedy *Vinca minor* L. a *Vinca major* L. [48].

*Vinca major* L.

Českým názvem barvínek větší, je na bázi dřevnatějící celoročně stálezelená bylina, která je domácí především v teplejších oblastech Středomoří, ale setkáváme se s ní i u nás [49]. Od barvíнку menšího se odlišuje svou větší velikostí a tvarem okrajů listů, jež jsou mírně brvité. Kvete od března do července v modré až fialové, u středu bělavé květy [50].

*Vinca herbacea* Waldst. & Kit.

Česky barvínek bylinný je mírně jedovatá bylina, která u nás neroste, na Slovensku je chráněná. Vyskytuje se na hlavně na vápencových půdách Balkánu, Maďarska, Rakouska, jihu Ruska a Íránu. Rostlina je poléhavá, během zimy odumírá celá její nadzemní část. Okraje listů i květů jsou brvité. Kvete od května do června a často i v září v modrofialové, zřídka bílé květy [51].



Obrázek 9 *Vinca major* L. [96]



Obrázek 10 *Vinca herbacea* Waldst. & Kit. [97]

### *Vinca erecta* Regel & Schmalh.

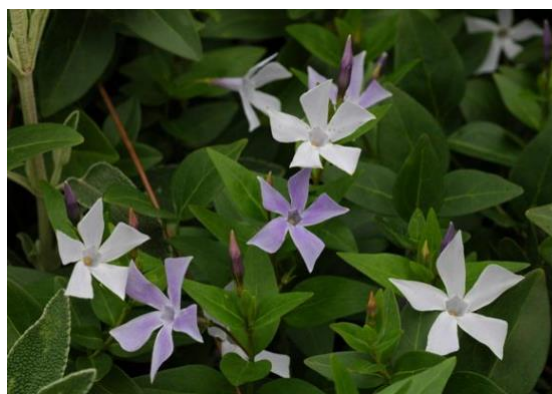
Bylinná trvalka rostoucí na území Kyrgyzstánu, Tádžikistánu, Uzbekistánu a Afganistánu. Stonek je vztyčený, 15–50 cm vysoký. Kvete od dubna ve světle fialové až bílé květy [52].

### *Vinca difformis* Pourret

Stejnomeně také *Vinca acutiflora* Bertol. ex Koch nebo *Vinca media* Hoffmanns. & Link, je stálezelený polokeř. Květy jsou bledě modré, občas bílé v období od února až do května [53]. Nejčastěji bývá zastrčen v stinné vlhké oblasti západního Středomoří. Od *V. major* se odlišuje tím, že má o něco málo menší květy, kvete dříve a nemá brvité okraje listů [54].



Obrázek 11 *Vinca erecta* Regel & Schmalh. [98]



Obrázek 12 *Vinca difformis* Pourret [99]

### *Vinca soneri Koyuncu*

Na kamenných suchých stráních Turecka byl nalezen v 90. letech minulého století další druh barvínku. Od ostatních se liší vzpřímeným postavením, tmavě zelenými listy a bledě modrými až bílými květy. Doba květu je od května do června. Nadzemní část rostliny během zimy hyne [46].

### *Vinca ispartensis Koyuncu & Eksi*

Poslední nedávno objevený druh na suchých kamenných stráních je vytrvalý polokeř. Kvete od dubna do května v namodralé květy. Během zimy opadají listy a odumírá celá jeho nadzemní část [47].



Obrázek 13 *Vinca soneri* Koyuncu [100]



Obrázek 14 *Vinca ispartensis* Koyuncu & Eksi [101]

## 3.2.4 Botanická charakteristika *Vinca minor* L.

Barvíněk je polokřovitá, vytrvalá bylina. Jeho oddenek s lodyhou je tenký, válcovitý, plazivý, až 70 cm dlouhý, při bázi dřevnatějící [5]. Lodyžní listy má krátce řapíkaté, kopinaté až eliptické, tupé nebo krátce špičaté, kožovité, na svrchní straně lesklé a vždy zelené. Jednotlivé, dlouze stopkaté květy jsou v úžlabí listů. Mají pětidílný kalich a nálevkovitou, pěticipou, nejčastěji modrou, zřídka bílou korunu. Kvete od března do června. Plodem je dvojitý měchýřek. Rozmnožuje se převážně pomocí oddenků [55].



Obrázek 15 list *Vinca minor* L. [102]



Obrázek 16 rostlina *Vinca minor* L. [102]



Obrázek 17 květ *Vinca minor* L. [102]



Obrázek 18 větvíčka *Vinca minor* L. [102]

### 3.2.5 Nároky na prostředí

Domácí je v Evropě, hranice rozšíření se táhne od severozápadu Pyrenejského poloostrova až k Podněpří, na severu sahá přibližně ke střednímu Německu a ČR. Byl zavlečen i dále na sever a na jiné kontinenty. Je jediný u nás volně rostoucí zástupce čeledi Apocynaceae. Vyskytuje se přibližně do nadmořské výšky 800 m, v pásmu podhůří až pahorkatin [56]. Běžně roste v chladných lesích, v křovinách a na zarostlých skalách. Často se pěstuje jako půdopokryvná rostlina v zahrádkách a parcích a někdy zplaňuje [57].

### 3.2.6 Využití v lidové medicíně

Barvíněk, též jako brčál je znám již od starověku, dříve býval hojně užíván v léčitelství, dnes už jen minimálně [58]. Sbíranou částí je nať, *Herba vincae*, sběr trvá od června do července, suší se ve stínu nebo uměle při teplotě do 45 °C. Droga snižuje krevní tlak, potlačuje dráždivý kašel, působí sedativně a bývá užívána při cukrovce. Potlačuje rovněž krvácivé stavy různého

původu. V lidovém léčitelství se požívá ve formě nálevů, při dávkování 1 čajová lžička na šálek vody, denně 2 šálky [4].

### 3.2.7 Sekundární metabolity

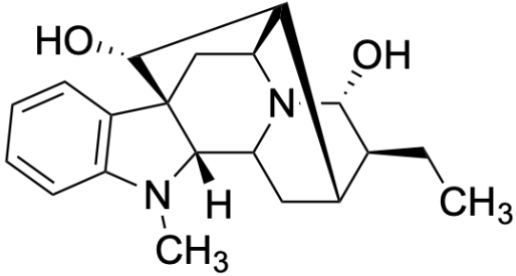
Droga obsahuje 0,3–1 % alkaloidů. Největší zastoupení má vinkamin, představuje kvantitativně okolo 10 % veškerého množství alkaloidů, proto se dnes rostlina využívá převážně k jeho izolaci [58]. Vedle vinkaminu se vyskytuje přibližně 30 jiných indolových alkaloidů ajmalinového, akuamminového, eburnaminového, oxindolového a sarpaginového typu [59].

#### 3.2.7.1 Strukturní typy Vinca alkaloidů

##### *Ajmalinový typ*

Alkaloidy čeledi Apocynaceae strukturně odvozené od ajmalinu, který se nejhojněji vyskytuje v rodu *Rauwolfia*. Díky své farmakologické aktivitě, blokádě srdečních draselných kanálů, se řadí mezi antiarytmika Ia třídy [60].

Tabulka 2 Ajmalinové alkaloidy

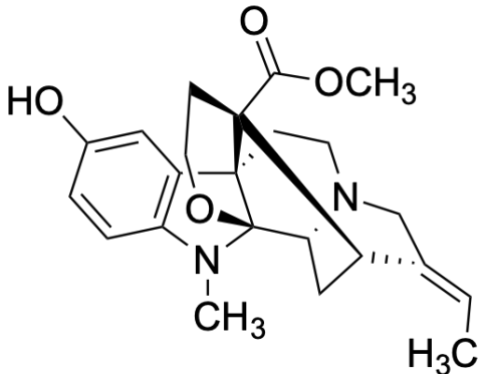
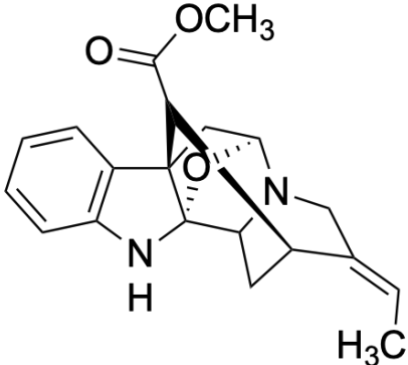
ajmalin [61]	
--------------	--

##### *Akuamminový typ*

Akuammin je hlavní alkaloid izolovaný ze semen *Picralima Klaineana* a *P. nitida* (Apocynaceae). Nezávisle na to byl později izolován vinkamajordin z *Vinca major* L., který měl stejnou strukturu. Z tohoto důvodu se řadí k *Vinca* alkaloidům [62].



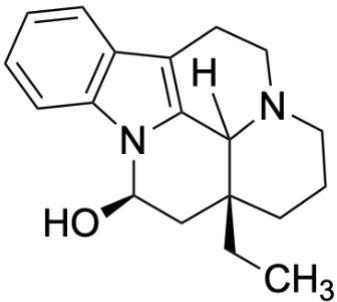
Tabulka 3 Akuamminové alkaloidy

<p>akuammin = vinkamajordin [71,72]</p>	
<p>pikrinin [65]</p>	

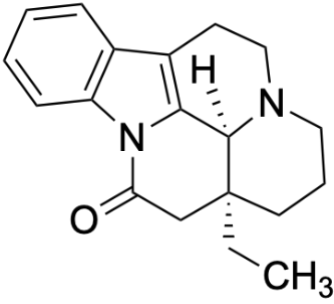
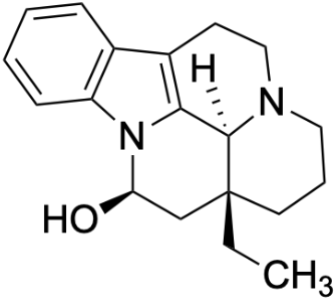
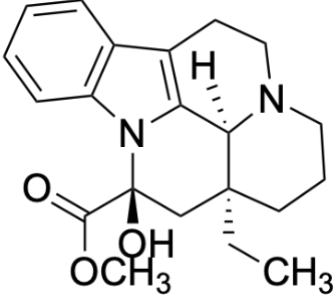
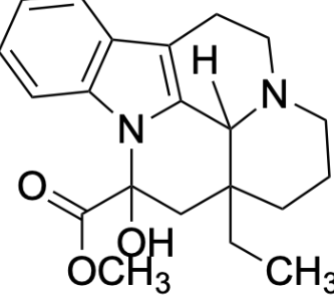
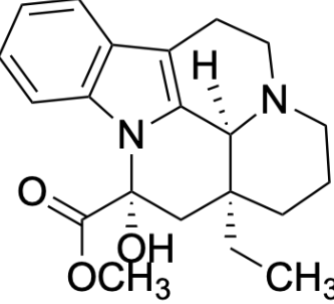
### Eburnaminový typ

Alkaloidy tohoto typu jsou odvozeny od vinkanu nebo eburnanu. Oba se nacházejí v rodu *Vinca* a jsou si navzájem enantiomery [66].

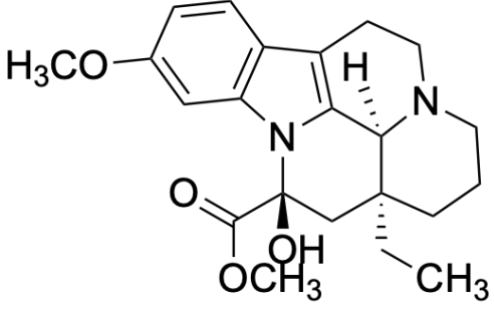
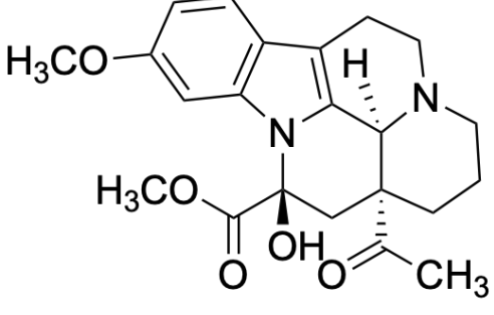
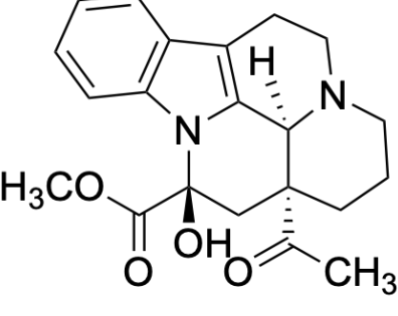
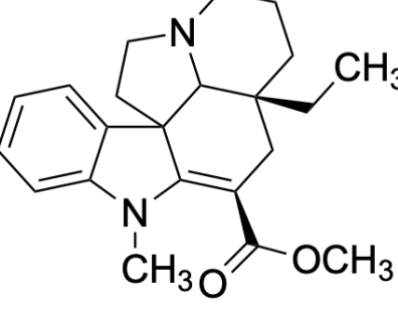
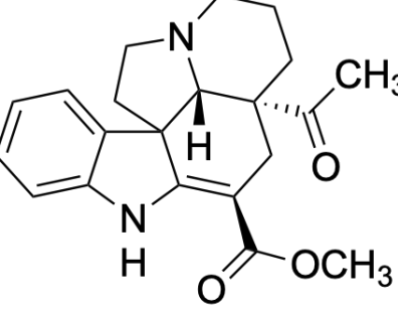
Tabulka 4 Eburnaminové alkaloidy

<p>(-)-eburnamin [67]</p>	
---------------------------	--

Tabulka 4 Eburnaminové alkaloidy (pokračování)

