

**UNIVERZITA KARLOVA**  
**FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ**  
**KATEDRA FARMAKOGNOZIE**

---



**IZOLACE ALKALOIDŮ DRUHU *GEISSOSPERMUM***  
***VELLOSI* ALLEMÃO A STUDIUM JEJICH BIOLOGICKÉ**  
**AKTIVITY III.**

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

Autor: Lukáš Růžička

Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Marcela Šafratová, Ph.D.

Hradec Králové, září 2020

## **Poděkování**

Poděkování patří hlavně školitelce mojí diplomové práce, PharmDr. Marcele Šafratové, Ph.D., za její cenné rady při práci v laboratoři a postřehy při psaní diplomové práce. Děkuji i ostatním pracovníkům katedry za příjemné pracovní prostředí. Zvláštní poděkování patří mojí rodině a blízkým za podporu v průběhu celého studia.

## **PROHLÁŠENÍ**

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

Lukáš Růžička

## Obsah

<b>OBSAH</b> .....	<b>4</b>
<b>SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK</b> .....	<b>6</b>
<b>SEZNAM OBRÁZKŮ</b> .....	<b>7</b>
<b>SEZNAM TABULEK</b> .....	<b>7</b>
<b>1 ÚVOD</b> .....	<b>8</b>
<b>2 CÍL PRÁCE</b> .....	<b>9</b>
<b>3 TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>10</b>
3.1 <i>GEISSOSPERMUM VELLOSI</i> ALLEMÃO .....	10
3.1.1 Taxonomické zařazení .....	10
3.1.2 Charakteristika .....	10
3.1.3 Lidové léčitelství.....	11
3.1.4 Obsahové látky.....	12
3.2 ALZHEIMEROVA CHOROBA .....	17
3.2.1 Popis.....	17
3.2.2 Etiopatogeneze .....	17
3.2.3 Terapie .....	18
3.3 MALÁRIE .....	19
3.3.1 Popis.....	19
3.3.2 Terapie .....	20
3.4 NÁDOROVÁ ONEMOCNĚNÍ .....	20
3.4.1 Popis.....	20
3.4.2 Terapie .....	21
3.5 BIOLOGICKÁ AKTIVITA <i>GEISSOSPERMUM VELLOSI</i> .....	22
3.5.1 Inhibiční aktivita vůči cholinesterasám .....	22
3.5.2 Antimalarická aktivita.....	23
3.5.3 Protinádorová aktivita.....	25
<b>4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b> .....	<b>27</b>
4.1 LABORATORNÍ POTŘEBY .....	27
4.1.1 Rozpouštědla.....	27
4.1.2 Chemikálie .....	27
4.1.3 Detekční činidla .....	28
4.1.4 Vytvájecí soustavy pro preparativní a analytickou TLC .....	28
4.1.5 Chromatografické absorbenty .....	28
4.1.6 Přístrojové vybavení .....	28
4.1.7 Rostlinný materiál .....	28
4.1.8 Činidla pro stanovení cholinesterasové inhibiční aktivity .....	29
4.1.9 Pufry.....	29
4.2 TESTOVÁNÍ BIOLOGICKÉ AKTIVITY IZOLOVANÝCH LÁTEK .....	29
4.2.1 Chemikálie .....	29
4.2.2 Přístroje .....	30
4.3 VLASTNÍ STANOVENÍ INHIBIČNÍ AKTIVITY IZOLOVANÝCH ALKALOIDŮ .....	30

4.3.1	Stanovení aktivity látek.....	30
4.4	STANOVENÍ INHIBIČNÍ AKTIVITY VŮČI GSK-3 $\beta$ .....	31
4.4.1	Chemikálie .....	31
4.4.2	Přístroje .....	31
4.4.3	Stanovení inhibiční aktivity .....	31
4.5	OBECNÉ POSTUPY:.....	32
4.5.1	Příprava a čištění rozpouštědel .....	32
4.5.2	Odpařování.....	32
4.5.3	Tenkvrstvá chromatografie .....	32
4.5.4	Příprava litých desek.....	32
4.5.5	Detekce .....	32
4.5.6	Sloupcová chromatografie .....	33
4.5.7	GC/MS analýza.....	33
4.5.8	NMR analýza .....	33
4.5.9	Měření optické otáčivosti.....	33
<b>5</b>	<b>IZOLACE .....</b>	<b>35</b>
5.1	ZPRACOVÁNÍ DROGY .....	35
5.2	EXTRAKCE.....	35
5.3	VYTŘEPÁVÁNÍ TERCIÁRNÍCH BAZÍ.....	35
5.4	ČIŠTĚNÍ EXTRAKTU.....	36
5.5	SLOUPCOVÁ CHROMATOGRAFIE .....	36
5.6	ZPRACOVÁNÍ FRAKCE GV-9 – PREPARATIVNÍ TLC .....	39
5.7	ZPRACOVÁNÍ PODFRAKCE GV-9-C.....	40
<b>6</b>	<b>VÝSLEDKY .....</b>	<b>41</b>
6.1	STRUKTURA IZOLOVANÉHO ALKALOIDU.....	41
6.1.1	GV-9C: Geissoschizolin .....	41
6.2	INHIBIČNÍ ÚČINEK IZOLOVANÉ LÁTKY VŮČI CHOLINESTERASAM .....	42
6.3	INHIBIČNÍ ÚČINEK IZOLOVANÉ LÁTKY VŮČI GSK3 $\beta$ .....	42
<b>7</b>	<b>DISKUZE A ZÁVĚR.....</b>	<b>43</b>
<b>8</b>	<b>ABSTRAKT.....</b>	<b>45</b>
<b>9</b>	<b>ABSTRACT.....</b>	<b>46</b>
<b>10</b>	<b>LITERATURA.....</b>	<b>47</b>

## Seznam použitých zkratk

AChE	Acetylcholinesterasa
AChEi	Inhibitory acetylcholinesterasy
AN	Alzheimerova nemoc
APO	Apolipoprotein
BuChE	Butylcholinesterasa
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTNB	5,5-dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina
EtOH	Ethanol
GSK3 $\beta$	Glykogensynthasa kinasa 3 $\beta$
GV	<i>Geissospermum vellosii</i>
IC	Inhibiční koncentrace
LC/MS	Kapalinová chromatografie/hmotnostní spektrometrie
NMR	Nukleární magnetická rezonance
TLC	Tenkovrstvá chromatografie
WHO	Světová zdravotnická organizace

## Seznam obrázků

Obrázek 1: <i>Geissospermum vellosii</i> na nákresu z 19. století [10].....	11
Obrázek 2: Biosyntéza $\beta$ -karbolinových alkaloidů .....	12
Obrázek 3: Chemická struktura flavopereirinu .....	13
Obrázek 4: První krok biosyntézy terpenových indolových alkaloidů. ....	14
Obrázek 5: Chemická struktura dehydrogeissoschizinu .....	14
Obrázek 6: Bis-indolový alkaloid geissospermin.....	15
Obrázek 7: Chemická struktura geissoschizolinu, geissoschizinu a geissovelinu .....	15
Obrázek 8: Chemická struktura 12-methoxy-1-methylaspidospermidinu .....	16
Obrázek 9: Chemická struktura pausperadinu A.....	16
Obrázek 10: Chemická struktura aspidosperminu .....	16
Obrázek 11: Chemická struktura geissoreticulatinu.....	17
Obrázek 12: Souhrnné TLC frakcí GV1-GV16 .....	39
Obrázek 14: Chromatogram po nástřiku Dragendorffovým činidlem, zobrazeno rozdělení jednotlivých podfrakcí GV9A-D.....	40
Obrázek 15: Geissoschizolin.....	41

## Seznam tabulek

Tabulka 1: Parametry sloupcové chromatografie.....	37
Tabulka 2: Průběh sloupcové chromatografie.....	38
Tabulka 3: Inhibiční aktivita izolované látky (tučně) a standardů .....	42
Tabulka 4: Inhibiční aktivita izolované látky (tučně) a standardu .....	42

# 1 Úvod

Neuvěřitelný pokrok v oblasti lidského zdraví a medicíny v průběhu posledního století je nepopíratelný fakt. Avšak stále existují oblasti vyžadující další prozkoumání. Jednou z cest, které mohou vést k dalším objevům nových léčivých látek, může být i inspirace v přírodě. Na světě existuje nepřeberné množství různorodých rostlinných druhů, z nichž se některé z jejich obsahových látek člověk naučil používat k terapii různých onemocnění. Některé rostliny jsou lidmi využívány již od pradávna, léčivé vlastnosti dalších byly objeveny až s příchodem moderní vědy. Často s postupným pokrokem dochází i ke zlepšování vlastností takových látek, například strukturními obměnami nebo vytvořením nových, syntetických molekul na podkladu těch přírodních.

I z tohoto důvodu je vhodné věnovat se studiu dosud neprobádaných druhů. Takovým případem je i *Geissospermum vellosii*. I přesto, že v našich končinách tato rostlina není příliš známá, a ani nemá vlastní český název, se ve své domácí jihoamerické oblasti těší velké oblibě a je tradičně používána na léčbu rozličných zdravotních problémů, například malárie. A jelikož v současné době stále stoupá počet rezistentních kmenů tohoto onemocnění, je více než vhodné podrobit i tyto méně známé druhy zkoumání. Tradované účinky nezahrnují pouze pozitivní vliv na lidské zdraví při onemocnění malárií, ale i mnoho dalších zdravotních problémů, včetně kognitivních deficitů souvisejících s neurodegenerativními změnami ve stárnoucím organismu.

Právě demence ve vysokém věku, často způsobená Alzheimerovou chorobou, představuje nejen zdravotnický, ale i sociálně-ekonomický problém. Moderní medicína ve vyspělých státech za poslední století významně prodloužila předpokládanou délku života, a právě proto se zvyšujícím se věkem rapidně narůstá i výskyt stařeckých demencí [1]. Odhaduje se, že po 85. roce života takovým onemocněním trpí téměř každý druhý člověk [2]. Alzheimerova nemoc je často odhalena až pozdě, a i když není přímým důvodem úmrtí, významně se na mortalitě podílí přidruženými faktory, mezi které patří například poruchy příjmu potravy a tekutin nebo zvýšené riziko vzniku krevních sraženin u pacientů upoutaných na lůžko. Odhaduje se, že střední délka dožití po stanovené diagnóze je asi 6 let [3]. Péče o postižené je finančně i emočně náročná jak pro blízké osoby, tak pro ošetřující zdravotnický personál.

Věřím, že pokud je rostlina používána po celá staletí v lidové medicíně, určitě existuje šance, že skutečně obsahuje nějaké látky s pozitivním účinkem na lidský organismus. Právě *Geissospermum* se řadí mezi fytochemicky zajímavé rostliny. Obsahuje indolové alkaloidy, které jsou známé svou biologickou aktivitou. Na základě screeningové studie, týkající se cholinesterasové aktivity, která byla v předchozích letech provedena na katedrách farmakognozie a farmaceutické botaniky, byla pro další práci vybrána právě tato rostlina. Z fytochemického hlediska se jedná o relativně neprozkoumanou rostlinu, doposud z ní bylo izolováno 22 alkaloidů, z nichž celá řada prokázala zajímavou biologickou aktivitu.



## 2 Cíl práce

- 1) Zpracování kůry z *Geissospermum vellosii*, získání sumárního a následně alkaloidního extraktu.
- 2) Sloupcová chromatografie etherového výtřepku a izolace alespoň jednoho alkaloidu v čisté formě.
- 3) Podíl na identifikaci získaných látek za pomoci fyzikálně-chemických metod (NMR, MS, optická otáčivost).
- 4) Stanovení biologických aktivit izolovaného alkaloidu.
- 5) Teoretické zpracování tématu.

## 3 Teoretická část

### 3.1 *Geissospermum vellosii* Allemão

#### 3.1.1 Taxonomické zařazení [4]

Oddělení: Magnoliophyta

Třída: Rosopsida

Řád: Gentianales

Čeleď: Apocynaceae

Rod: *Geissospermum* Allemão

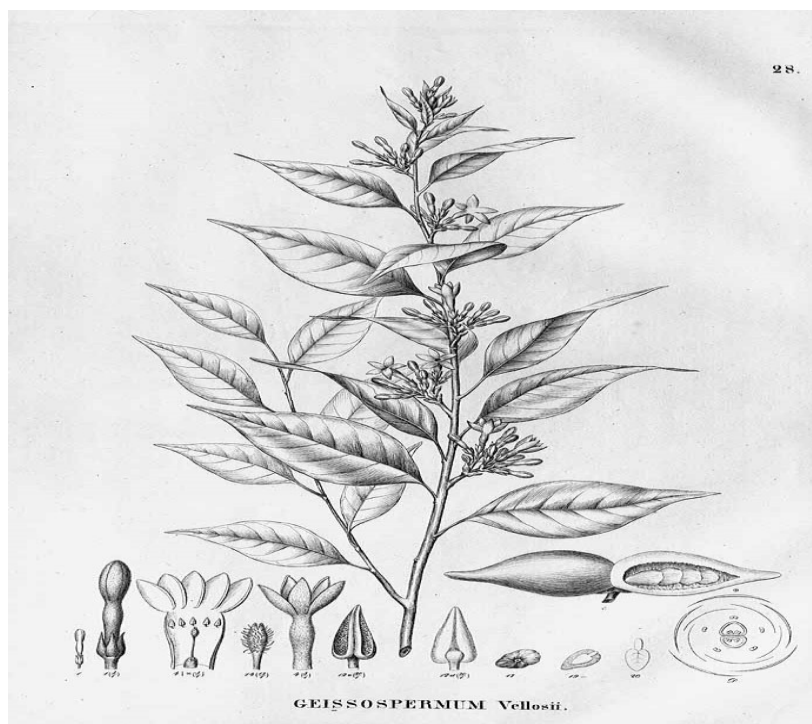
Druh: *Geissospermum vellosii* Allemão

#### 3.1.2 Charakteristika

*Geissospermum vellosii* je vyšší dvouděložná rostlina z čeledi Apocynaceae (toješťovitě), někdy v literatuře dohledatelná také pod názvy *Geissospermum laeve* nebo vzácněji *Tabernaemontana laevis*. Výjimečně bývá také označována jako *Wheeleria*. [5]

Jedná se o vždyzelený středně vysoký strom, který dosahuje výšky až 25 metrů, původem z Jižní Ameriky. V plně vzrostlém stavu může šířka kmene dosahovat 40-60cm [6]. Nejčastěji ho můžeme nalézt na slunných místech v oblastech deštných pralesů, konkrétně na území Brazílie, Surinamu a Guyany [7]. Do rodu *Geissospermum*, poprvé popsáno již v první polovině 19. století doktorem Freire Allemão [8], patří i další druhy – *G.sericeum*, *G.reticulatum* nebo *G.argenteum*. Celkově je popsáno šest druhů, všechny jsou domácí v jihoamerické oblasti.

Společnou charakteristikou pro rod jsou střídavé listy s celokrajným okrajem, kmen pokrytý silnou vrstvou žlutohnědé kůry a hořká chuť. Plody jsou trnovité, zralé mají žlutou barvu a obsahují několik bílých plochých semen (Obrázek 1). Z vrcholů větviček a plodů vytéká malé množství lepivého latexu [8]. Květy jsou uspořádány ve vrcholičnatých květenstvích, což je typické pro celou čeleď toješťovitých [9].



Obrázek 1: *Geissospermum vellosii* na nákresu z 19. století [10]

### 3.1.3 Lidové léčitelství

*Geissospermum vellosii*, v jihoamerických oblastech často označované také jako pao pereira, je již po několik století součástí tradiční lidové medicíny. Celá rostlina obsahuje rozličné množství  $\beta$ -karbolinových a indolových alkaloidů, nicméně v lidovém léčitelství se uplatňovalo především použití kůry. Z ní se připravovaly odvary ve vodě nebo alkoholické tinktury pro perorální aplikaci. Od takto zpracované drogy si léčitelé slibovali zlepšení horečnatých stavů, její působení proti původcům malárie nebo zastavení průjemových onemocnění a celkové zlepšení funkce trávicí soustavy. Kromě toho stojí za to zmínit také údajné tonické působení odvarů na lidský organismus, jeho použití na zvýšení sexuálního apetitu a působení proti tělním parazitům [11]. Nelze opomenout také topickou formu aplikace odvarů, případně také použití roztoků na léčbu infekcí na různých částech těla [10].

Použití v lidovém léčitelství na území Jižní Ameriky později upoutalo pozornost i vědeckých pracovníků. Již během 19. století se v odborné literatuře objevily články, které popisovaly působení extraktů z pao pereira proti horečce provázející malárii, a to u několika etnických skupin pacientů, u kterých léčba chininem nedosahovala žádaných účinků [12]. I při zvyšování dávek nedocházelo k tak silnému rozvinutí nežádoucích účinků ve srovnání s chininem. V roce 1887 v Belgii byl dokonce alkaloid pereirin, v té době extrahovaný z listů stromů *Geissospermum*, oficiálně prohlášen za nové léčivo používané proti malarické horečce. Jednotlivá perorální dávka 2 g soli ve formě hydrochloridu měla údajně být účinnější než soudobě používaný chinin [13].