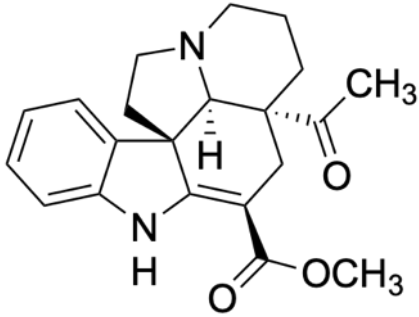
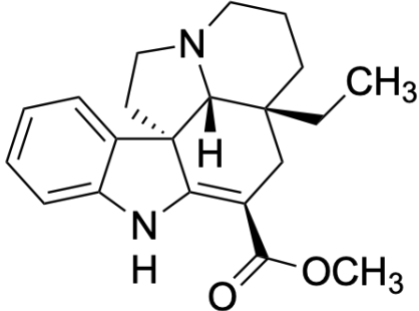
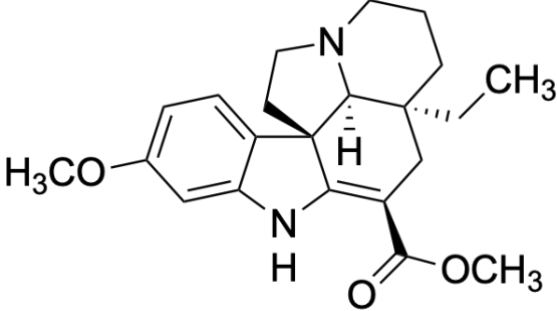
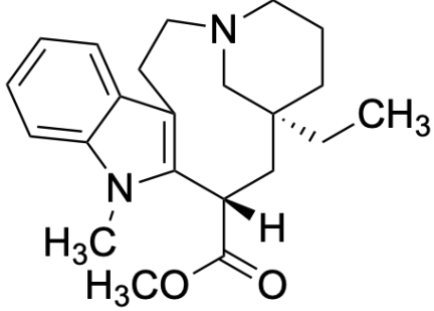
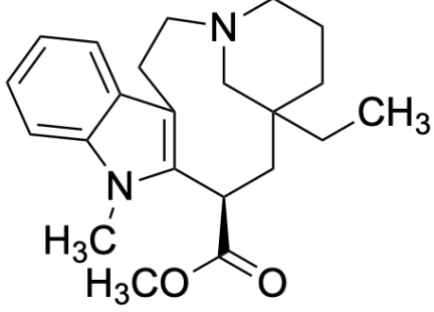
<p>(±)-eburnamonin [67,68]</p>	
<p>(+)-isoeburnamin [67]</p>	
<p>vinkamin [69,70]</p>	
<p>isovinkamin [68]</p>	
<p>16-epivinkamin [67,68]</p>	

Tabulka 4 Eburnaminové alkaloidy (pokračování)

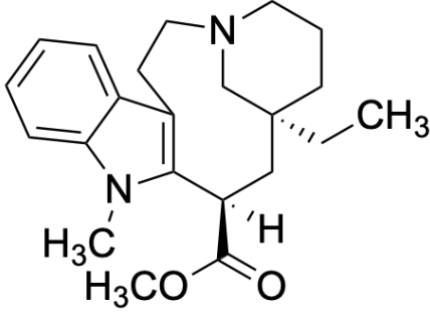
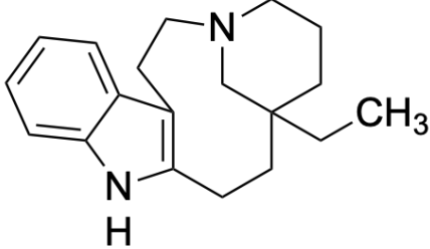
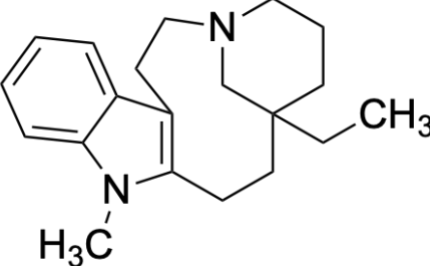
<p>11-methoxyvinkamin = vincin [71]</p>	
<p>vincinin [71]</p>	
<p>vinkaminin = vinkarein [71]</p>	
<p>minovin [72,73]</p>	
<p>minovincin [70]</p>	



Tabulka 4 Eburnaminové alkaloidy (pokračování)

<p>minovincinin [74]</p>	
<p>(±)-vinkadiformin = ervamin [69]</p>	
<p>16-methoxyvinkadiformin [74]</p>	
<p>vinkaminorin [70]</p>	
<p>vinkaminoridin [75]</p>	

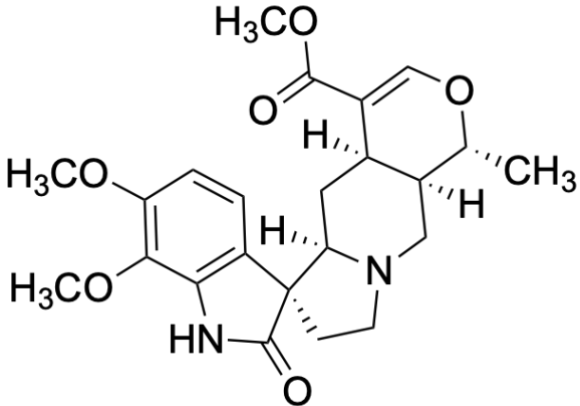
Tabulka 4 Eburnaminové alkaloidy (pokračování)

<p>vinkaminorein [70]</p>	
<p>(+)-kebračamin [67]</p>	
<p>(±)-N-methylkebračamin [68]</p>	

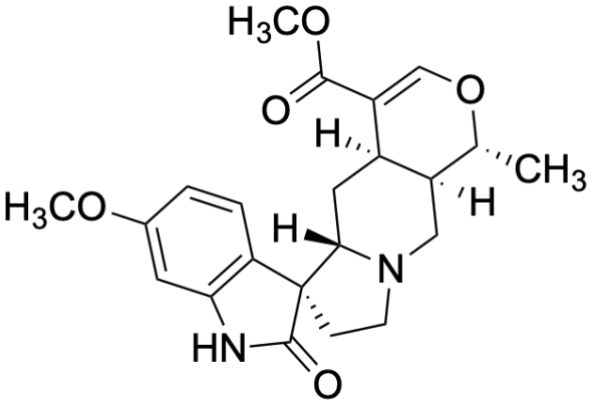
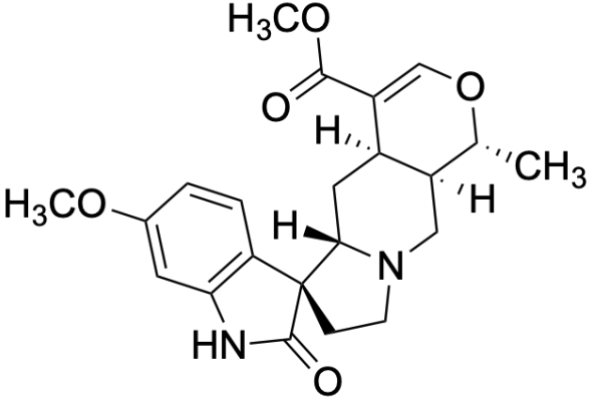
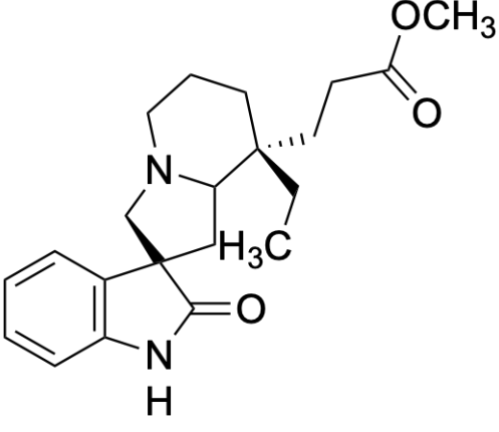
### Oxindolový typ

Alkaloidy tohoto typu byly poprvé izolovány z *Gelsemia sempervirens* [54].

Tabulka 5 Oxindolové alkaloidy

<p>majdin [68,74]</p>	
-----------------------	--

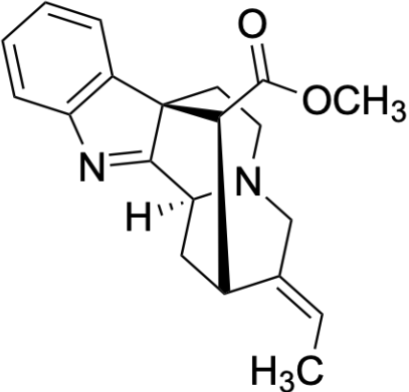
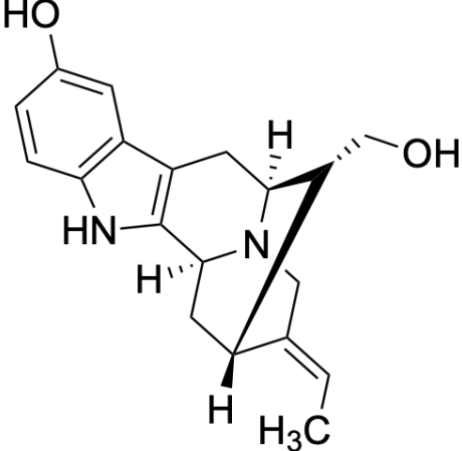
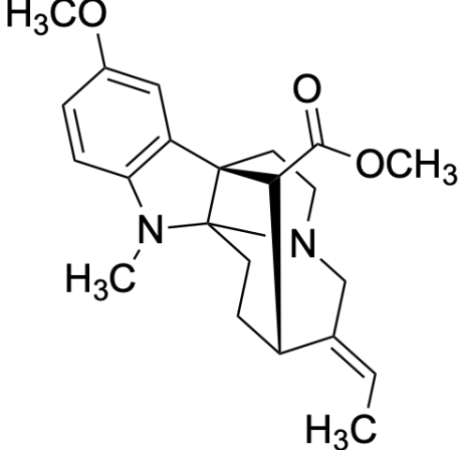
Tabulka 5 Oxindolové alkaloidy (pokračování)

<p>vinerin [74]</p>	
<p>vineridin [59]</p>	
<p>(±)-vinkatin [74]</p>	

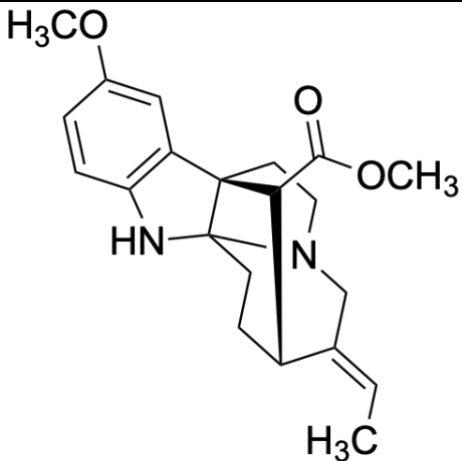
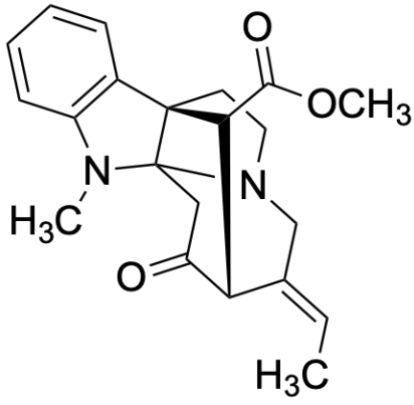
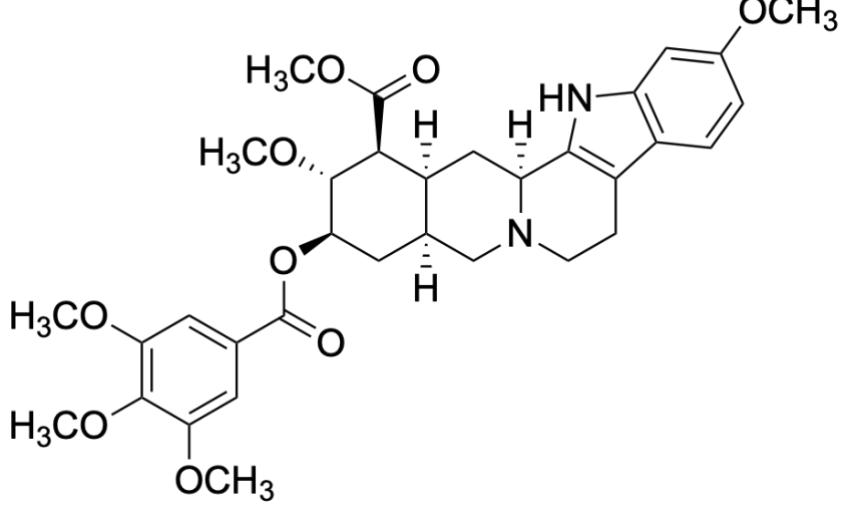
### Sarpaginový typ

Indolové alkaloidy sarpaginového typu byly izolovány hlavně z rodu *Alstonia* a *Rauwolfia* čeledi Apocynaceae. Byly hojně využívány v lidovém léčitelství proti různým nemocem. Mají významné protinádorové, antibakteriální, antiarytmické, protizánětlivé a antimalarické účinky [49].

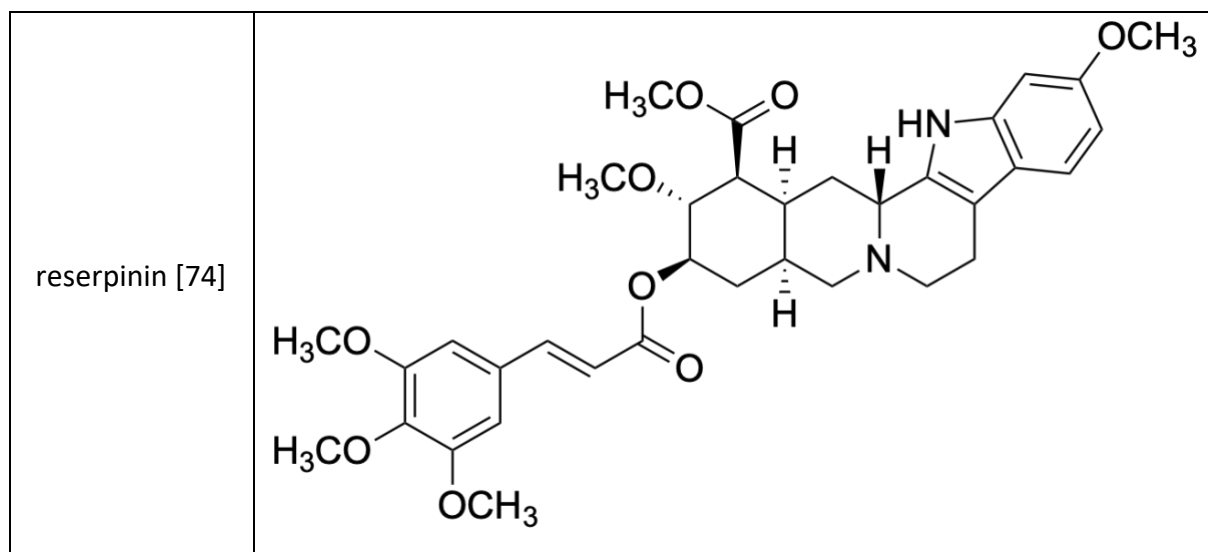
Tabulka 6 Sarpaginové alkaloidy

<p>striktamin = vinkamidin [74]</p>	
<p>sarpagin [77]</p>	
<p>vinkorin [77]</p>	

Tabulka 6 Sarpaginové alkaloidy (pokračování)

<p>(-)-1-norvinkorin [78]</p>	 <p>The structure shows a bicyclic indole alkaloid core. It features a methoxy group (H<sub>3</sub>CO) at the 5-position of the indole ring, a secondary amine (HN) at the 3-position, and a methyl ester group (-COOCH<sub>3</sub>) at the 1-position. A vinyl group (-CH=CH<sub>2</sub>) is attached to the 2-position of the bicyclic system.</p>
<p>vinkoridin [75]</p>	 <p>The structure shows a bicyclic indole alkaloid core. It features a methyl group (H<sub>3</sub>C) at the 3-position of the indole ring, a methyl ester group (-COOCH<sub>3</sub>) at the 1-position, and a carbonyl group (=O) at the 2-position. A vinyl group (-CH=CH<sub>2</sub>) is attached to the 2-position of the bicyclic system.</p>
<p>reserpin [74]</p>	 <p>The structure shows a complex pentacyclic alkaloid. It features a central piperidine ring system with multiple methoxy groups (H<sub>3</sub>CO) and methyl ester groups (-COOCH<sub>3</sub>) attached. The structure is highly substituted with various functional groups and stereocenters.</p>

Tabulka 6 Sarpaginové alkaloidy (pokračování)



### 3.2.8 Alkaloidy *Vinca minor* L. a jejich biologická aktivita

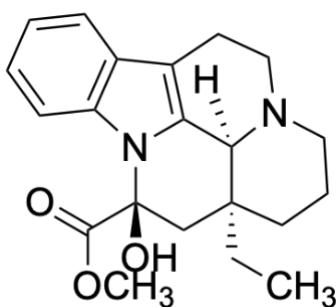
Tabulka 7 alkaloidy *Vinca minor* L. a jejich biologická aktivita

akuammicin	<i>in vitro</i> zvýšené vstřebávání glukosy adipocyty [79] <i>in vivo</i> agonista $\kappa$ -opioidních receptorů [64]
majdin	<i>in vitro</i> antioxidační, chelatační, proapoptický účinek [74]
pikrinin	<i>in vitro</i> inhibice 5-lipoxygenasy <i>in vivo</i> analgetický a protizánětlivý účinek (inhibice COX-1, COX-2) [80]
reserpinin	hypotenzní účinek [74]
vinkadiformin	<i>in vitro</i> cytostatický účinek proti leukemickým buňkám P388 [73]
vinkamidin = striktamin	<i>in vitro</i> selektivní inhibice COX-2, inhibice monoaminoxidas <i>in vivo</i> účinek proti adenovirům a HSV, inhibice monoaminoxidas [81]
vinkaminorein	silný cytotoxický účinek proti leukemickým buňkám P388 [70]
vinkaminorin = aspidospermin	silný cytotoxický účinek proti leukemickým buňkám P388 [55]
vinkanidin	emetický účinek [82]
vinkanin	analeptikum při onemocněních CNS, léčba neuritid zvukového nervu [82]
vinkarubin	cytotoxický účinek proti P388 leukemickým buňkám [70]

## Vinkamin

Vinkamin je kvantitativně nejvíce zastoupeným alkaloidem listů rostliny *Vinca minor* L., ze kterého byl i v 50. letech minulého století izolován. Nachází se však i v dalších druzích čeledi Apocynaceae, jako je *Vinca major* L. nebo *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. [28]. Struktura eburnaminového typu byla určena z počátku 60. let minulého století českými vědci [83].

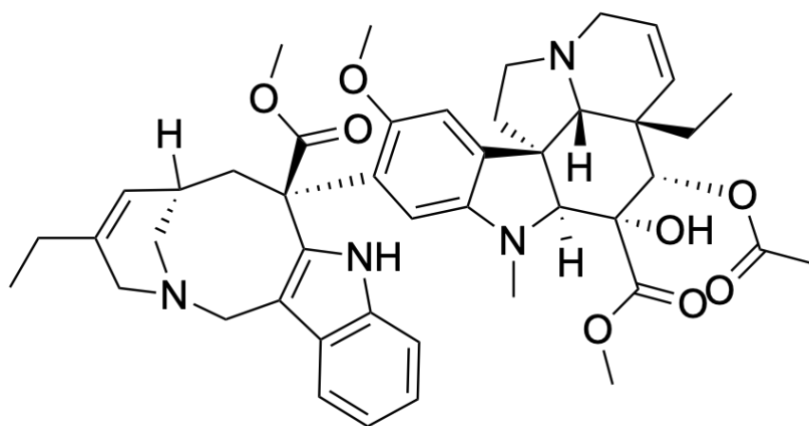
Jeho prokázané účinky na oběhový systém jsou snížení krevního tlaku a změna srdečního výdeje a tepu. V CNS má schopnosti vazodilatační a zlepšuje se tak perfúze mozku, proto je důležitým lékem u mozkových poruch, roztroušené sklerózy a při pooperačních stavech. Jako nootropikum se využívá při léčbě neurodegenerativních onemocnění, jako je AD a Parkinsonova choroba [84].



Obrázek 19 vzorec vinkaminu

## Vinorelbin

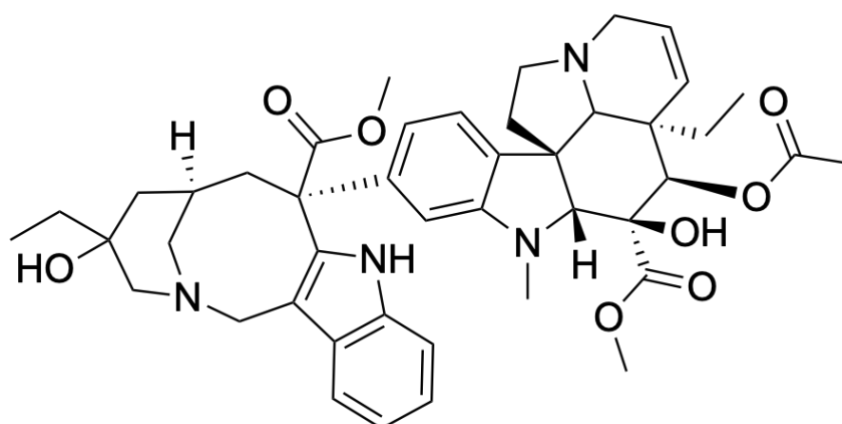
Polosyntetickou cestou se z vinblastinu získává vinorelbin, který působí stejným mechanismem účinku [85]. Podává se u metastazujících pokročilých nádorů vaječníků, jícnu, při terapii u neuroblastomu, osteosarkomu či u akutních leukémií. V kombinaci s *cis*-platinou se používá u karcinomu plic [86].



Obrázek 20 vzorec vinorelbinu

### Vinblastin

Vinblastin byl původně izolován v 50. letech minulého století z rostliny *Catharantus roseus*, ve kterém se nachází nejhojněji [85]. Používá se při terapii některých druhů leukémií, např. u Hodgkinova a non-Hodgkinova lymfomu nebo u jiných typů karcinomu jako je pokročilá fáze zhoubného nádoru varlete, močového měchýře a ledvin, také u Kaposiho sarkomu. Mechanismus účinku spočívá v zastavení M-fáze buněčného cyklu, tedy k inhibici syntézy mikrotubulů. Chemoterapeutikum je nespecifické a s ním souvisí i řada nežádoucích účinků, protože působí i na buňky nezasažené nádorovým bujením. Mezi ně patří myelosuprese, neurotoxická, gastrotoxická a v neposlední řadě také imunosuprese. Abychom mohli jeho vedlejším účinkům předcházet, kombinujeme podávání s netoxickými pomocnými látkami [86].

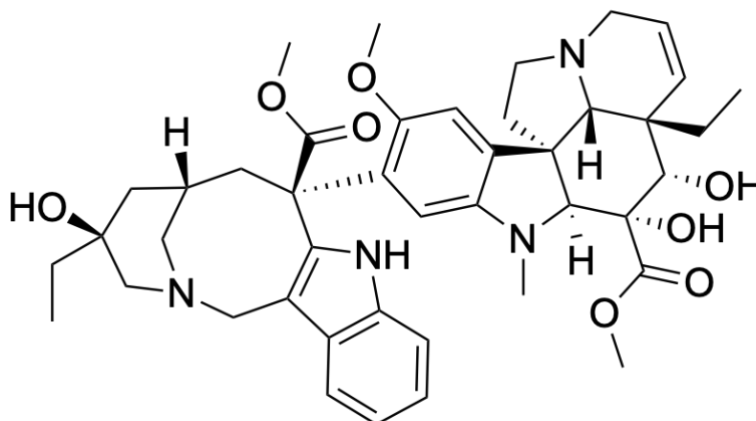


Obrázek 21 vzorec vinblastinu



## Vindesin

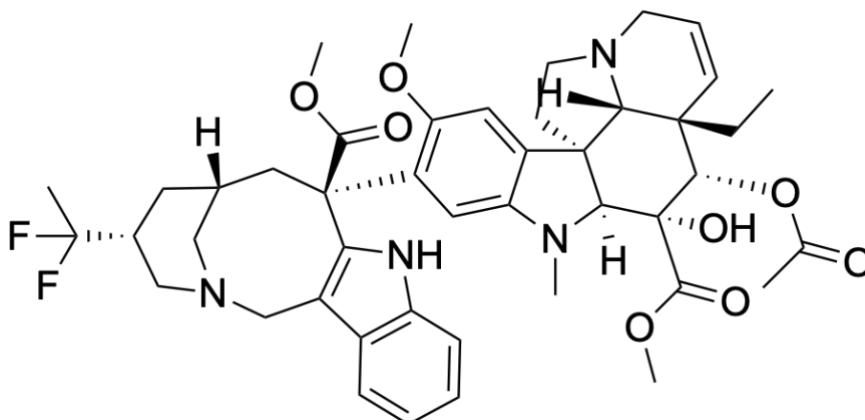
Vindesin je další polosyntetický derivát vinblastinu [85]. Působí v M-fázi buněčného cyklu tak, že zastavuje polymeraci tubulinu.[86] V praxi se využívá především u lymfocytární leukémie u dětí, pokud je léčba vinkristinem neúčinná. Další indikací je rakovina maligního melanomu, rakovina prsu, tlustého střeva a konečníku [87].



Obrázek 22 vzorec vindesinu

## Vinflunin

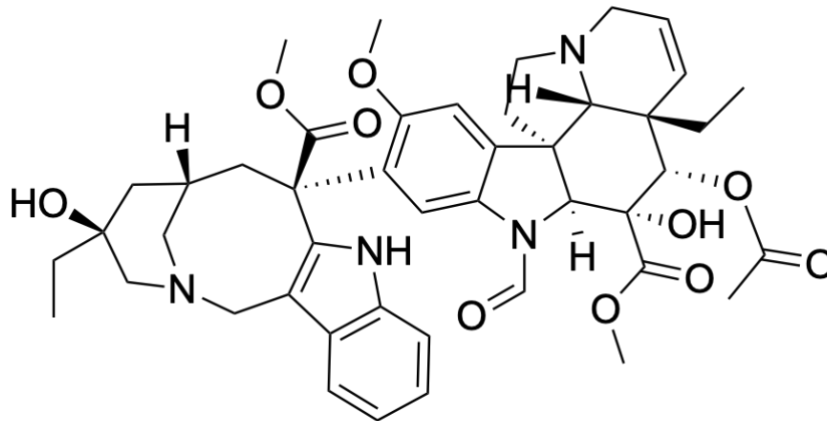
Prvním fluorovaným Vinca alkaloidem je vinflunin, jež je derivát vinorelbinu [85]. Zastavuje buněčný cyklus vazbou přímo na tubulin a navozuje apoptózu buněk, oproti ostatním derivátům je tak méně toxický. Používá na léčbu karcinomu močového měchýře po předchozím selhání léčby *cis*-platinou, dále pak u rakoviny prsu a plic [88].



Obrázek 23 vzorec vinfluninu

## Vinkristin

Vinkristin, stejně jako jemu velmi podobný alkaloid vinblastin se získává z rostliny *Catharanthus roseus*, a taktéž strukturně patří mezi tzv. *Iboga* indolové alkaloidy [85].



Obrázek 24 vzorec vinkristinu

Z hlediska mechanismu účinku se nenávratně váže na mikrotubuly v S-fázi buněčného cyklu a blokuje tak vznik mitotického vřeténka. Je méně myelosupresivní než vinblastin, a proto bývá častěji využíván v chemoterapeutických procesech [89]. Nejčastěji se používá v terapii akutní lymfocytární leukemie a nádorů mozku. Hlavní nežádoucí účinek je neuropatická bolest [90].

## 4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 4.1 Všeobecné postupy

#### 4.1.1 Příprava a čištění rozpouštědel

Všechna používaná komerční rozpouštědla byla předem přečištěna destilací. Chráněna před světlem během uchování byla v tmavých skleněných stojátkách nebo v plechových kanystrech a uložena v kovové skříni.