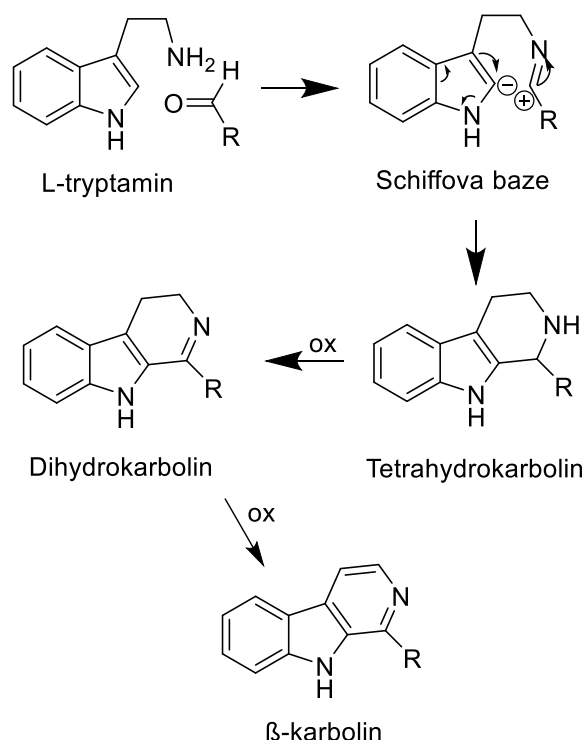
Kromě léčebného využití rodu *Geissospermum* lze také dohledat použití odvaru z kůry jako součásti šípového jedu. Indiánský kmen Wai-Wai, žijící na území dnešní Francouzské

Guyany, tento jed označuje jako balaitu. Odborná literatura, věnující se méně známým rostlinám z této oblasti, nicméně popřela, že by za účinkem jedu stály některé alkaloidy z *Geissospermum argenteum* [14].

### 3.1.4 Obsahové látky

Jak již bylo zmíněno výše, rod *Geissospermum* obsahuje velké množství alkaloidů. Všechny jsou indolového typu, některé z nich mají  $\beta$ -karbolinový skelet (Obrázek 2). Dále jsou v rostlině přítomné monoterpenické indolové alkaloidy.

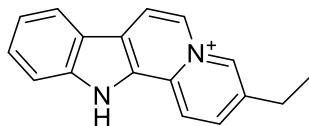
$\beta$ -karbolinové alkaloidy jsou biosyntetizovány z L-tryptofanu, kdy v prvním kroku dochází k dekarboxylaci a vytvoření tryptaminu. Dále dochází k reakci tryptaminu s aldehydovou nebo ketonovou skupinou za vzniku nestabilní Schiffovy base. Nestabilita vzniklé molekuly vede k intramolekulární Mannichově reakci, díky které dojde k cyklizaci. Vzniká tetrahydrokarbolin, který může být dále oxidován na dihydrokarbolin a konečně  $\beta$ -karbolin (Obrázek 2) [15].



Obrázek 2: Biosyntéza  $\beta$ -karbolinových alkaloidů

Mezi významné biologicky aktivní  $\beta$ -karbolinové alkaloidy obsažené v *Geissospermum vellosii* můžeme zařadit například flavopereirin (Obrázek 3). Tento alkaloid prokázal zajímavou *in vitro* inhibiční aktivitu vůči parazitům *Leishmania amazonensis* ( $IC_{50} =$

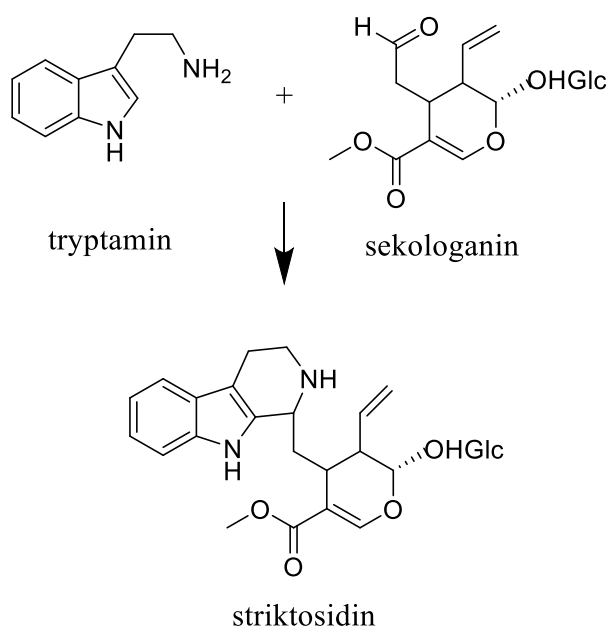
0,23 µg/ml) po 24h působení alkaloidu [16]. V další studii byla prokázána jeho protinádorová aktivita u kolorektálního karcinomu [17]. Molekula se tedy jeví jako velmi perspektivní z hlediska vývoje nových léčiv.



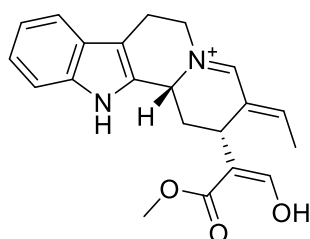
Obrázek 3: Chemická struktura flavopereirinu

Dalším významným typem indolových alkaloidů vyskytujících se v rodu *Geissospermum* jsou monoterpenické indolové alkaloidy (MIA). Jedná se o velmi početnou skupinu alkaloidů, do které patří několik tisíc látek. Nejčastěji se vyskytují právě v čeledi toješťovitých (Apocynaceae), ale jejich zástupce nalezneme i v čeledích kulčibovitých (Loganiaceae) nebo mořenovitých (Rubiaceae). Mezi hlavní podtypy MIA obsažené v GV patří aspidospermanové, korynathové a quebrachaminové alkaloidy. Vzhledem k tomu, že je rostlina z fytochemického hlediska relativně málo prozkoumaná, nelze s jistotou uvést, které všechny podtypy alkaloidů jsou v ní obsažené. Z tohoto důvodu jsou v práci zmíněny především látky, u kterých byla prokázána zajímavá biologická aktivita, případně ty, které z biosyntetického hlediska představují prekurzory pro syntézu takových látek.

Při biosyntéze MIA se kromě tryptofanu uplatňuje také monoterpenická jednotka sekologanin (Obrázek 4). Reakcí vzniká striktosidin, který už svojí chemickou strukturou připomíná některé z alkaloidů obsažených v rostlině. V rámci biosyntézy MIA proces pokračuje odštěpením glykosidické části striktosidinu hydrolýzou. Vznikají nestabilní meziprodukty, ze kterých přes několik intramolekulárních reakcí a přesmyků vzniká dehydrogeissoschizin (Obrázek 5) [18]. Ten je prekurzorem pro syntézu dalších obsahových látek.



Obrázek 4: První krok biosyntézy terpenových indolových alkaloidů.

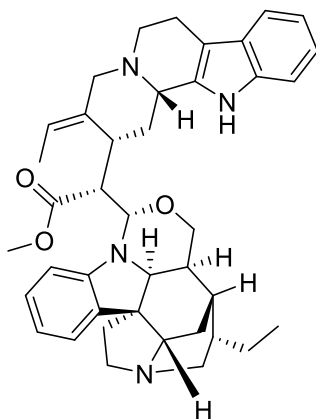


Obrázek 5: Chemická struktura dehydrogeissoschizinu

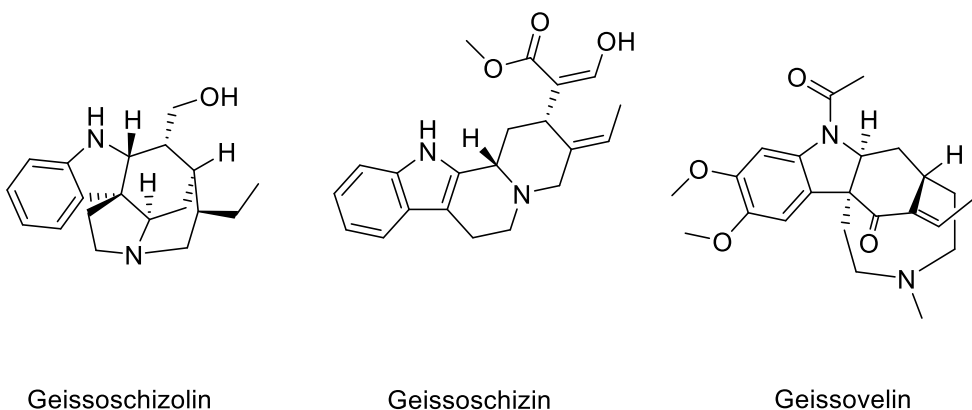
Do této skupiny látek, vyskytující se v *Geissospermum vellosii*, patří dimerní alkaloid geissolosimin, a produkty jeho štěpení kyselou hydrolyzou, vellosimin a geissoschizolin. Tyto látky byly izolovány a zkoumány americkými vědci během 50. a 60. let 20. století [19]. Geissoschizolin, který ve své molekule obsahuje devítiuhlíkatý skelet terpenové jednotky, patří do aspidospermanového podtypu. Takové alkaloidy jsou charakteristické nejen pro rod *Geissospermum*, ale i pro další rody jihoamerických stromů z čeledi Apocynaceae, jako třeba *Aspidosperma* [20]. Není překvapením, že i tyto blízké rody nachází využití v tradičním lidovém léčitelství dané oblasti.