#### 4.1.2 Příprava litých desek na preparativní TLC

Skleněné desky o rozměru 15 × 15 cm byly před použitím vyčištěny chloroformem a poté ethanolem. Následně byla na suché a očištěné desky nanášena homogenní suspenze, která odpovídala dávce 6,5 g silikagelu pro preparativní TLC a 20 ml vody na jednu skleněnou desku. Tato směs byla na deskách důkladně rozetřena a poté se nechala schnout při pokojové teplotě alespoň po dobu 24 hod před jejich použitím.

#### 4.1.3 Tenkovrstvá chromatografie

Tenkovrstvá chromatografie probíhala standardním způsobem ve vyvíjecích komorách, nasycených parami zvolené mobilní fáze. Po nanášení vzorku v roztoku na komerční hliníkové desky o šířce 0,2 mm nebo lité desky pro preparativní TLC, byly desky před vložením komor vysoušeny proudem teplého vzduchu (odstranění rozpouštědla ze vzorku na TLC desce). Po zakrytí víkem se desky nechaly vyvíjet, dokud nedosáhly jejího čela. V případě potřeby se desky nechaly vyvíjet v dané vyvíjecí soustavě víckrát.

#### 4.1.4 Sloupcová chromatografie

Pro sloupcovou chromatografii byl použitý neutrální oxid hlinitý pro sloupcovou chromatografii 50–200  $\mu\text{m}$ , který byl nejprve připraven plně aktivní při 200 °C po dobu 12 hodin. Deaktivace vychladlého adsorbentu byla provedena postupným přidáním 6 % destilované vody k adsorbentu pro nastavení jeho aktivity na stupeň III podle Brockmanna. Homogenizace deaktivace adsorbentu probíhala rotací skleněné nádoby s adsorbentem po dobu 1 hodiny. Chromatografická kolona byla naplněna suspenzí takto připraveného adsorbentu s mobilní fází, se kterou se začínala eluce kolony. Po ustálení výšky sloupce

adsorbentu byla hladina mobilní fáze v koloně upuštěna těsně k povrchu adsorbentu sloupce, na který byl opatrně přidán roztěr, který byl nejdříve připraven rozpouštěním směsi alkaloidů v chloroformu a adsorpcí na oxid hlinitý odpařením rozpouštědla za stálého míchání na vodní lázni. Roztěr před použitím byl sušen v exikátoru za sníženého tlaku nad perlami aktivního silikagelu po dobu 24 hodin. Chromatografie alkaloidů probíhala skokovou elucí zvyšováním podílů polárnější složky v mobilní fázi.

#### 4.1.5 Odpařování rozpouštědel

Odstranění rozpouštědel nebo jejich směsí, obsahující rozpuštěné alkaloidy, bylo provedeno na rotační vakuové odparce Heidolph Laborota 4000 při teplotě 40 °C za sníženého tlaku.

#### 4.1.6 Detekce alkaloidů

Po odpaření zbytkových rozpouštědel byla provedena detekce alkaloidů nejdříve pod UV lampou při vlnové délce 254 nm a 366 nm. Sledovaly se přítomné skvrny, které vznikly v důsledku zhášení fluorescence indikátoru díky přítomnosti dvojných vazeb v molekule sloučenin, tmavé skvrny byly označeny. Poté byly desky postříkány Dragendorffovým činidlem, jehož reakce je založená na detekci alkaloidů, které mají ve své struktuře terciární nebo kvartérní dusík, v jejich přítomnosti dochází k oranžovému nebo oranžovo-červenému zbarvení.

#### 4.1.7 Sušení a uchovávání izolovaných látek

Získané odpařené frakce a izolované čisté látky byly dosušeny v exsikátoru nad silikagelem po dobu nejméně 24 hodin. Po dosušení byly následně uchovávány v lednici při teplotě 2–8 °C.

### 4.2 Izolace alkaloidů

#### 4.2.1 Rozpouštědla

Aceton ( $\text{CH}_3\text{COCH}_3$ ), p. a. (Ing. Petr Švec – Penta, Praha)

Acetonitril (ACN), p.a. (Ing. Petr Švec – Penta, Praha)

Cyklohexan (cHx), p. a. (Lach-Ner, Neratovice)

Diethylether ( $\text{Et}_2\text{O}$ ), čistý destilovaný bez stabilizátoru (Ing. Petr Švec – Penta, Praha)

Ethanol 95% (EtOH) (Lihovar Chrudim, Chrudim)

Ethyl-acetát (EtOAc), p. a. (Ing. Petr Švec – Penta, Praha)

Chloroform (CHCl<sub>3</sub>), p. a. (Ing. Petr Švec – Penta, Praha)

Isopropylalkohol (IPA), p.a. (Ing. Petr Švec – Penta, Praha)

Lékařský benzín (LB), ČL 2017 (Ing. Petr Švec – Penta, Praha)

Methanol (MeOH) LC-MS CHROMASOLV® (Fisher Scientific, Pardubice)

Methanol (MeOH), p.a. (Ing. Petr Švec – Penta, Praha)

Toluen (To), p. a. (Ing. Petr Švec – Penta, Praha)

Trifluoroctová kyselina (TFAA), p.a. (Merck Millipore, Praha)

## 4.2.2 Chemikálie

Kyselina chlorovodíková 35% (HCl), p.a. (Ing. Petr Švec – Penta, Praha)

Síran sodný bezvodý (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), p.a. (Ing. Petr Švec – Penta, Praha)

Uhličitan sodný (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>), pa. 35% (Ing. Petr Švec – Penta, Praha)

Vodný roztok amoniaku 25% (NH<sub>4</sub>OH), p.a. (Ing. Petr Švec – Penta, Praha)

## 4.2.3 Pomocné látky

Křemelina Celite C 535 Cedlite (Sigma-Aldrich, Praha)

Vata bez obsahu viskózy

## 4.2.4 Detekční činidla

D1: Dragendorffovo činidlo [91]

Roztok A: vzniká rozpuštěním 1,7 g dusičnanu bismutitého zásaditého s 20 g kyseliny vinné v 80 ml vody.

Roztok B: vzniká rozpuštěním 16 g jodidu draselného v 40 ml vody.

Zásobní roztok: připravuje se smísením roztoku A a roztoku B v poměru 1:1.

Detekční roztok: připravuje se přidáním 10 g kyseliny vinné a 50 ml vody k 5 ml zásobního roztoku. Roztoky se uchovávají v lednici při teplotě 4°C.

## 4.2.5 Vytvářecí soustavy

S1: cHx + EtOAc + DEA (50:45:5)

S2: To + EtOAc + DEA (8:1:1)

S3: cHx + IPA + DEA (85:10:5)

S4: cHx + IPA + DEA (90:5:5)

S5: To + IPA + DEA (95:2,5:2,5)

S6: cHx + To + DEA (45:45:10)

S7: To + DEA (9:1)

S8: MeOH + ACN + TFAA (10:40:0,1)

S9: cHx + CH<sub>3</sub>COCH<sub>3</sub> + NH<sub>4</sub>OH (30:60:1)

S10: cHx + EtOAc + DEA (45:45:10)

## 4.2.6 Chromatografické adsorbenty

Oxid hlinitý neutrální pro sloupcovou chromatografii 50–200 µm (Across Organics-Fisher Scientific, Pardubice)

Silikagel 60 F<sub>254</sub> pro preparativní chromatografii (Merck, CZ)

Silikagel 60 GF<sub>254</sub> (Merck, CZ) – komerční hliníkové desky o rozměru 20 x 20 cm s 0,2 mm vrstvou silikagelu

## 4.2.7 Přístroje

Automatic Polarimetr P3000 (A. Krüs Optronic, Hamburg, Německo)

Spektrometr ESI/MS Thermo Finnigan LCQDuo (GenTech, Inc., New York, USA)

Spektrometr Varian Inova VNMR S500 (Varian, USA)

UHPLC systém UPLC I-Class (Waters, Millfor, USA) spojený s hmotnostním spektrometrem o vysokém rozlišení (HRMS) Synapt G2-Si (Waters, Manchester, UK) založený na Q-TOF

Ultrazvuková lázeň Sonorex Super 10P (Bandelin, Berlin, Německo)

Vakuová odparka Heidolph Laborota 4000 (Heidolph, Schwabach, Německo)

## 4.3 Izolace alkaloidů

### 4.3.1 Rostlinný materiál

Nať rostliny *Vinca minor* L. byla zakoupena z firmy Megafyt Pharma s.r.o. (Vrané nad Vltavou) jako jemně řezaná droga. Rostlinný materiál ověřil prof. RNDr. Lubomírem Opletalem, CSc. Verifikovaný vzorek je uložený v herbáři Farmaceutické fakulty Univerzity Kalovy.

### 4.3.2 Příprava alkaloidního extraktu a frakce

Samotná celková chromatografie sumárního alkaloidního extraktu *Vinca minor* L. byla provedena Ing. Miroslavem Ločárkem v rámci doktorského studia na Katedře farmaceutické botaniky. Cílem této diplomové práce byla izolace alkaloidů z frakce 37 – 47 a spojených frakcí 48 – 81, které byly získány zpracováním frakce VM 323 – 377 sloupcovou chromatografií v rámci diplomové práce Martiny Jurkaninové [92].

#### 4.3.2.1 *Izolace alkaloidů z frakce 37 – 47*

Frakce 37 – 47 o celkové hmotnosti 1196 mg byla dělena pomocí preparativní TLC. Frakce byla nanášena na 16 litých TLC desek o rozměrech 15 × 15 cm a vyvíjela se celkem 2× v chromatografických komorách, které byly nasyceny parami mobilní fáze S1. Separovala se do 7 podfrakcí 37-47/1 – 37-47/7 s hodnotami retenčních faktorů 0,77; 0,69; 0,62; 0,54; 0,46; 0,31; 0,03. Jednotlivé podfrakce byly vyškrabány, poté byly s přídavkem křemeliny eluovány CH<sub>3</sub>Cl<sub>3</sub> + EtOH (1:1).

Dále byla zpracovávána podfrakce 37-47/6 o hmotnosti 168,7 mg. Byla nanášena na 12 komerčních TLC desek a vyvíjela se celkem 3× v mobilní soustavě S2 v chromatografických komorách. Separovala se do 3 zóny s hodnotami retenčních faktorů 0,55; 0,47; 0,39. Jednotlivé podfrakce byly vyškrabány, poté byly s přídavkem křemeliny eluovány CH<sub>3</sub>Cl<sub>3</sub> + EtOH (1:1), odpařila se rozpouštědla a byla provedena preparativní TLC na komerčních TLC

deskách na SiO<sub>2</sub> v chromatografických komorách s mobilní soustavou S3, při čemž se oddělily 3 látky 6-1 o hmotnosti 6,3 mg, 6-2 o hmotnosti 39 mg a 6-3 o hmotnosti 11,4 mg. Dále byla zpracovávána pouze látka 6-2, jelikož zbylé 2 měly velmi malou hmotnost. Alkaloidy byly ze silikagelu eluovány methanolem, který se poté odpařil ve vakuové odparce. Zóna 6-2 byla přečištěna rozpuštěním v 2% HCl a vytřepána diethyleterem. Následně byl roztok alkalizován 10% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> a vytřepán 4× do EtOAc a zbaven zbytků vodné fáze přidáním bezvodého Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Přečištěním podfrakce 6-2 byla získána jako amorfnní látka DV-1 s hmotností 13,6 mg.

#### 4.3.2.2 Izolace alkaloidů ze spojené frakce 48 – 81

Spojená frakce 48 – 81 (2,292 g) byla separována sloupcovou chromatografií na neutrálním oxidu hlinitém obsahující 6 %. Parametry kolony a separace jsou uvedeny v tabulce (Tabulka 8).

Tabulka 8 parametry chromatografického sloupce

Hmotnost adsorbentu:	140 g
Vrstva roztěru:	2,7 cm
Adsorbent na roztěr:	10 g
Dělicí vrstva:	29 cm
Mrtvý objem:	92 ml
Průtok:	60 ml/min
Objem sbírané frakce:	25 ml
Kontrolní TLC:	S6, S7 a S8

Skoková eluce probíhala s mobilní fází obsahující CHCl<sub>3</sub> + LB v koncentracích 1:1, 6:4, 7:3 a 100% CHCl<sub>3</sub>. Celkově byly jímáno 93 frakcí, které byly spojené na základě TLC monitorování do 5 podfrakcí (Tabulka 9).

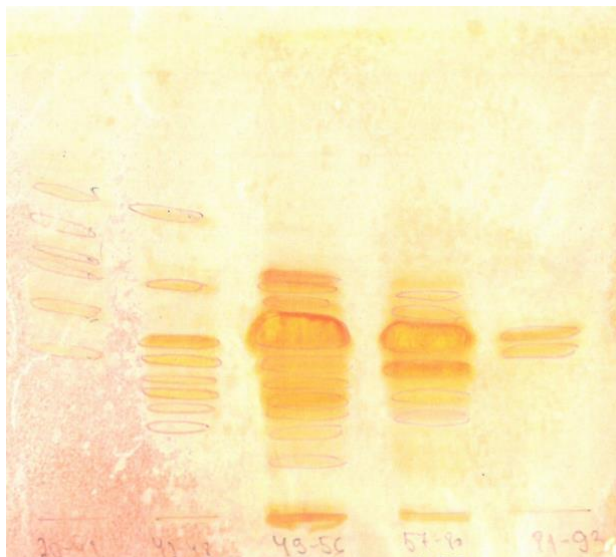
Tabulka 9 podfrakce získané sloupcovou separací spojené frakce 48 – 81

Spojená frakce	Sbírané frakce	Eluční systém (CHCl <sub>3</sub> + LB)	Hmotnost (mg)
1	20-41	1:1, 3:2	94,5
2	42-48	3:2	412
3	49-56	3:2	477



Tabulka 9 podfrakce získané sloupcovou separací spojené frakce 48 – 81 (pokračování)

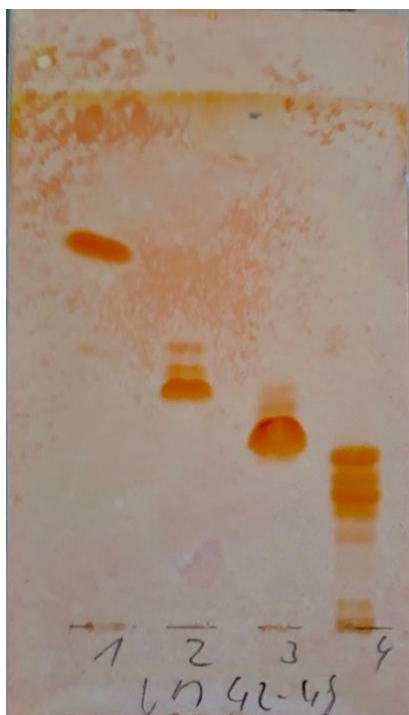
4	57-80	3:2, 7:3	368
5	81-93	7:3, 1:0	84,4



Obrázek 25 podfrakce získané sloupcovou chromatografií frakce 48-81, Kieselgel 60 GF254 Merck,  $T_o + DEA$  (9:1), počet vyvíjení:1x, detekce Dragendorffovo činidlo

### *Izolace alkaloidů z podfrakce 2 (42-48)*

Frakce 42-48 o celkové hmotnosti 412 mg byla dělena pomocí preparativní TLC. Frakce byla nanesena na 20 komerčních hliníkových TLC desek o rozměrech 20 × 10 cm a vyvíjela se celkem 4× v mobilní fázi S4 v chromatografických komorách. Separovala se do 4 podfrakcí 42-48/1 – 42-48/4 s hodnotami retenčních faktorů 0,61; 0,50; 0,38; 0,27. Jednotlivé podfrakce byly vyškrabány, poté byly s přidavkem křemeliny eluovány směsí  $CH_3Cl_3 + EtOH$  (1:1), odpařila se rozpouštědla a byla provedena TLC v soustavě S3. Výsledek je zaznamenán na obrázku (Obrázek 26).



Obrázek 26 kontrolní TLC podfrakce 2 (42-48), Silikagel Kieselgel 60 GF<sub>254</sub> Merck, cHx + IPA + DEA (85:10:5), počet vyvíjení: 1x, detekce Dragendorffovo činidlo

Dále se pracovalo se vzorkem 42-48/2, který byl přečištěn na komerční hliníkové TLC desce a 2x vyvíjen v soustavě S5. Byla získána čistá látka DV-2 o celkové hmotnosti 14,1 mg.

Následně byl vybrán vzorek 42-48/3, který byl přečištěn na 10 komerčních hliníkových deskách a 4x vyvíjen v soustavě S5. Byla získána čistá látka DV-3 o celkové hmotnosti 25 mg.

#### *Izolace alkaloidů z podfrakce 3 (49-56)*

Podfrakce 3 (477 mg) byla separována preparativní TLC na 32 litých deskách 15 × 15 cm na silikagelu. Jako mobilní fáze byla použita vyvíjející směs S9, počet vyvíjení 2x. Byly získány podfrakce 1 – 3 ze zón s retenčními faktory 0,60, 0,47 a 0,35 o váze 15, 35 a 247 mg. Opakovanou preparativní TLC na 16 komerčních silikagelových deskách 20 × 10 cm ve vyvíjející soustavě S10 byla získána opět sloučenina DV-3 (30 mg).

## 4.4 Strukturní analýza

### 4.4.1 ESI-MS analýza

Analýza hmotnostních spekter byla provedena na spektrometru LC/MS Thermo Finnigan LCQDuo. Elektrosprejová ionizace byla spuštěna v kladném módu. energii kolize při měření MS spektra byla 40 eV. Látky byly rozpuštěny v methanolu pro MS ( $c = 0,5 \text{ mg/ml}$ ).

### 4.4.2 HMRS analýza

HRMS analýza byla provedena na koloně Acquity UPLC BEH C18 ( $2,1 \times 1,7 \mu\text{m}$ ) UHPLC systému Acquity UPLC nejvyšší kvality, spojeného s hmotnostním spektrometrem o vysokém rozlišení (UHRS) Synapt G2-Si za použití gradientové eluce s acetonitrilem a 0,1 % kyselinou mravenčí s průtokovou rychlostí 0,4ml/min. Elektrosprejová ionizace byla provedená v kladném módu. ESI spektra byla měřena v rozmení 200–1200 m/z s použitím leucin-enkefalinu jako standardu.

### 4.4.3 NMR analýza

Pro měření NMR spekter  $^1\text{H-NMR}$  a  $^{13}\text{C-NMR}$  byl použit spektrometr Varian Inova 500 při teplotě 25 °C v deuteriochloroformě. Jako standard byl použit tetramethylsilan. Pro jádra  $^1\text{H}$  byla použita inverzní 5mm ID PGF sonda a spektrometr pracoval při frekvenci 499,87 MHz. Pro jádra  $^{13}\text{C}$  byla použita širokospektrá 5 mm SW sonda a spektrometr pracoval při frekvenci 125,70 MHz. Chemické posuny zaznamenané jako hodnoty  $\delta$  byly vyjádřeny v ppm (pars per milion).

### 4.4.4 Optická otáčivost

Měření optické otáčivosti bylo provedeno na polarimetru P3000. Látky byly rozpuštěny v chloroformu. Specifická optická otáčivost se spočítala s pomocí vzorce:

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

$t$  – teplota měření [°C];  $D$  – D-linie sodíkové výbojky o  $\lambda = 589,3 \text{ nm}$ ;  $\alpha$  – naměřená hodnota optické otáčivosti [°];  $c$  – koncentrace měřeného alkaloidu [g/l];  $l$  – délka kyvety [dm]

## 4.5 Stanovení biologické aktivity

### 4.5.1 Stanovení inhibice AChE a BuChE

#### 4.5.1.1 *Chemikálie*

10mM roztok acetylthiocholin jodidu (ATChI) (Sigma-Aldrich, Praha)

10mM roztok butyrylthiocholin jodidu (BTChI) (Sigma-Aldrich, Praha)

Dimethylsulfoxid  $\geq 99,7\%$  (DMSO) (Sigma-Aldrich, Praha)

Galanthamin hydrobromid  $>98\%$  (Changsha Organic Herb Inc., Čína)

Fysostigmin 99% (Sigma-Aldrich, Praha)

5mM roztok 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoové kyseliny  $\geq 98\%$  (DTNB) (Sigma-Aldrich, Praha)

#### 4.5.1.2 *Pufry*

5mM fosfátový pufr o pH 7,4

5mM fosfátový pufr o pH 7,4 se 150mM chloridem sodným

100mM fosfátový pufr o pH 7,4

#### 4.5.1.3 *Přístroje*

Centrifuga Boeco U-32 R (Boeco, Německo) a rotor Hettich 1611 (Hettich, Německo)

GraphPad Prism version 6.07 (GraphPad Software Inc., CA, USA)

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

#### 4.5.1.4 *Biologický materiál*

Zdrojem lidské AChE byl hemolyzát lidských erytrocytů a zdrojem lidské BuChE byla lidská plasma.

#### 4.5.1.5 *Příprava enzymů pro testování AChE a BuChE*

Lidské cholinesterasy byly získány z čerstvě odebrané krve zdravého dobrovolníka, která byla smíchána s citrananem sodným kvůli zamezení koagulace. Plazma s BuChE byla odstraněna od zbytku krve centrifugací při rychlosti 4000 ot/min, teplotě 4 °C a po dobu 10 min. Po

centrifugace se oddělená plazma nad usazenými erytrocyty odsála a uchovávala se v ledničce při 4 °C pro následné stanovování aktivity BuChE.

Zbytek plazmy ze sedimentu erytrocytů se odsál a byl přenesen do zkumavek o objemu 50 ml a celkem 3× promyt 5mM fosfátovým pufrům (pH 7,4), obsahujícím 150 mM NaCl. Centrifugace proběhla za stejných podmínek. Po dobu 10 minut se následně promyté erytrocyty míchaly s 5 mM fosfátovým pufrům, aby se tak zajistila jejich spontánní hemolýza. Po skončení procesu se změřila aktivita hemolyzátu. Aktivita AChE v hemolyzátu i BuChE v plazmě byla měřena okamžitě po přípravě a upravena pomocí 5 mM fosfátového pufru v době potřeby.

Plazma s hemolyzátem byly uchovávány při teplotě -22 °C do doby použití.

#### 4.5.1.6 Stanovení cholinesterasové inhibiční aktivity

Inhibiční aktivita AChE a BuChE byla stanovena *in vitro* pomocí modifikované Ellmanovy spektrofotometrické metody s použitím DTNB [42]. Princip metody spočívá v hydrolyze esterů thiocholinu cholinesterasou za vzniku thiocholinu a příslušné kyseliny. SH-skupina thiocholinu dále reaguje s DTNB za vzniku žlutě zbarveného produktu, u kterého se spektrofotometricky sleduje nárůst absorbance.

8,3 µl hemolyzátu krevních buněk (zdroj AChE) nebo krevní plazmy (zdroj BuChE), 283 µl 5 mM DTNB a 8,3 µl zředěného vzorku v DMSO (40 mM, 10 mM, 4 mM, 1 mM, 0,4 mM a 0 mM) nebo slepého vzorku (DMSO) bylo přidáno do jamek polystyrenové 96jamkové mikroleštičky s plochým a čirým dnem. Spuštění reakce bylo zahájeno přidáním 33,3 µl roztoku 10mM substrátu acetylcholin jodidu nebo butyrylcholin jodidu. Finální podíl DTNB a substrátu byl 1:1. Změna absorbance ( $\Delta A$ ) byla měřena po dobu 1 minuty při teplotě 37 °C o vlnové délce  $\lambda = 436$  nm pro AChE a  $\lambda = 412$  nm pro BuChE na spektrofotometru Synergy™ HT Multi-Detection Microplate Reader. Každé měření bylo zopakováno celkem 6× pro každou koncentraci enzymového preparátu.

Procentuální inhibice byla vypočítána podle vzorce:

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

% I – procenta inhibice;  $\Delta A_{BL}$  – změna absorbance u slepého vzorku za 1 min;

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

Inhibiční aktivita testovaných vzorků byla vyjádřena jako hodnota  $IC_{50}$  (koncentrace inhibitoru, která způsobuje 50% inhibici AChE nebo BuChE), která byla vypočítaná v programu Graph Pad Prism. Získané hodnoty inhibiční aktivity  $IC_{50}$  AChE nebo BuChE porovnány s  $IC_{50}$  referenčních látek.

## 4.5.2 Stanovení inhibice POP

### 4.5.2.1 *Chemikálie*

Bajkalin 95% (Sigma-Aldrich, Praha)

Dimethylsulfoxid  $\geq 99,7\%$  (DMSO) (Sigma-Aldrich, Praha)

Prolyl oligopeptidasa (Sigma-Aldrich, Praha)

10mM roztok Z-Gly-Pro-*p*-nitroanilidu  $\geq 99\%$  (Sigma-Aldrich, Praha)

Z-Pro-prolinal  $\geq 98\%$  (Sigma-Aldrich, Praha)

1,4-dioxan 99,8% (Lach-Ner, Neratovice)

### 4.5.2.2 *Pufry*

10 mM fosfátový tlumivý roztok o pH 7,4

### 4.5.2.3 *Přístroje*

ELISA Reader EL800 (BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA)

GraphPad Prism version 6.07 (GraphPad Software Inc., CA, USA)

### 4.5.2.4 *Stanovení inhibiční aktivity testovaných látek vůči POP*

POP, se specifickou aktivitou 0,2 U/ml, byla připravena rozpuštěním ve fosfátovém pufovaném solném roztoku (PBS) s obsahem 137mM NaCl a 2,7mM KCl. Testování bylo provedeno na standardních 96jamkových polystyrenových mikrotitračních destičkách s plochým čirým dnem. Zásobní roztoky testovaných látek byly připraveny rozpuštěním v 10mM DMSO, z těchto roztoků byly připraveny roztoky k testování naředěním superčistou vodou. Slepé vzorky měly stejnou koncentraci DMSO. Substrát pro POP a Z-Gly-Pro-*p*-nitroanilid byly rozpuštěny v 50% 1,4-dioxanu (5 mM). Pro každou reakci byly

smícháno 170  $\mu$ l PBS, 5  $\mu$ l testované sloučeniny a 5  $\mu$ l roztoku POP. Vzniklá směs byla inkubována po dobu 5 minut při teplotě 37 ° C. Potom bylo přidáno 20  $\mu$ l substrátu a směs byla inkubována dalších 30 minut. Vznik barevných produktů *p*-nitroanilinu je přímo úměrný aktivitě POP. Na závěr byly roztoky proměřeny spektrofotometricky při vlnové délce  $\lambda = 405$  nm pomocí mikrotitračního detektoru ELISA. Inhibiční aktivita IC<sub>50</sub> jednotlivých látek byla vypočítána pomocí programu GraphPad Prism a následně porovnávána s IC<sub>50</sub> referenčních látek [42].

## 4.5.3 Stanovení inhibice GSK-3 $\beta$

### 4.5.3.1 Chemikálie

Adenosin-5-trifosfát (ATP) (Sigma-Aldrich, Praha)

Dimethylsulfoxid  $\geq 99,7\%$  (DMSO) (Sigma-Aldrich, Praha)

Ethylendioxytetraoctová kyselina (EDTA) (Sigma-Aldrich, Praha)

Magnesium acetát (Sigma-Aldrich, Praha)

Tetrasodná sůl ethylenglykol-bis-(aminoethylether)-*N,N,N,N*-tetraoctové kyseliny (EGTA) (Sigma-Aldrich, Praha)

4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-ethansulfonová kyselina (HEPES) (Sigma-Aldrich, Praha)

### 4.5.3.2 Přístroje

GraphPad Prism version 6.07 (GraphPad Software Inc., CA, USA)

Victor X3 multimode plate reader (Perkin Elmer, MA, USA)

### 4.5.3.3 Stanovení inhibiční aktivity testovaných látek vůči GSK-3 $\beta$

Pro stanovení inhibiční aktivity GSK-3 $\beta$  byla *in vitro* použita luminiscenční metody podle Baki *et al.* s využitím souboru činidel Kinase-Glo Kit [93]. Reakce probíhala v 96jamkové bílé destičce. V každé jamce mikrotitrační destičky bylo smícháno 10  $\mu$ l (50  $\mu$ M) testované látky rozpuštěné v 1mM DMSO a zředěno pufrem o pH 7,5 (50mM HEPES, 1mM EDTA, 1mM EGTA, 15mM magnesium acetát, 10  $\mu$ l ATP, 10  $\mu$ l GSK-3 $\beta$  a 10  $\mu$ l substrátu pro GSK-3 $\beta$ , GSM). Pro zpětnou kontrolu byl v první fázi reakce místo testované látky použit tlumivý roztok nebo standard SB-415286. Vzniklá směs byla inkubována po dobu 30 minut při teplotě 37 ° C.