Poněkud složitější chemickou strukturou se vyznačuje další z obsahových látek rodu *Geissospermum*, složený bis-indolový alkaloid geissospermin (Obrázek 6). Geissospermin byl zkoumán již v polovině 20. století americkými vědci z kalifornské univerzity. Je pro něj typická přítomnost cyklické etherové funkční skupiny, která představuje relativně nestabilní část molekuly. V kyselém prostředí proto dochází ke štěpení na dva indolové alkaloidy,

geissoschizin (Obrázek 7) a geissoschizolin (Obrázek 7) [21]. Pro geissoschizolin se v literatuře užívá také synonymní označení pereirin nebo apogeissoschizin [22].



Obrázek 6: Bis-indolový alkaloid geissospermin



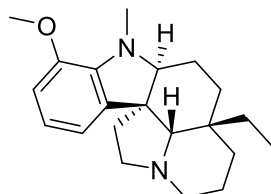
Obrázek 7: Chemická struktura geissoschizolinu, geissoschizinu a geissovelinu

Stejnými vědci byl později v 70. letech objeven další dihydroindolový alkaloid, geissovelin (Obrázek 7). Stejně jako v předchozím případě byl izolován z extraktu z kůry *Geissospermum vellosii* [23]. Přítomnost tohoto alkaloidu byla dále prokázána v extraktu z *Geissospermum sericeum* [24].

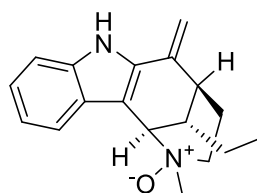
Pozdější výzkumy odhalily v GV přítomnost dalších látek. Například izolovaný alkaloid z dichlormethanové frakce, 12-methoxy-1-methylaspidospermidin (Obrázek 8), při *in vivo* testování prokázal působení proti vedení bolestivých vzruchů. Hypotéza je taková, že serotonin hraje roli při signální dráze bolesti. U myši, kterým byly po 4 dny před testováním podávány inhibitory syntézy serotoninu nebo antagonisté 5-HT<sub>1A</sub> receptoru, takový účinek nebyl patrný. U jiných myši, kterým byly podávány antagonisté 5-HT<sub>2</sub> (ketanserin) a 5-HT<sub>3</sub> (ondansetron) receptorů, byl antinociceptivní účinek pozorován. Výzkumníky byl za účinek

označen právě zmíněný alkaloid, za jeho účinky pravděpodobně stojí interakce s 5-HT<sub>1A</sub> receptory. U dalších alkaloidů obsažených v GV taková aktivita nebyla prokázána. [25].

Další látkou izolovanou z GV je indolový alkaloid pausperadin A (Obrázek 9). Tato látka nebyla doposud testována na žádnou biologickou aktivitu [26].

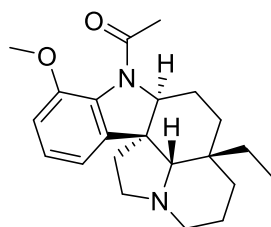


Obrázek 8: Chemická struktura 12-methoxy-1-methylaspidospermidinu



Obrázek 9: Chemická struktura pausperadinu A

Studium obsahových látek proběhlo i u dalších druhů rodu *Geissospermum*. Z kůry a listů *Geissospermum argenteum* byly na konci 70. let za pomoci chloroformové extrakce a sloupcové chromatografie získány další aspidospermanové alkaloidy, například demethoxyaspidospermin, aspidospermin (Obrázek 10) nebo aspidoscarpin [27].

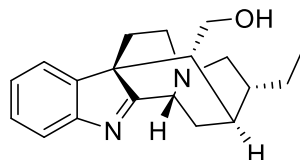


Obrázek 10: Chemická struktura aspidosperminu

Dalším zkoumaným druhem byl *Geissospermum reticulatum*. V extraktu z jeho kůry a listů byly detekovány alkaloidy aspidospermanového typu, které jsou strukturně odvozené od geissovelinu. Mezi nově identifikované látky patřil například 10-demethoxy-12-hydroxy-17,19-epoxygeissovelin. Izolovaný alkaloid obsahuje několik chirálních center. U této látky



byla za pomoci vibračního cirkulárního dichroismu (VCD) a spektroskopie stanovena absolutní konfigurace, která byla určena jako (+)-2*R*,7*R*,15*R*,17*S*,19*S*-10-demethoxy-12-hydroxy-17,19-epoxygeissovelin. Kromě této látky byly v rámci této studie izolovány další soudobě neznámé alkaloidy, O-demethylaspidospermin a geissoreticulatin (Obrázek 11) [28].



Obrázek 11: Chemická struktura geissoreticulatinu

## 3.2 Alzheimerova choroba

### 3.2.1 Popis

Jedná se o chronické progresivní onemocnění nervové soustavy, které představuje velkou výzvu pro ekonomiky i zdravotnictví především vyspělých zemí. Poprvé byla popsána v roce 1906 německým lékařem Aloisem Alzheimerem, podle kterého získala své označení. Výskyt tohoto onemocnění narůstá se zvyšujícím se věkem, podle odhadů světové zdravotnické organizace je příčinou 60-70% demencí celosvětově [29]. Nástup onemocnění je pozvolný a mírný, prvotní symptomy, mezi které patří zapomínání nedávných událostí a nově získaných informací, mohou být bagatelizovány a přisuzovány stáří. Z toho vyplývá, že velké množství případů není řádně diagnostikováno, a že skutečné počty nemocných jsou mnohonásobně vyšší než oficiálně uváděná čísla. Jak již bylo zmíněno výše, onemocnění má progresivní průběh, postupem času se tedy počáteční symptomy zhoršují a přidávají se další, mezi které patří zmatení v prostoru i čase, nesoběstačnost nebo poruchy řeči [1]. V nejtěžším stádiu je přítomná téměř úplná nebo úplná ztráta paměti, pacient je nesoběstačný při běžných úkonech a vyžaduje nepřetržitý dohled ošetřujícího personálu. Po diagnóze se průměrná doba přežití pohybuje mezi 5 a 8 roky, nemocný neumírá přímo na Alzheimerovu nemoc, ale na přidružené problémy, například úrazy, poruchy příjmu potravy nebo embolie [30]. Náklady na léčbu AN a s ní nepřímo spojených faktorů mohou jenom v USA dosahovat až 300 miliard dolarů ročně [31].

### 3.2.2 Etiopatogeneze

Konkrétní důvod vzniku onemocnění není dosud zcela objasněn. Obecný předpokladem je, že se na vzniku podílí kombinace mnoha různých faktorů. Velký význam je v současné době přisuzován genetickým predispozicím, které patří mezi neovlivnitelné faktory. Pokud onemocněním trpí rodiče nebo sourozenci, existuje zvýšené riziko manifestace

u dalších rodinných příslušníků [32]. U lidí, kteří trpí onemocněním, je ve 40 až 80% případů přítomná alespoň jedna alela pro APOε4 lipoprotein, který má podíl na lipidové rovnováze v nervových buňkách a udržování jejich fyziologické funkce [33]. Mezi další neovlivnitelné faktory patří také ženské pohlaví a vyšší věk [1].

Pro onemocnění je charakteristické ukládání β-amyloidních plaků do mozkové tkáně. Tyto plaky vznikají patologicky štěpením z amyloidového prekursorového proteinu za účasti β a γ-sekretas, čímž vznikají fragmenty o délce 42 - 43 aminokyselin, které jsou nerozpustné, dochází k jejich shlukování a finálně ke tvorbě polymerních plaků. V postižených oblastech dochází k odumírání neuronů, charakteristická je přítomnost sterilního zánětu [30]. Roli v manifestaci onemocnění také mohou hrát abnormality τ-proteinu. Při nich dochází k hyperfosforylaci okrajových částí proteinu, ten přestává plnit svou fyziologickou funkci při tvorbě mikrotubulů uvnitř buňky a následně se tvoří neurofibrilární uzlíčky [34].

Dalším přítomným jevem je neuronální degenerace, která je pravděpodobně způsobena výše uvedenými mechanismy. Dále se na jejím vzniku mohou podílet reaktivní kyslíkové radikály, které poškozují lipidovou membránu neuronů [30]. Kromě samotného poškození neuronů dochází také k úbytku neurotransmiterů, zejména acetylcholinu v presynaptické části neuronu. Právě tato teorie patří mezi nejstarší vysvětlení důvodu vzniku onemocnění a současná terapie Alzheimerovy choroby spočívá především v ovlivnění cholinergní neuronální transmise pomocí inhibitorů acetylcholinesterasy.

### 3.2.3 Terapie

Inhibitory acetylcholinesterasy (AChEi) jsou hlavní skupinou léků, které se na léčbu příznaků Alzheimerovy choroby používají. V minulosti jejich zástupce představoval třeba fysostigmin nebo takrin. Od jejich využívání v praxi bylo zejména kvůli nežádoucím účinkům a nižší terapeutické hodnotě upuštěno. Dnes jsou využívány modernější molekuly, od fysostigminu odvozený rivastigmin, donepezil nebo galanthamin. Podle dostupných meta-analýz se v účinnosti příliš neliší, nejlepších výsledků dosahují v mírném a středně pokročilém stádiu onemocnění [35]. Bohužel je choroba progresivní, takže zastavit zhoršování nemoci nezvládají, pouze dočasně zlepšují kognitivní funkce, oddalují těžší stadia onemocnění a zlepšují kvalitu života pacientů. Problém představují také nežádoucí účinky vyplývající z působení acetylcholinu, mezi které patří zejména průjem a zvracení. Tyto NÚ se projeví zhruba u pětiny pacientů a lze je zvládat racionální volbou dávek AChEi a jejich postupným zvyšováním [36]. U středně těžkých a těžkých forem je také v praxi využíván memantin. Jedná se o nekompetitivního antagonismu glutamátových NMDA receptorů. Může být použit v monoterapii nebo v kombinaci s AChEi, v tomto případě se využívá donepezil [37]. Memantin i AChEi jsou podávány perorálně, pouze rivastigmin může být použit i ve formě náplastí, které ustalují plazmatické koncentrace léčiva v krvi a snižují nežádoucí účinky léčiva na gastrointestinální trakt. Další výhodou rivastigminu je, že neovlivňuje metabolismus dalších léčiv na cytochromu P450.

Kromě využití výše zmíněných léčiv lze dohledat snahy o využití dalších látek, třeba seskviterpenického alkaloidu huperzinu A, který prokázal obstojné výsledky při inhibici AChE [38]. Huperzin A je v současné době používán jako léčivo na AN v Čínské lidové

republike, v USA je dostupný v doplňcích stravy [39]. V lékárnách na území České republiky nebyl v době sepisování práce k dispozici žádný doplněk stravy s obsahem tohoto alkaloidu. Někdy lze v literatuře také dohledat použití standardizovaných extraktů z *Ginkgo biloba*, které má mít antioxidační a nootropické účinky, nicméně se neprokázal aditivní účinek a zlepšení kognice [40].

V pozdějších stádiích onemocnění se mohou objevit také další nekognitivní projevy AN, mezi které patří poruchy spánku nebo chování. Poruchy spánku lze zvládat s využitím Z-drugs, mezi které patří zolpidem nebo zopiklon. Pokud se u pacientů objeví deprese nebo poruchy nálad, je nutné využít takové látky, které nemají anticholinergní působení. S výhodou tedy lze využít inhibitory zpětného vychytávání serotoninu (SSRI), případně serotoninu a noradrenalinu (SNRI). Použití tricyklických antidepresiv je nevhodné. Poruchy chování, jako například agresivita, agitace nebo psychomotorický neklid, jsou léčeny za využití antipsychotik. Zde důležitou roli hraje tiaprid, který je vhodný i u starších pacientů. Kromě zlepšení výše zmíněných symptomů může také upravit přítomné poruchy spánku.

Důležitou součástí terapie jsou také nefarmakologická opatření. Jelikož jsou pacienti důsledkem progresu onemocnění částečně nebo úplně nesoběstační, je nutné jim zajistit dohled a ošetrovatelskou pomoc. Tu mohou vykonávat buď rodinní příslušníci, nebo specializovaní pečovatelé pracující v centrech zaměřujících se na péči o nemocné s diagnostikovanou AN. Prostředí v nich by mělo být uzpůsobené tak, aby se pacienti cítili bezpečně a minimalizovala se míra zmatení a rozrušení. Toho lze dosáhnout například viditelně umístěnými hodinami, kalendáři s vyznačeným datem, dobře osvětleným a přehledným prostředím nebo zajištěním kontroly správného podávání léčiv v požadovaných intervalech. U lehčích forem onemocnění lze také využít procvičování myšlení a paměti, popřípadě provádění různých praktických úkonů pod dohledem.

### **3.3 Malárie**

#### **3.3.1 Popis**

Malárie patří mezi jedno z nejzávažnějších parazitárních onemocnění na světě. Nákaza je vyvolána prvky druhu *Plasmodium* (*P.falciparum*, *P.ovale*, *P.vivax* a *P.malariae*) a je na člověka přenášena přes samičky komárů rodu *Anopheles*. Při sání krve se ze slin komára dostanou do krevního řečiště budoucího hostitele infekční sporozoity. Ty se následně krevní cestou během 15 - 60 minut dostanou do jaterních buněk. V hepatocytech v průběhu asi dvou týdnů dochází k jejich dozrávání a množení. Toto období je zpravidla bezpříznakové. Po uplynutí této doby se zpět do krve uvolňuje další stádium, merozoit, který napadá krevní erythrocyty. Po průniku merozoitu do buňky dochází k jeho nepohlavnímu množení a následně se erythrocyt rozpadá, přičemž se do krve uvolňují další merozoity, které mohou napadat další červené krvinky. Uvolňování parazita probíhá v několikadenních cyklech v závislosti na konkrétním druhu, obvykle se pohybuje mezi 3 a 4 dny. Tento masový rozpad erythrocytů odpovídá charakteristickým malarickým záchvatům neboli atakám, pro které je příznačná především rekurentní horečka. S horečkou se mohou objevit také zimnice nebo třesavky. Významným klinickým obrazem je také zvětšení jater a sleziny [41]. U těžších infekcí je

charakteristická přítomnost anémie z důsledku zvýšeného rozpadu erytrocytů a poruchy mikrocirkulace, které mohou vést až ke komatózním stavům.

Podle zprávy WHO přibylo v roce 2018 228 milionů nových případů malárie [42]. Většinu nakažených tvoří mladší 15 let [43]. Prvoci z rodu *Plasmodium* způsobili za rok 2018 přes 400 tisíc úmrtí [42]. Jelikož v poslední době narůstá vznik rezistence na současně používanou terapii, je na místě snaha získat nová léčiva, která by na tyto parazity byla účinná.

### 3.3.2 Terapie

K léčení malárie se využívají antimalarika, mezi které patří chinin, hydroxychlorochin, meflochin, proguanil v kombinaci s atovachonem nebo látky odvozené od přírodních artemisininů. Zmíněné látky mají účinek proti erytrocytárním stádiím parazita, používají se také jako prevence při cestách do oblastí s výskytem tohoto onemocnění. Ke zvládnutí relapsů lze využít primachin, který ovlivňuje také hypnozoity v jaterních buňkách. Představuje tedy léčivo, které se využívá ke kompletní eradikaci parazita z lidského těla. Z důvodu vysokého výskytu nežádoucích účinků je ale využíván omezeně. Při těžším průběhu onemocnění je možné nejdříve využít terapii antimalariky a po jejich vysazení ještě přidat preventivní užívání primachinu, aby se zabránilo návratu onemocnění [44].

Při terapii nekomplikovaných forem onemocnění se ve vyspělých zemích chinin již nevyužívá, zejména kvůli svým nežádoucím účinkům, například navozování arytmií. Léky první volby představují kombinované deriváty artemisininu, artemeter s lumefantrinem nebo artemimol s piperachinem (registrovaný pod názvem Eurartesim, v současné době není dostupný na trhu v ČR [45]). Výskyt rezistence na tyto deriváty je nejnižší ze všech využívaných antimalarik. Z důvodu nedostupnosti těchto léků se na území ČR v praxi využívá kombinace atovachonu s proguanilem (Malarone) nebo meflochinu (Lariam).

Těžší případy malárie jsou v České republice léčeny intravenózně podávaným chininem v kombinaci s antibiotiky, například doxycyklinem nebo klindamycinem. V případě zlepšení stavu lze později využít magistraliter připravený perorální chinin v tobolkách. V zahraničí jsou často využívány intravenózní artemisininové deriváty v kombinaci s dalšími antimalariky nebo zmíněnými antibiotiky. Při využití těchto derivátů byla u léčených pacientů pozorována nižší mortalita než při využití i.v. aplikace chininu [44].