Enzymatická reakce byla ukončena přidáním 40  $\mu$ l souborem činidel Kinase-Glo. Po 10 minutách byla zaznamenaná luminiscenční reakce. Luminiscenční signál je přímo úměrný rozdílu množství přítomného a spotřebovaného ATP a nepřímo úměrný s aktivitou kinasy. Inhibiční aktivita byla spočítána z maximální aktivity za absence inhibitoru a maximální aktivita byla spočítána v přítomnosti referenční látky. Inhibiční aktivita  $IC_{50}$  jednotlivých látek byla vypočítána pomocí programu GraphPad Prism.

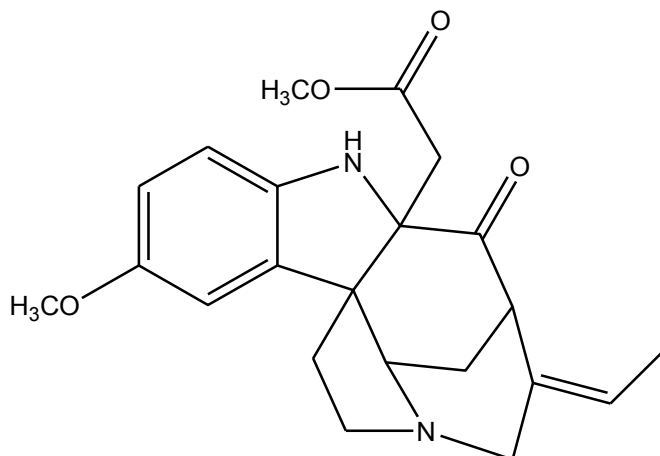


# 5 VÝSLEDKY

## 5.1 Strukturní analýza

### 5.1.1 DV-1 (nová sloučenina)

Sumární vzorec: C<sub>22</sub>H<sub>26</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>



Obrázek 27 vzorec DV-1

#### 5.1.1.1 MS analýza

MS-ESI: m/z (%) [M+H]<sup>+</sup> 383(100). MS/MS m/z 383(5), 365(42), 353(69), 351(90), 340(44), 321(100), 296(90), 276(48), 224(72)

HRMS: m/z (%) [M+H]<sup>+</sup> – měří se.

#### 5.1.1.2 NMR analýza

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>CN) δ: 7.49 (1H, d, *J* = 8.5 Hz), 7.10 (1H, d, *J* = 2.6 Hz, 1H), 6.90 (1H, dd, *J* = 8.5 Hz, *J* = 2.6 Hz), 5.47 (1H, q, *J* = 7.3 Hz), 4.43 (1H, d, *J* = 4.9 Hz), 4.08 – 4.01 (1H, m), 3.80 – 3.79 (6H, m), 3.72 – 3.67 (1H, m), 3.64 (1H, dd, *J* = 14.8 Hz, *J* = 5.7 Hz), 3.16 (1H, d, *J* = 17.1 Hz), 2.94 (1H, d, *J* = 12.1 Hz), 2.72 (1H, d, *J* = 12.1 Hz), 2.62 (1H, dd, *J* = 14.3, 5.7 Hz), 2.49 (1H, dd, *J* = 14.3, 4.5 Hz), 2.46 – 2.39 (1H, m), 1.93 (1H, dd, *J* = 14.9 Hz, *J* = 4.5 Hz), 1.86 (1H, dd, *J* = 14.3 Hz, *J* = 3.3 Hz), 1.64 (3H, dd, *J* = 7.3 Hz, *J* = 2.5 Hz)

<sup>13</sup>C NMR (125.7 MHz, CD<sub>3</sub>CN) δ: 189.2, 174.4, 159.1, 150.5, 147.4, 141.4, 121.9, 119.8, 113.7, 112.5, 64.0, 61.0, 59.7, 56.2, 55.4, 54.3, 52.44, 52.42, 39.0, 35.1, 31.2, 13.7

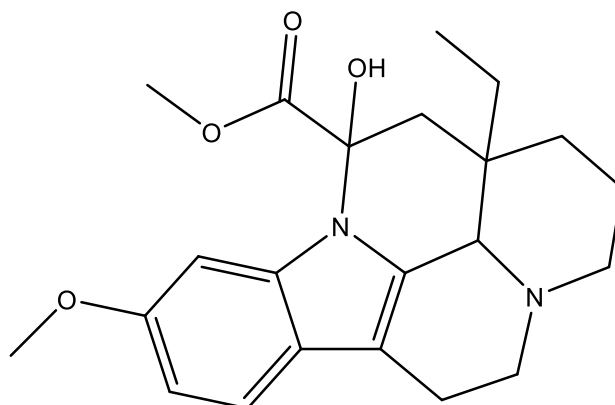
### 5.1.1.3 *Optická otáčivost*

$[\alpha] = +96^\circ$  (c 0,187; CHCl<sub>3</sub>)

## 5.1.2 DV-2: Vincin

Na základě výsledků MS, NMR studií a změření optické otáčivosti a porovnání získaných údajů s literaturou byla látka DV-2 identifikována jako (-)-vincin.

Sumární vzorec: C<sub>22</sub>H<sub>28</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>



Obrázek 28 vzorec DV-2: (-)-vincinu

### 5.1.2.1 MS analýza

MS-ESI: m/z (%) [M+H]<sup>+</sup> 339(100). MS/MS m/z 321(85), 296(100), 279 (90), 270(39), 261(27), 234(24), 216(17), 202(13).

### 5.1.2.2 NMR analýza

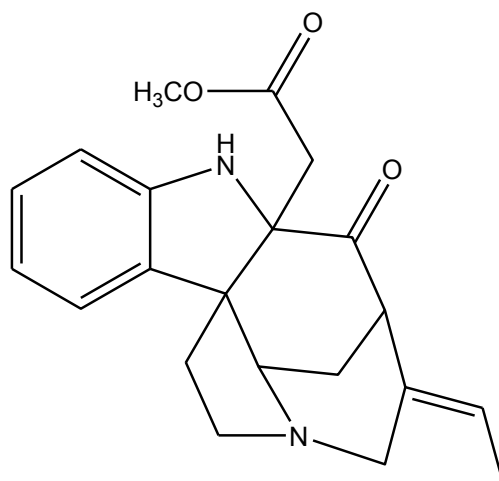
Identifikace proběhla porovnáním získaných <sup>1</sup>H a <sup>13</sup>C spekter s literaturou [94].

### 5.1.2.3 Optická otáčivost

[α] = -29° (c 0,206; CHCl<sub>3</sub>) (literatura uvádí +36, měřeno v pyridinu) [94].

### 5.1.3 DV-3 (nová sloučenina)

Sumární vzorec: C<sub>21</sub>H<sub>24</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

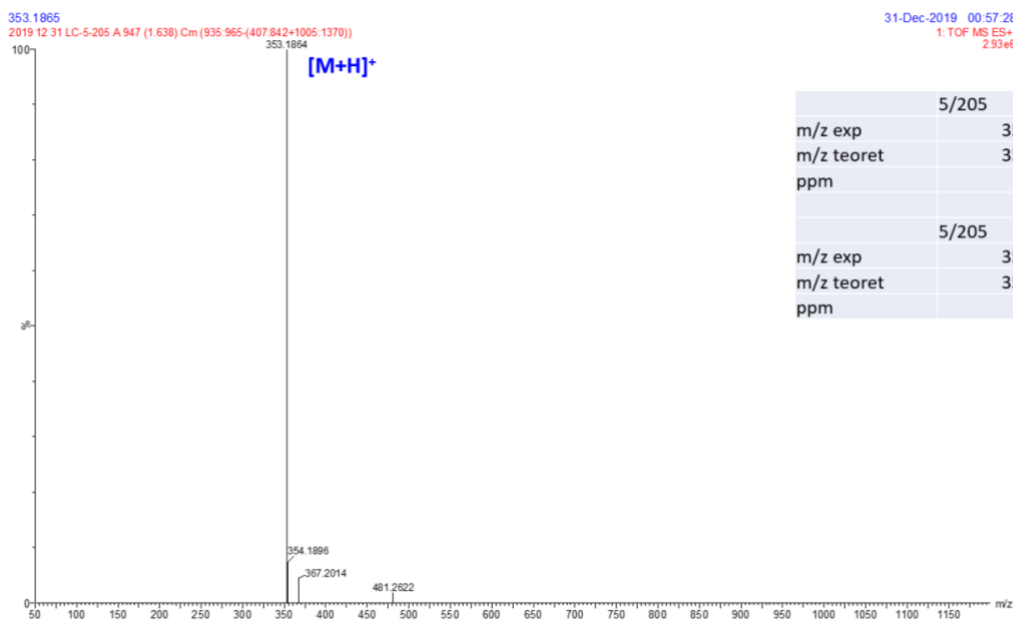


Obrázek 29 vzorec DV-3

#### 5.1.3.1 MS analýza

MS-ESI: m/z (%) [M+H]<sup>+</sup> 353(100). MS/MS m/z 353(2), 335(36), 291(100), 323(70), 291(100), 266(90), 250(54), 228(14), 202(21), 194(24).

HRMS: m/z (%) [M+H]<sup>+</sup> 353,1864



Obrázek 30 HRMS DV-3

### 5.1.3.2 NMR analýza

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 7.65 (1H, d, *J* = 7.6 Hz), 7.55 (1H, d, *J* = 7.6 Hz), 7.36 (1H, td, *J* = 7.6, 1.3 Hz), 7.20 (1H, td, *J* = 7.5, 1.1 Hz), 5.48 (1H, q, *J* = 7.1 Hz), 4.62 (1H, d, *J* = 4.9 Hz), 4.16 – 4.08 (1H, m), 3.86 (3H, s), 3.70 (1H, *J* = 14.3 Hz, *J* = 5.9 Hz), 3.67 (1H, s), 3.16 (1H, d, *J* = 17.1 Hz), 2.99 (1H, d, *J* = 12.3 Hz), 2.90 (1H, d, *J* = 12.3 Hz), 2.71 – 2.56 (2H, m), 2.46 (1H, ddd, *J* = 14.6 Hz, *J* = 5.0 Hz, *J* = 2.6 Hz), 2.06 (1H, dd, *J* = 15.0 Hz, *J* = 4.0 Hz), 1.92 (1H, dd, *J* = 14.6 Hz, *J* = 2.6 Hz), 1.64 (3H, dd, *J* = 7.1 Hz, *J* = 2.6 Hz)

<sup>13</sup>C NMR (125.7 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 190.5, 173.6, 155.8, 144.3, 139.6, 128.5, 125.9, 124.6, 121.5, 119.6, 64.2, 60.5, 58.7, 54.6, 53.9, 52.1, 52.0, 37.9, 34.7, 30.5, 13.4.

### 5.1.3.3 Optická otáčivost

[α] = +76° (c 0, 394; CHCl<sub>3</sub>)

## 5.2 Stanovení inhibiční aktivity

Výsledky inhibice AChE, BuChE, POP a GSK-3 $\beta$  v případě DV-1, DV-2 a DV-3 jsou uvedeny v následující tabulce (Tabulka 10).

Tabulka 10 hodnoty inhibičních aktivit

Alkaloid	AChE (IC <sub>50</sub> , $\mu$ M)	BChE (IC <sub>50</sub> , $\mu$ M)	POP (IC <sub>50</sub> , $\mu$ M)	GSK-3 $\beta$ (50 $\mu$ M, % inhibice)
DV-1	>100	>100	NT	NT
DV-2 (vincin)	>100	>100	346 $\pm$ 30	93,67 $\pm$ 8,95
DV-3	>100	>100	445 $\pm$ 28	84,17 $\pm$ 4,97
galanthamin	1,71 $\pm$ 0,06	42,3 $\pm$ 1,30	-	-
fysostigmin	63,0 $\pm$ 1,0 $\times 10^{-3}$	130.0 $\pm$ 4,01 $\times 10^{-3}$	-	-
bajkalin	-	-	194.0 $\pm$ 14.01	-
Z-pro-prolinal	-	-	3.27 $\pm$ 0,02 $\times 10^{-3}$	-
SB-415286	-	-	-	70.00 nM (IC <sub>50</sub> )

NT = netestováno

## 6 DISKUZE

Diplomová práce se zabývala izolací alkaloidů z podfrakcí VM 37-47 a VM 42-48, které byly již dříve získány na katedře Farmaceutické botaniky z rostliny *Vinca minor* L.

Pomocí preparativní TLC se podařilo izolovat 3 čisté alkaloidy a na základě analýzy MS, NMR a optické otáčivosti byla 1 z nich identifikována jako (–)-vincin, který dle struktury patří mezi eburnaminové alkaloidy a byl izolován již roku 1960 z rostliny *Vinca minor* L. (Apocynaceae). V literatuře je popisován jako (+)-vincin, měřený v pyridinu, v případě izolované látky se jedná o jeho enantiomer (–)-vincin [94]. Zbylé 2 izolované alkaloidy jsou látky nové, jim podobné sloučeniny byly izolovány z rodu *Strychnos*, dokonce byly připraveny podobné sloučeniny při totální syntéze tzv. *Strychnos* alkaloidů. Nejvíce se těmto látkám strukturně blíží (±)-18,19-dinortubifolidin a (–)-20-deethyltubifolidin [103–105].