## 3.4 Nádorová onemocnění

### 3.4.1 Popis

Nádorová onemocnění představují velmi různorodou skupinu chorob a jsou jedním z nejčastějších důvodů úmrtí celosvětově. Za normálních podmínek je růst buněk ovlivňován růstovými faktory a signály, pokud se v jejich genetické informaci objeví nějaká mutace, kterou buňka není schopna opravit, proběhne programovaná buněčná smrt pomocí apoptózy. Rakovinné buňky se množí nekontrolovaně a jsou nezávislé na buněčných signálech, které by

jejich dělení měly zastavit a indukovat buněčnou smrt. Dále také vykazují schopnost stimulovat růst krevních kapilár ve svém okolí, čímž dochází k zásobování nově vzniklé tkáně živinami. Některé z nádorů jsou schopné se pomocí metastáz rozšířit do dalších částí těla a napadnout tak i jiné orgány. Obecně se nádory dělí na pravé a nepravé, dále na benigní a maligní. Benigní nádory bývají ohraničené a netvoří metastázy. Naopak maligní prorůstají i do okolní tkáně a můžou se rozšiřovat i do dalších orgánů.

### 3.4.2 Terapie

Po dlouhou dobu bylo jediným možným řešením chirurgické odstranění nádorové tkáně. V průběhu a hlavně ke konci 20. století se možnosti léčby zdatně rozšířily a dnes existuje několik různých přístupů k terapii nádorových onemocnění. Obecně lze terapii rozdělit na specifickou, která relativně cíleně zasahuje pouze nekontrolovatelně rychle se dělící buňky, a nespecifickou, která svým mechanismem účinku může poškozovat i buňky zdravé.

V některých případech lze využít nepříliš specifické terapie ionizujícím zářením, které poškozují především rychle se dělící buňky. Aby se minimalizovalo poškození zdravých buněk, je vhodné takovou léčbu cílit pouze do míst s výskytem nádoru. Jednou z dalších možností, která je vhodná pouze u některých druhů nádorů, je hormonální terapie. Tu lze využít například u některých nádorových onemocnění, jejichž růst je závislý na hladinách pohlavních hormonů, tedy rakoviny prsu, vaječníků nebo prostaty. Lze ji považovat za léčbu se specifickým působením. V neposlední řadě mezi možnosti léčby samozřejmě patří využití cytostatik.

Cytostatika zastavují buněčné dělení několika odlišnými mechanismy účinku. Jedním z nich je inhibice replikace DNA, která může probíhat působením antimetabolitů a alkylačních činidel nebo inhibicí topoisomeras. Některé obsahové látky z *Podophyllum peltatum* vykazovaly žádoucí aktivitu při inhibici topoisomerasy II, v současné době je používán polosyntetický derivát etoposid [46]. Kromě něj je také v praxi využíván topotecan, odvozený od kamptotecinu obsaženého v *Camptotheca acuminata* (Nyssaceae) [47]. Další mechanismus účinku představuje inhibice buněčné mitózy. Mezi látky přírodního původu, které inhibují polymeraci mikrotubulů, patří například vinca alkaloidy (vinkristin nebo vinblastin). Tyto látky byly původně izolovány z barvínkovce růžového (*Cantharanthus roseus*), který patří do čeledi Apocynaceae. Funkce mikrotubulů, potřebných k dělení buňky, může také být narušena působením taxanů. Paklitaxel, někdy také označovaný jako Taxol, případně podobný docetaxel byly strukturně odvozeny od obsahových látek tisu (*Taxus spp*) a jsou v současné době využívány v terapii některých nádorových onemocnění včetně karcinomu prsu. Jejich účinek byl potvrzen v mnoha studiích [48].

Nejmodernější přístup v terapii nádorových onemocnění představují monoklonální protilátky. Umožňují velmi specifické působení pouze v místě nádorového bujení. Jejich cílem mohou být některé enzymy, charakteristické pouze pro nádorovou tkáň, případně mohou sloužit jako nosiče cytostatik pro aktivní targetting na potřebná místa. Používání monoklonálních protilátek v terapii je doménou několika posledních desítek let. Značnou nevýhodou je vysoká cena, menší dostupnost a možnost vyvolání nepředvídatelné alergické

reakce. Nepochybně se ale jedná o velmi perspektivní přístup, který s velkou pravděpodobností bude v budoucnosti hrát důležitou roli v terapii nádorových onemocnění.

### 3.5 Biologická aktivita *Geissospermum vellosii*

#### 3.5.1 Inhibiční aktivita vůči cholinesterasám

Jelikož extrakty z rostliny v různých formách byly využívány původním obyvatelstvem na široké spektrum různých onemocnění po dobu stovek let, logicky přitahovaly zájem vědců z Jižní Ameriky i dalších států. Nejprve se jednalo o snahy poznat chemickou strukturu látek obsažených v *Geissospermum vellosii*, později probíhaly i studie usilující o prokázání nějakých konkrétních biologických aktivit týkajících se lidského zdraví.

Za zmínku určitě stojí inhibiční vliv extraktu pao pereira na cholinesterasy, konkrétně acetylcholinesterasu a butylcholinesterasu. V přírodě nalezneme mnoho látek, které působí jako inhibitory těchto enzymů, například alkaloidy fysostigmin nebo huperzin A [49], [50]. Také u dalších rostlin z čeledi toješťovitých, rodu *Rauwolfia*, byla prokázána anticholinesterasová aktivita [51]. I tyto látky mají strukturu indolových alkaloidů, a taktéž byly používány již původním obyvatelstvem mimo jiné ke zmírnění zhoršující se paměti u starších členů kmene. Právě degenerace neuronů a snížené množství neurotransmiterů, zejména acetylcholinu, hraje velkou roli v manifestaci demence při AN. Z tohoto důvodu bylo v průběhu druhé poloviny 20. století provedeno několik studií, které zkoumaly vliv obsažených látek GV na zmíněné enzymy.

V jedné ze studií byl zkoumán vliv extraktu z kůry GV na kognitivní schopnosti myši [52]. Prvním použitým testem byl test pasivního vyhýbání, při kterém má zvíře k dispozici dvě různě osvětlená prostředí, ze kterých jedno preferuje. V jednom prostředí zvíře dostane mírný elektrický šok; tomuto prostředí se následně více vyhýbá [53]. Druhým testem byl Morrisův vodní labyrint. V tomto případě měl kruhovitý labyrint průměr 180 cm a byl naplněn směsí vody a inkoustu. Na jednom místě je pod vodní hladinou umístěna plošina, kterou musí myš najít, aby nemusela dále plavat. Pro určité usnadnění orientace byly v různých okrajových částech kruhu umístěny různě barevné karty. Myš se vložila do vodního prostředí čelem k okraji nádoby a poté mohla 120 sekund hledat skrytou plošinu. Pokud se jí to nepodařilo, byla po uplynutí této doby umístěna na plošinu a ponechána zde po dobu 15 sekund. Test se opakoval několikrát denně několik dní po sobě.

Samcům o hmotnosti mezi 25-35 g byl podán skopolamin v množství 1 mg/kg hmotnosti. Tento alkaloid vyvolává poruchy paměti, úsudku a orientace. Třicet minut poté bylo zkoumáno jejich chování při testu pasivního vyhýbání. Při podání pouze skopolaminu se dle předpokladu kognitivní výkon myši zhoršil. Pokud bylo ještě 15 minut před podáním skopolaminu podáno mezi 30 a 60 mg/kg extraktu z kůry *Geissospermum vellosii*, zhoršení výkonu nebylo tak patrné [52].

V případě vodního labyrintu byl při pětidenním podávání skopolaminu patrný postupný pokles kognitivního výkonu. Čas potřebný k dosažení skryté plošiny se stále zvyšoval, pátý den testů dosáhl  $103,5 \pm 8,3$  s. Při podání 30 mg/kg extraktu 15 minut před

skopolaminem byl pátý den potřebný čas  $66,4 \pm 11,2$  s. Efekt extraktu zmírňující kognitivní deficit byl tedy více než patrný a lze srovnat s kontrolním podáváním takrinu (10 mg/kg), který je prokázaným reverzibilním inhibítozem acetylcholinesterasy [54]. U myši, kterým byl podáván, byl pátý den čas potřebný k dosažení plošiny  $59,4 \pm 13,7$  s [52].

Součástí práce tohoto týmu bylo i zkoumání vlivu extraktu vůči cholinesterasám *in vitro*. Acetylcholinesterasa získaná z mozku laboratorních krys vykazovala asi 15x menší inhibici ( $IC_{50} = 39,3 \mu\text{g/ml}$ ) extraktem GV než AChE z paúhoře elektrického (*Electrophorus electricus*) ( $IC_{50} = 2,9 \mu\text{g/ml}$ ). Rozdíl je dán vysokou interindividuální variabilitou citlivosti AChE [55]. Zkoumán byl také vliv na butylcholinesterasu z koňské krve, ke které mají látky z extraktu vyšší selektivitu ( $IC_{50} = 1,6 \mu\text{g/ml}$ ). Za látku, zodpovědnou za inhibici esteras, byl vědci označen geissospermin [52]. Nelze však vyvrátit ani účast dalších látek obsažených v extraktu.