U izolovaných alkaloidů byla testována biologická aktivita. Byla stanovena inhibiční aktivita vůči AChE, BuChE, POP a GSK-3β. Zjištěné hodnoty IC<sub>50</sub> byly porovnány s referenčními látkami. Pro inhibici AChE a BuChE nimi byly galanthamin (IC<sub>50</sub> AChE = 1,7 ± 0,1 μM, IC<sub>50</sub> BuChE = 42,3 ± 1,3 μM) a fysostigmin (IC<sub>50</sub> AChE = 63,0 ± 1,0 × 10<sup>-3</sup> μM, IC<sub>50</sub> BuChE = 130,0 ± 4,01 × 10<sup>-3</sup> μM). K porovnání inhibiční aktivity vůči POP byl použit bajkalin (IC<sub>50</sub> POP = 194,0 ± 14,01 μM) a Z-Pro-prolinal (IC<sub>50</sub> POP = 2,75 × 10<sup>-3</sup> μM). Referenční látka k porovnání inhibice GSK-3β byla sloučenina SB-415286 (IC<sub>50</sub> GSK-3β = 70 nM).

Izolovaný alkaloid (–)-vincin nevykazoval inhibiční aktivitu vůči AChE (IC<sub>50</sub> >100 μM) ani BuChE (IC<sub>50</sub> >100 μM). Jeho naměřená hodnota POP (IC<sub>50</sub> = 346 ± 30 μM) nebyla oproti referenční látce příliš aktivní. Vincin vykazoval signifikantní inhibiční aktivitu vůči GSK-3β, v koncentraci 50 μM inhiboval enzym z 93,67 ± 8,95 %. Nová látka, označená jako DV-1, nebyla inhibičně aktivní vůči AChE i BuChE (IC<sub>50</sub> >100 μM; IC<sub>50</sub> >100 μM), aktivita vůči POP a GSK-3β nebyla testována, jelikož izolované množství postačovalo pouze na určení struktury a inhibici cholinesteras. Další nová látka označená DV-3 také nevykazovala inhibiční aktivitu vůči AChE ani BuChE (IC<sub>50</sub> >100 μM; IC<sub>50</sub> >100 μM). Aktivita vůči POP (IC<sub>50</sub> = 445 ± 28 μM) byla v porovnání se standardem nevýznamná. Aktivita alkaloidu vůči GSK-3β byla signifikantní, inhibice enzymu dosahovala při 50 μM 84,17 ± 4,97 %. Z výsledků vyplývá, že ani jedna látka není významným inhibitorem cholinesteras a POP. Inhibice GSK-3β v případě vincinu a DV-3 je signifikantní.

Schopnost sloučenin překročit HEB dosáhnout terapeutických cílů v CNS je rozhodujícím krokem ve vývoji nových potenciálních léků proti AD. V počátcích objevování léčiv je tedy pro správný výběr sloučeniny velmi důležité prověřit penetraci přes HEB. LogBB je nejběžnější numerická hodnota predikující průchod látky přes HEB. Je definována jako logaritmický poměr mezi koncentrací sloučeniny v mozku a krvi [106]. Vypočítané hodnoty logBB pro DV-1, vincinu a DV-3 jsou  $-0,270$ ;  $-1,086$  a  $0,059$  [107]. Sloučeniny s  $\log BB > 0,3$  snadno procházejí HEB, zatímco sloučeniny s  $\log BB < -1,0$  jsou do mozku distribuovány jen omezeně. Dle výpočtu se zdá, že DV-1 bude do mozku procházet pasivní difúzí omezeně a vincin nebude schopný průchodu. Naopak, sloučenina DV-3 má hodnotou logBB vyšší než 0, což signalizuje, že by sloučenina mohla do mozku procházet pasivní difúzí.

Tyto látky a hlavně DV-3, která je schopná výrazně inhibovat GSK-3 $\beta$  a pravděpodobně přestupovat HEB, by z hlediska sktruktury mohly mít svůj význam ve vývoji nových léčiv.



## 7 ABSTRAKT

Valová, D.: Alkaloidy *Vinca minor* L. a jejich biologická aktivita III. Diplomová práce, Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra farmaceutické botaniky, Hradec Králové 2020, 75 s.

Alzheimerova choroba (AD) je progresivní neurodegenerativní onemocnění a je nejčastější formou demence. Vzhledem k tomu, že tuto chorobu zatím nelze kauzálně léčit, je důležitý výzkum nových látek. Tato práce se zaměřila na izolaci alkaloidů z extraktu *Vinca minor* L. jako potenciálního léčiva.

Příprava a sloupcová chromatografie sumárního extraktu byla provedena Ing. Miroslavem Ločárkem v rámci jeho doktorského studia. Následná preparativní TLC vedla k izolaci tří sloučenin. Chemické struktury izolovaných alkaloidů byly objasněny optickou otáčivostí, NMR a MS analýzou a porovnáním získaných dat s údaji v literatuře. Jedna ze sloučenin byla stanovena jako (–)-vincin, zbylé 2 sloučeniny jsou nové (nebyly dosud izolované).

Tyto sloučeniny byly také testovány na jejich biologickou aktivitu. Vincin, DV-1 a DV-3 byly testovány na schopnost inhibovat acetylcholinesterasu (AChE) a butyrylcholinesterasu (BuChE). Dále byla také testována inhibiční aktivita vincinu a DV-3 vůči prolyl oligopeptidase (POP) a glykogensyntase kinase 3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ).

Všechny izolované alkaloidy byly téměř neaktivní vůči AChE a BuChE ( $IC_{50} > 100 \mu M$ ;  $IC_{50} > 100 \mu M$ ). Ve srovnání se standardy nebyla schopnost inhibovat POP významná ani v případě vincinu ( $IC_{50} = 346 \pm 30 \mu M$ ) ani DV-3 ( $IC_{50} = 445 \pm 28 \mu M$ ). Inhibiční aktivita vůči GSK-3 $\beta$  je poměrně signifikantní případě vincinu (% inhibice =  $93,67 \pm 8,95$ ) i DV-3 (% inhibice =  $84,17 \pm 4,97$ ).

Vzhledem k signifikantní inhibiční aktivitě vůči GSK-3 $\beta$  by tyto sloučeniny mohly být slibné jako prvotní struktura ve vývoji nových potenciálních látek pro léčbu AD.

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

## 8 ABSTRACT

Valová D.: *Vinca minor* L. alkaloids and their biological activity III. Diploma thesis, Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Department of Pharmaceutical Botany, Hradec Králové, 2020, 75 p.

Alzheimer's disease (AD) is a progressive, neurodegenerative disorder and it's the most common form of dementia. Because we're still not able to treat the cause of disease, searching for a new substance is relevant. This thesis is focused on isolation of alkaloids from a *Vinca minor* L. alkaloidal extract as a potential drug.

The preparation and column chromatography of the summary extract were performed by Ing. Miroslav Ločárek as a part of his doctoral studies. Subsequent preparative TLC led to the isolation of three compounds. The chemical structures of the isolated alkaloids were elucidated by means of optical rotation, NMR and MS analyses and by comparison of the obtained data with those in the literature. One of the compounds was determined as(-)-vincine, other two compounds have not been isolated yet.

Isolated compounds were also tested for their biological activity. Vincine, DV-1 a DV-3 were tested for their ability to inhibit acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BuChE). Additionally, vincine and DV-3 were also tested for their inhibitory activity on prolyl oligopeptidase (POP) and glycogen synthase kinase 3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ).

The isolated alkaloids were considered almost inactive on AChE and BuChE ( $IC_{50} > 100 \mu M$ ;  $IC_{50} > 100 \mu M$ ) in all of cases. In comparison to the standards, the ability to inhibit POP wasn't significant in case of vincine ( $IC_{50} = 346 \pm 30 \mu M$ ) nor DV-3 ( $IC_{50} = 445 \pm 28 \mu M$ ). Inhibitory activity on GSK-3 $\beta$  is quite significant, in the case of vincine (% inhibition =  $93,67 \pm 8,95$ ) or DV-3 (% inhibition =  $84,17 \pm 4,97$ ).

Because of their significant inhibitory activity on GSK-3 $\beta$ , these compounds could have promise as a lead structures for the development of new potential substances for AD treatment.

Key words: *Vinca minor*, alkaloids, biological activity.

## 9 LITERARUTA

1. WHO | Dementia: a public health priority Available online: [http://www.who.int/mental\\_health/neurology/dementia/en/](http://www.who.int/mental_health/neurology/dementia/en/) (staženo 20. října 2019).
2. Mátl, O.; Mátlová, M. Zpráva o stavu demence 2016. 2016, 24.
3. Matějovská Kubešová, H.; Býma, S.; Česká lékařská společnost J.E. Purkyně; Centrum doporučených postupů pro praktické lékaře Demence: doporučené diagnostické a terapeutické postupy pro všeobecné praktické lékaře 2018; 2018.
4. Korbelář, J.; Endris, Z. Naše rostliny v lékařství; Avicenum, 1981.
5. Jahodář, L.; Univerzita Karlova Farmakobotanika: semenné rostliny; Karolinum: Praha, 2011.
6. ADINACO | Vědecký portál – Farmaceutická fakulta UK online: <https://portal.faf.cuni.cz/Groups/ADINACO/> (staženo 9. března 2020).
7. Vlček, J.; Fialová, D. Klinická farmacie I.; Grada: Praha, 2010.
8. Alzheimer's Disease Fact Sheet online: <https://www.nia.nih.gov/health/alzheimers-disease-fact-sheet> (staženo 20. října 2019).
9. Jirák, R. Farmakoterapie Alzheimerovy choroby. *Remedia* 2009, 19, 342–345.
10. Rössner, P. Alzheimerova choroba-diagnostika a léčba. *Neurol. Praxi* 2004, 11.
11. Doležal, M.; Univerzita Karlova Farmaceutická chemie léčiv působících na centrální nervový systém; Karolinum: Praha, 2013.
12. Jirák, R. Farmakoterapie Alzheimerovy choroby. *Klin Farmakol Farm* 2004, 18, 212–214.
13. Hardy, J.; Higgins, G. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* 1992, 256, 184–185.
14. Koukolík, F.; Jirák, R. Alzheimerova nemoc a další demence; Grada Pub.: Praha, 1998.
15. Liu, C.-C.; Kanekiyo, T.; Xu, H.; Bu, G. Apolipoprotein E and Alzheimer disease: risk, mechanisms and therapy. *Nat. Rev. Neurol.* 2013, 9, 106–118.

16. Nathan, B.; Bellosta, S.; Sanan, D.; Weisgraber, K.; Mahley, R.; Pitas, R. Differential effects of apolipoproteins E3 and E4 on neuronal growth in vitro. *Science* 1994, 264, 850–852.
17. Chmátalová, Z.; Skoumalová, A. Oxidační stres u Alzheimerovy choroby a jeho důsledky. *Klin Biochem Metab* 2014, 22 (43), 189–195.
18. Ferková, E.; Ilievová, L. Známý neznámý Alzheimer. 2013, 23, 56–58.
19. Alois Alzheimer: příběh jedné nemoci online: <https://vesmir.cz/cz/casopis/archiv-casopisu/2007/cislo-4/alois-alzheimer-pribeh-jedne-nemoci.html> (staženo 5. dubna 2020).
20. Čechová, Mud.L. Alzheimerova nemoc a mírná kognitivní porucha: diagnostika a léčba. 5.
21. Qiu, C.; Kivipelto, M. Epidemiology of Alzheimer’s disease: occurrence, determinants, and strategies toward intervention. *Dialogues Clin. Neurosci.* 2009, 11, 18.
22. Brunovský, Mud.M. Inhibitory cholinesteráz v léčbě Alzheimerově nemoci. 2007, 5.
23. Dušek, K.; Večeřová-Procházková, A. Diagnostika a terapie duševních poruch; Grada Pub., 2015.
24. Kandiah, N.; Pai, M.-C.; Senanarong, V.; Looi, I.; Ampil, E.; Park, K.W.; Karanam, A.K.; Christopher, S. Rivastigmine: the advantages of dual inhibition of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase and its role in subcortical vascular dementia and Parkinson’s disease dementia. *Clin. Interv. Aging* 2017, ročník 12, 697–707.
25. Rivastigmin spc online: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/rivastigmine-actavis-epar-product-information\\_cs.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/rivastigmine-actavis-epar-product-information_cs.pdf).
26. Herrmann, N.; Chau, S.A.; Kircanski, I.; Lanctôt, K.L. Current and Emerging Drug Treatment Options for Alzheimer’s Disease: A Systematic Review. *Drugs* 2011, 71, 2031–2065.
27. Donepezil spc online: <http://www.sukl.cz/modules/medication/search.php> (staženo 16. února 2020).
28. Spilková, J.; Martin, J.; Siatka, T. Farmakognozie; 1. vyd.; Karolinum: Praha, 2016.

29. Galantamin spc online: <http://www.sukl.cz/modules/medication/search.php> (staženo 16. února 2020).
30. Drtinová, L.; Pohanka, M. Možnosti využití huperzinu A v léčbě Alzheimerovy nemoci. *Chem. Listy* 2013, 12–15.
31. Vališ, M.; Caisberger, F.; Šimůnek, L.; Linková, H. Farmakoterapie demencí – pokroky v léčbě a aktuální doporučení. *Remedia* 2013, 23, 396–399.
32. Švestka, Mud.J. Memantin – necholinergní alternativa léčby Alzheimerovy a vaskulární demence. 2004, 6.
33. memantin spc online: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/ebixa-epar-product-information\\_cs.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/ebixa-epar-product-information_cs.pdf).
34. Jiráček, R. Nové postupy v biologické terapii demencí. *Psychiat Praxi* 2010, 11(4), 143–144.
35. Suchopár, J.; Valentová, Š.; Šimek, R. *Remedia compendium*; Panax: Praha, 2009.
36. Zhang, Y.; Li, J.; Yan, C. An update on vinpocetine: New discoveries and clinical implications. *Eur. J. Pharmacol.* 2018, 819, 30–34.
37. Vinpocetin spc online: <http://www.sukl.cz/modules/medication/search.php> (staženo 5. března 2020).
38. O.Z. BioLib: Biological library online: <https://www.biolib.cz/cz/taxon/id40533/> (staženo 22. března 2020).
39. Ginkgo extractum siccum raffinatum et quanti spc online: <http://www.sukl.cz/modules/medication/search.php> (staženo 5. března 2020).
40. Lemere, C.A.; Masliah, E. Can Alzheimer disease be prevented by amyloid- $\beta$  immunotherapy? *Nat. Rev. Neurol.* 2010, 6, 108–119.
41. Boada, M.; Ortiz, P.; Anaya, F.; Hernández, I. Amyloid-targeted therapeutics in Alzheimer's disease: Use of human albumin in plasma exchange as a novel approach for abeta mobilization. *Drug News Perspect.* 2009, 22, 325.

42. Siatka, T.; Adamcová, M.; Opletal, L.; Cahlíková, L.; Jun, D.; Hrabínová, M.; Kuneš, J.; Chlebek, J. Cholinesterase and Prolyl Oligopeptidase Inhibitory Activities of Alkaloids from *Argemone platyceras* (Papaveraceae). *Molecules* 2017, 22, 1181.
43. García-Horsman, J.A.; Männistö, P.T.; Venäläinen, J.I. On the role of prolyl oligopeptidase in health and disease. *Neuropeptides* 2007, 41, 1–24.
44. Llorens-Martín, M.; Jurado, J.; Hernández, F.; Ávila, J. GSK-3 $\beta$ , a pivotal kinase in Alzheimer disease. *Front. Mol. Neurosci.* 2014, 7.
45. Slavík, B. *Květena České republiky 6; 1. vyd.*; Academia: Praha, 2000.
46. Koyuncu, M. A new species of *Vinca* (Apocynaceae) from eastern Anatolia, Turkey. 5.
47. Koyuncu, M.; Ekşi, G.; Özkan, A.M.G. *Vinca ispartensis* (Apocynaceae), a New Species from Turkey. *Ann. Bot. Fenn.* 2015, 52, 340–344.
48. The Plant List online: <http://www.theplantlist.org/tpl1.1/search?q=vinca> (1. března 2020).
49. *Vinca major* L. – Botany.cz online: <https://botany.cz/cs/vinca-major/> (staženo 5. března 2020).
50. *Herbář Wendys – Vinca major* L. online: <https://botanika.wendys.cz/index.php/14-herbar-rostlin/803-vinca-major-barvinek-vetsi> (staženo 26. února 2020).
51. *Vinca herbacea* Waldst. et Kit. – Botany.cz online: <https://botany.cz/cs/vinca-herbacea/> (staženo 5. března 2020).
52. Eisenman, S.W.; Zaurov, D.E.; Struwe, L. *Medicinal Plants of Central Asia: Uzbekistan and Kyrgyzstan*; Springer Science & Business Media, 2012.
53. *Vinca difformis* Pourret – RHS online: <https://www.rhs.org.uk/Plants/23728/Vinca-difformis/Details> (staženo 1. března 2020).
54. *Vinca difformis* Pourret – Wild Flowers of Andalucía online: <http://www.andalucia.com/environment/wildflowers/periwinkle-vinca-difformis.htm> (staženo 1. března 2020).
55. *Květena České republiky. 6*; Chrtěk, J., Slavík, B., Eds.; Vyd. 1.; Academia: Praha, 2000.

56. Herbář Wendys – *Vinca minor* L. online: <https://botanika.wendys.cz/index.php/14-herbar-rostlin/7-vinca-minor-barvinek-mensi> (staženo 26. února 2020).
57. *Vinca minor* L. – Botany.cz online: <https://botany.cz/cs/vinca-minor/> (staženo 1. března 2020).
58. Bruneton, J. *Pharmacognosy, phytochemistry, medicinal plants*; 2. vyd.; Intercept Ltd: New York, 1999.
59. Cheng, G.-G.; Zhao, Y.-L.; Zhang, Y.; Lunga, P.-K.; Hu, D.-B.; Li, Y.; Gu, J.; Song, C.-W.; Sun, W.-B.; Liu, Y.-P.; et al. Indole alkaloids from cultivated *Vinca major*. *Tetrahedron* 2014, 70, 8723–8729.
60. Namjoshi, O.A.; Cook, J.M. Sarpagine and Related Alkaloids. In *The Alkaloids: Chemistry and Biology*; Elsevier, 2016; Vol. 76, pp. 63–169.
61. PubChem Ajmaline online: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/441080> (staženo 29. října 2020).
62. Janot, M.M.; Le Men, J.; Aghoramurthy, K.; Robinson, R. The identity of vincamajordine and akuammine. *Experientia* 1955, 11, 343–343.
63. Lewin, G.; Le Ménez, P.; Rolland, Y.; Renouard, A.; Giesen-Crouse, E. Akuammine and Dihydroakuammine, Two Indolomonoterpene Alkaloids Displaying Affinity for Opioid Receptors. *J. Nat. Prod.* 1992, 55, 380–384.
64. Menzies, J.R.W.; Paterson, S.J.; Duwiejua, M.; Corbett, A.D. Opioid activity of alkaloids extracted from *Picralima nitida* (fam. Apocynaceae). *Eur. J. Pharmacol.* 1998, 350, 101–108.
65. Sefeovie, E.Grossmann.P. Picrinine in *Vinca minor*. *Phytochemistry* 1973, 12, 2058.
66. *The alkaloids: chemistry and physiology*. ročník 20; Manske, R.H.F., Rodrigo, R.G.A., Brossi, A., Cordell, G.A., Eds.; Academic Press: New York, 1981.
67. Mokřý, J.; Kompiš, I.; Spiteller, G. Alkaloids from *Vinca minor* L. XX. Further minor alkaloids. *Collect. Czechoslov. Chem. Commun.* 1967, 32, 2523–2531.

68. W. I. Taylor THE VINCA ALKALOIDS. Chapter 5 Vinca Alkaloids Alkaloids Chem. Physiol. 1968, 99–124, doi:Taylor, W. I. (1968). Chapter 5 The Vinca Alkaloids. The Alkaloids: Chemistry and Physiology, 99–124.
69. Bruneton, J. Pharmacognosy, phytochemistry, medicinal plants; 2. vyd.; Intercept Ltd: New York, 1999.
70. Farahanikia, B.; Akbarzadeh, T.; Jahangirzadeh, A.; Yassa, N.; Ardekani, R.S.; Mirnezami, T.; Hadjiakhoondi, A.; Khanavi, M. Phytochemical Investigation of Vinca minor Cultivated in Iran. 2011, 9.
71. Indolalkaloide in Tabellen; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 1964.
72. Mokřý, J.; Dúbravková, L.; Šefčovič, P. Alkaloide aus Vinca minor L. Vincadin, Minovin und Vincorin. Experientia 1962, 18, 564–565.
73. Farahanikia, B.; Akbarzadeh, T.; Jahangirzadeh, A.; Yassa, N.; Ardekani, R.S.; Mirnezami, T.; Hadjiakhoondi, A.; Khanavi, M. Phytochemical Investigation of Vinca minor Cultivated in Iran. 2011, 9.
74. Malikov, V.M.; Yunusov, S.Yu. Vinca alkaloids. Chem. Nat. Compd. 1977, 13, 497–512.
75. Mokřý, J.; Kompiš, I. Vincaminoridine and vincoridine, two new alkaloids from vinca minor L. Naturwissenschaften 1963, 50, 93–94.
76. Bindra, J.S. Chapter 2 Oxindole Alkaloids. In The Alkaloids: Chemistry and Physiology; Elsevier, 1973; ročník 14, 83–121.
77. Namjoshi, O.A.; Cook, J.M. Sarpagine and Related Alkaloids. In The Alkaloids: Chemistry and Biology; Elsevier, 2016; ročník 76, 63–169.
78. Proksa, B.; Uhrín, D.; Grossmann, E.; Votický, Z. (-)-1-Norvincorine, a New Alkaloid from Vinca minor. Planta Med. 1987, 53, 120–120.
79. Shittu, H.; Gray, A.; Furman, B.; Young, L. Glucose uptake stimulatory effect of akuammicine from Picralima nitida (Apocynaceae). Phytochem. Lett. 2010, 3, 53–55.



80. Shang, J.-H.; Cai, X.-H.; Feng, T.; Zhao, Y.-L.; Wang, J.-K.; Zhang, L.-Y.; Yan, M.; Luo, X.-D. Pharmacological evaluation of *Alstonia scholaris*: Anti-inflammatory and analgesic effects. *J. Ethnopharmacol.* 2010, 129, 174–181.
81. Zhang, L.; Zhang, C.-J.; Zhang, D.-B.; Wen, J.; Zhao, X.-W.; Li, Y.; Gao, K. An unusual indole alkaloid with anti-adenovirus and anti-HSV activities from *Alstonia scholaris*. *Tetrahedron Lett.* 2014, 55, 1815–1817.
82. Natural Compounds; Azimova, S.S., Yunusov, M.S., Eds.; Springer New York: New York, NY, 2013.
83. Vereczkey, L. Pharmacokinetics and metabolism of vincamine and related compounds. *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.* 1985, 10, 89–103.
84. PubChem Vincamine online: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/15376> (staženo 4. dubna 2020).
85. Keglevich, P.; Hazai, L.; Kalas, G.; Szántay, C. Modifications on the Basic Skeletons of Vinblastine and Vincristine. *Molecules* 2012, 17, 5893–5914.
86. Adam, Z.; Vorlíček, J.; Koptíková, J. *Obecná onkologie a podpůrná léčba*; Grada: Praha, 2003.
87. Mondal, A.; Gandhi, A.; Fimognari, C.; Atanasov, A.G.; Bishayee, A. Alkaloids for cancer prevention and therapy: Current progress and future perspectives. *Eur. J. Pharmacol.* 2019, 858, 172472.
88. Katolická, J. Vinflunin. *Remedia* 2013, 23, 167–170.
89. Adam, Z.; Vorlíček, J.; Koptíková, J. *Obecná onkologie a podpůrná léčba*; Grada: Praha, 2003.
90. Vincristine Sulfate Monograph for Professionals online: <https://www.drugs.com/monograph/vincristine-sulfate.html> (staženo 7. března 2020).
91. Chapter 2 Detection of Alkaloids in TLC. In *Journal of Chromatography Library*; Elsevier, 1983; ročník 23, 11–18.

92. Jurkaninová, M. Alkaloidy *V. minor* a jejich biologická aktivita II., Univerzita Karlova, 2019.
93. Hulcová, D.; Breiterová, K.; Siatka, T.; Klímová, K.; Davani, L.; Šafratová, M.; Hošťálková, A.; De Simone, A.; Andrisano, V.; Cahlíková, L. Amaryllidaceae Alkaloids as Potential Glycogen Synthase Kinase-3 $\beta$  Inhibitors. *Molecules* 2018, 23, 719.
94. Trojánek, J.; Kavková, K.; Štrouf, O.; Čekan, Z. Über Alkaloide IV. Über die Isolierung von Vincin, eines neuen Alkaloids aus *Vinca minor* L. *Collect. Czechoslov. Chem. Commun.* 1961, 26, 867–873.
95. *Vinca minor* L. online: <https://www.delta-intkey.com/angio/images/ebot9061.jpg> (staženo 2. března 2020).
96. *Vinca major* L. online: <https://onebeanrow.files.wordpress.com/2014/10/vinca-major.jpg> (staženo 2. března 2020).
97. *Vinca herbacea* Waldst. & Kit. online: <https://floraupload.s3.amazonaws.com/files2/557/5579.jpeg> (staženo 2. března 2020).
98. *Vinca erecta* Regel & Schmalh. online: <https://harryjans.smugmug.com/Travel/Middle-East/Tajikistan-2015/i-f5hPx2> (staženo 2. března 2020).
99. *Vinca difformis* Pourret online: <http://www.andalucia.com/environment/wildflowers/periwinkle-vinca-difformis.htm> (staženo 2. března 2020).
100. *Vinca soneri* Koyuncu online: <https://www.turkiyebitkileri.com/en/photo-gallery/view-photo/641/1777.html> (staženo 2. března 2020).
101. *Vinca ispartensis* Koyuncu & Eksi online: <http://dogalhayat.org/property/vinca-ispartensis/> (staženo 2. března 2020).
102. *Vinca minor* L. – *Daidalea* online: <https://apps.faf.cuni.cz/daidalea/PlantSpecies.asp?id=10024> (staženo 2. března 2020).

103. Reekie, T.A.; Banwell, M.G.; Willis, A.C. A Raney-Cobalt-Mediated Tandem Reductive Cyclization Route to the 1,5-Methanoazocino[4,3- *b*]indole Framework of the Uleine and *Strychnos* Alkaloids. *J. Org. Chem.* **2012**, *77*, 10773–10781.
104. Amat, M.; Linares, A.; Bosch, J. A new synthetic entry to pentacyclic *Strychnos* alkaloids. Total synthesis of (+-)-tubifolidine, (+-)-tubifoline, and (+-)-19,20-dihydroakuammicine. *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 6299–6312.
105. Bonjoch, J.; Quirante, J.; Rodriguez, M.; Bosch, J. Synthetic entry to 8-(*o*-nitrophenyl-2-azabicyclo[3.3.1]nonan-7-ones. Intermediates for the synthesis of strychnos-type systems. *Tetrahedron* **1988**, *44*, 2087–2092.
106. Chlebek, J.; Korábečný, J.; Doležal, R.; Štěpánková, Š.; Pérez, D.; Hošťálková, A.; Opletal, L.; Cahlíková, L.; Macáková, K.; Kučera, T.; et al. In Vitro and In Silico Acetylcholinesterase Inhibitory Activity of Thalictricavine and Canadine and Their Predicted Penetration across the Blood-Brain Barrier. *Molecules* **2019**, *24*, 1340.
107. Way 2 drug Available online: <http://www.way2drug.com/geb/> (staženo 14. května 2020).