Geissospermin byl stejnou skupinou výzkumníků podroben dalšímu zkoumání *in silico*. Pomocí molekulárního dokování se zkoumala jeho vazba na aktivní část acetylcholinesterasy parejnoka kalifornského (*Torpedo Californica*). Tyto simulace byly provedeny za využití počítačových programů AutoDock a Molegro Virtual Docker. Pro porovnání byly nejdřív sledovány vazby dosud známých ligandů na AChE, například galanthaminu nebo takrinu. Následně byl navržen model vazby geissosperminu. Bylo zjištěno, že skutečně dochází k interakcím mezi některými částmi molekuly alkaloidu a enzymu. Mezi ně patří například tvorba vodíkových můstků,  $\pi$ - $\pi$  interakce mezi aromatickými jádry nebo hydrofobní interakce [56]. Autoři výzkumu dále uvedli, že by působení geissosperminu na AChE mohlo být ovlivněno jeho strukturním zjednodušením, neboť se jedná o poměrně velkou molekulu s bis-indolovou strukturou.

Do budoucna se tedy zdá vhodné podrobit obsahové látky GV dalšímu zkoumání. V několika na sobě nezávislých studiích se prokázalo, že skutečně dochází k interakci mezi alkaloidy a cholinesterasami. Vliv na kognitivní funkce byl prokázán *in vivo* testy.

### 3.5.2 Antimalarická aktivita

Extrakt z GV je v tradiční lidové medicíně Jižní Ameriky používán jako určitá terapie malárie. K tomuto účelu se nejvíce využívají odvary, v závislosti na tradici připravované buď ve vodě, nebo v alkoholu. Takto připravené odvary se mají užívat 2-3x denně, vždy po jedné sklenici, dokud příznaky onemocnění neustoupí [57]. Dle tradiční receptury kmene Chacobo, který obývá oblast amazonského pralesa na území Bolívie, je na přípravu dvou litrů odvaru potřeba použít 500 g nastrouhané kůry z *Geissospermum vellosii*. Ta se musí dále po dobu 15 minut vařit ve vodě, poté je připravena ke konzumaci [58]. Jako obvykle užívaná denní dávka je popsáno vypítí dvou sklenic za den. Pozitivní vliv takto užívaného extraktu je diskutabilní. Problém může spočívat také v toxickém působení obsažených látek na lidský organismus.

Vědecký výzkum týkající se účinků extraktů z různých tropických rostlin proti původcům malárie, včetně některých z rodu *Geissospermum*, probíhal již po druhé světové válce a byl prováděn americkou armádou. Bohužel se v literatuře nepodařilo dohledat přesvědčivé prameny, které by k účinnosti extraktu z GV podaly nějaký konkrétní závěr.

Další studie s důvěryhodnými výsledky přišly až se začátkem nového tisíciletí. Z nadrcené kůry *Geissospermum vellosii* byl připraven surový methanolový extrakt, který byl dále pomocí protiproudé chromatografie rozdělen do několika frakcí. Z některých vybraných frakcí bylo pomocí TLC přečištěno a získáno menší množství alkaloidů. Ještě před samotným zkoušením byla pomocí NMR a LC/MS určena struktura majoritních látek obsažených v extraktu. Jednalo se o geissolosimin, geissospermin, geissoschizolin, geissoschizon a vellosiminol. Zkoumal se jak samostatný vliv těchto alkaloidů, tak i celkový efekt frakce, ze které byly získány. Parazité druhu *Plasmodium falciparum*, citliví na léčbu chlorochinem (D10), byli *in vitro* vystaveni účinkům některých získaných alkaloidů z GV. Předmětem zkoumání bylo zjistit koncentraci látek, při které dojde k 50% inhibici životního cyklu parazita (IC<sub>50</sub>). Počáteční koncentrace byla 100 µg/ml, dále docházelo k ředění. Pouze geissolosimin byl účinnější samostatně (IC<sub>50 D10</sub> = 0,55 ± 0,05 µg/ml), v ostatních případech byl vyšší účinek u frakcí [59], lze tedy brát v potaz synergistické působení obsahových látek. Jako referenční látka byl použit chlorochin.

I přes slibné výsledky z *in vitro* testování je nutné antimalarické působení potvrdit také *in vivo* testy na savcích. Dalším problémem může představovat případná toxicita látek obsažených v extraktu. Jak již bylo zmíněno výše v úvodu, mezi nakažené malárií často patří děti, u kterých se může toxické působení manifestovat ještě více než u dospělých jedinců. Při objevení takové nové účinné látky by její toxicita teoreticky mohla být odstraněna nebo snížena nějakou strukturální modifikací, to ale musí být předmětem dalšího zkoumání.

Další výzkum, který se věnoval druhu *Geissospermum sericeum*, porovnával antimalarické působení některých obsažených alkaloidů proti chlorochin-rezistentnímu kmenu *Plasmodium falciparum* (K1) ve srovnání s referenční látkou, kterou byl chlorochin. Zkoumán byl například flavopereirin nebo geissoschizolin a jeho oxidační produkty, kterými jsou například geissoschizolin-*N*-oxid nebo 1,2-dihydrogeissoschizolin. Výskyt posledních dvou zmíněných látek v rostlině nebyl potvrzen žádnou studií, jedná se tedy pravděpodobně o látky vzniklé oxidací v průběhu zkoumání a zpracovávání extraktů [60]. Flavopereirin prokázal nejvyšší aktivitu, byť ani zdaleka nedosáhl takových hodnot jako referenční chlorochin. Navíc se projevil i jeho cytotoxické vlastnosti vůči lidským buněčným liniím. Úplně nejlepších výsledků dosáhnul celkový surový extrakt (IC<sub>50 K1</sub> = 1,78 µM) [60], z čehož je možné usuzovat, že se jednotlivé obsahové látky svými účinky doplňují. Tento fakt dále taky potvrzuje, že využívání ethanolových extraktů v lidovém léčitelství má nějaké opodstatnění, ale spíše jako podpůrná léčba, než ke kompletní eradikaci parazita z lidského těla.

V jednom z dalších výzkumů byla zkoumána antimalarická aktivita několika tradičně užívaných rostlin na území Francouzské Guyany, včetně *Geissospermum vellosii*, *Geissospermum sericeum* a *Geissospermum argenteum*. Odvary z kůry zmíněných rostlin byly využívány místním obyvatelstvem preventivně proti manifestaci malarického onemocnění a jsou známy podle tradičně používaného názvu „Maria Congo“. Při zkoumání antimalarické aktivity *in vitro* i *in vivo* testech na myších byly použity jak odvary připravené vařením kůry ve vodě po kratší dobu, tak maceráty v alkoholu (rumu) macerované po dobu jednoho měsíce. Některé z vodných extraktů prokázaly slibnou aktivitu *in vitro*, ale při *in vivo* testech už výsledky tak zajímavé nebyly. Samotnými výzkumníky bylo zpětně uvedeno, že při *in vivo* testování možná nebyly použity dostatečně vysoké dávky. Naopak solidní výsledky byly prezentovány u alkoholových extraktů, konkrétně u *Geissospermum argenteum*. Zde byl



zaznamenán inhibiční vliv na jaterní stádium parazita *Plasmodium yoellii*, kdy došlo k snížení hepatálního množení až o 83% [61]. Závěrem je tedy možné konstatovat, že pro dosažení žádoucího preventivního působení proti množení původců malárie v lidském organismu je vhodnější využít spíše ethanolové extrakty, do kterých lépe přecházejí obsahové látky z rostlinné drogy.

Působení proti původcům malárie nemusí být vyhrazeno pouze jedné rostlině. Tomu nasvědčuje výše uvedený etnofarmakologický výzkum. V něm byla zkoumána účinnost různě připravených extraktů z různých částí rostlin. Za zmínku určitě stojí použití kombinace několika přírodních látek, získaných třeba z *Passiflora sprucei* nebo *Quassia amara* [62]. Kombinací několika mechanismů účinků může dojít ještě k lepším výsledkům. Nelze opomenout ani přidání tradiční rostlinné léčby k terapii antimalariky, což by při podložení účinnosti a vyvrácení nežádoucího toxického působení na lidské buňky mohlo být zajímavou formou maximalizace účinku léčby.

### 3.5.3 Protinádorová aktivita

Léčba nádorových onemocnění za poslední století prošla rapidním vývojem. Častým problémem souvisejícím s používáním cytostatických léčiv je jejich nespecifické působení, z čehož vyplývá i možné poškození zdravých buněk. Některé z  $\beta$ -karbolinových alkaloidů, mezi které patří i flavopereirin, vykazovaly v některých studiích schopnost inhibice syntézy DNA rakovinných buněk *in vitro*, aniž by ovlivňovaly syntézu DNA zdravých buněk. Hypotéza je taková, že struktura zdravé DNA je více stabilizovaná, například vodíkovými můstky, zatímco v uvolněné struktuře DNA probíhá nekontrolované dělení, pro které je charakteristická přítomnost více jednovláknové DNA. Právě tato vlákna mají poskytovat ideální vazebný prostor pro alkaloidy s kvartérním dusíkem, mezi které kromě flavopereirinu patří například serpentín (izolovaný z *Rauwolfia serpentina*) nebo alstonin (izolovaný z *Rauwolfia vomitoria*). Tyto látky mají mít schopnost se navázat specificky pouze na DNA rakovinných buněk, čímž mají vykazovat vysokou specifitu pouze k poškozeným buňkám [63]. V navazujícím výzkumu byly za hlavní látky zodpovědné za tyto vlastnosti označeny flavopereirin a dihydroflavopereirin. Směs dvou alkaloidů byla autorem označena jako PB-100, přičemž její koncentrace 100  $\mu\text{g/ml}$  měla mít za následek zastavení dělení rakovinných buněk až z 98%. Zdravé buňky neměly podle hypotézy být alkaloidy ovlivněny. Původně byly tyto látky získané z přírodního extraktu, později proběhla i jejich syntéza. Účinek látek chemického i přírodního původu měl být srovnatelný na několik linií rakovinných buněk, včetně glioblastomu nebo karcinomu prostaty [64]. Ačkoli byly prezentované výsledky velmi slibné, nebyly nikdy potvrzeny *in vivo* studiemi, které by dokázaly, že extrakt skutečně velmi selektivně působí proti buňkám karcinomů. Věrohodnost celého výzkumu je narušena i tím, že samotný výzkumník Mirko Beljanski odmítal spolupracovat při oficiálním zkoumání zodpovědnými orgány [65].

V dalších studiích vlivu flavopereirinu na rakovinné buňky byla zkoumána jeho schopnost *in vitro* inhibovat růst buněk karcinomu prsu pomocí zastavení buněčného cyklu a indukce apoptózy. Pro výzkum byly vybrány MCF-7 a MDA-MB-231 linie buněk karcinomu prsu. Flavopereirin prokázal schopnost snížení životaschopnosti a dělení takových buněk v závislosti na dávce a času.  $\text{IC}_{50}$  MDA-MB-231 (5,96  $\mu\text{M}$ ) byla zhruba poloviční než  $\text{IC}_{50}$

MCF-7 (12,43  $\mu\text{M}$ ). Po 48 hodinách působení flavopereirinu (15  $\mu\text{M}$ ) byla pozorována větší míra apoptózy u buněk MDA-MB-231, ty proto byly označeny za citlivější na působení tohoto alkaloidu. Apoptóza těchto buněk byla vyvolána větší expresí aktivované kaspasy-3 a kaspasy-9. Dále se na flavopereirinem indukované apoptóze MDA-MB-231 buněk částečně podílí signální dráha AKT/p38 MAPK/ERK, i když přesný mechanismus účinku zůstává nejasný [66]. Aktivace p-38 mitogen-aktivované protein-kinasy může v některých případech indukovat zánik buňky [67]. Některá ze současně používaných chemoterapeutik, včetně cyklofosfamidu nebo cis-platiny, indukují apoptózu nádorových buněk právě přes aktivaci této signální kaskády [68].

Schopnost zastavit dělení nádorových buněk za účasti flavopereirinu byla prezentována také u kolorektálního karcinomu. Při *in vivo* testech flavopereirin způsobil up-regulaci proteinu p53 a následně p21 [17]. Tyto dva proteiny působí tumor-supresivně, pokud naleznou v buňce poškozenou DNA, zastaví její replikaci až do té doby, dokud není chyba v informaci opravena. Pokud chybu nelze opravit, dochází k indukci apoptózy poškozené buňky [69]. Prezentované výsledky se zdají být slibné, nicméně je vhodné je podpořit dalšími studii. Potvrzení získaných výsledků by mohlo do budoucna přinést další molekuly využitelné v terapii nádorových onemocnění, případně by mohlo představovat adjuvantní léčbu k současně používané terapii doposud známými chemoterapeutiky.

Právě použití extraktů z rostlin jako adjuvantní terapie může přinést žádoucí výsledky při léčbě nádorových onemocnění. V jedné z dalších studií, věnující se vlivu flavopereirinu na tumory, byla sledována jeho inhibiční aktivita na nádorové buňky karcinomu vaječníku (OVCAR-5, OVCAR-8, SHIN-3) v porovnání s inhibičním vlivem na zdravou linii lidských buněk (MRC-5). Samotný flavopereirin vykazoval určitou selektivitu vůči rakovinným buňkám ( $\text{IC}_{50}$  pro nádorové buňky se pohybovalo mezi 180 a 235  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , zatímco  $\text{IC}_{50}$  pro zdravé buňky bylo stanoveno na hodnotu 537  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Indukce apoptózy byla závislá na použité dávce alkaloidu. Poté, co byla potvrzena selektivita látky k nádorovým buňkám, bylo provedeno srovnání inhibice růstu při použití konvenčně používané karboplatiny a použití karboplatiny v kombinaci s flavopereirinem. Při použití kombinace došlo k synergistickému působení obou látek, bylo tedy možné snížit potřebnou koncentraci karboplatiny k dosažení stejného žádoucího efektu.

Následně byla testována aktivita *in vivo*, kdy laboratorním myším byla intraperitoneálně implantována linie SHIN-3 buněk. Samotný flavopereirin zaznamenal při použité koncentraci 20 mg/kg a 50 mg/kg denně snížení hmotnosti nádoru o 58, resp. 79%. Samotná karboplatina při týdenní dávce 15 mg/kg snížila hmotnost nádoru o 45%. Kontrolní skupině myší byl podáván dimethylsulfoxid. V případě použití kombinace karboplatiny a flavopereirinu byly získány solidní výsledky. Objem nádoru se snížil o 89% při použití koncentrace 20 mg/kg alkaloidu a uvedené dávky karboplatiny a dokonce o 97% při použití vyšší koncentrace alkaloidu v kombinaci s karboplatinou, v porovnání s kontrolní skupinou. Kombinace  $\beta$ -karbolinu a chemoterapeutika zaznamenala i výrazné snížení objemu ascitu, který byl přítomný. Předchozí *in vitro* zkoumání bylo tedy potvrzeno těmito *in vivo* studii. Při použití uvedených koncentrací nebyla u myší pozorována toxicita látek na jejich vnitřní orgány [70].

## 4 Experimentální část

### 4.1 Laboratorní potřeby

#### 4.1.1 Rozpouštědla

- chloroform p.a. ( $\text{CHCl}_3$ ) (Ing. Švec, Penta-Praha)
- diethylether p.a. (Ing. Švec, Penta-Praha)
- diethylamin p.a. ( $\text{Et}_2\text{NH}$ ) (Ing. Švec, Penta-Praha)
- ethylacetát p.a. ( $\text{EtOAC}$ ) (Ing. Švec, Penta-Praha)
- ethanol 95% ( $\text{EtOH}$ ) (Lihovar Chrudim)
- methanol p.a. ( $\text{MeOH}$ ) (Ing. Švec, Penta-Praha)
- toluen p.a. ( $\text{To}$ ) (Ing. Švec, Penta-Praha)
- benzín lékařský vyhovující ČL a ČSN 656544 (Ing. Švec, Penta-Praha)
- ether p.a. (Ing. Švec, Penta-Praha)
- cyklohexan p.a. ( $\text{cHex}$ ) (Ing. Švec, Penta-Praha)
- aceton p.a. ( $\text{Ac}$ ) (Ing. Švec, Penta-Praha)
- chloroform deuterizovaný pro NMR analýzu (Sigma Aldrich, Praha)

#### 4.1.2 Chemikálie

- síran sodný bezvodý (Ing. Švec, Penta-Praha)
- uhličitan sodný (Ing. Švec, Penta-Praha)
- kyselina chlorovodíková (Ing. Švec, Penta-Praha)
- kyselina L-vinná p.a. (Balex, Pardubice)
- dusičnan bismutitý zásaditý (Lachema, Brno)
- jodid draselný (Lach-Ner, Neratovice)
- uhličitan sodný bezvodý (Ing. Švec, Penta-Praha)
- chlorid rtuťnatý p.a. (Fisher Scientific, Pardubice)

#### 4.1.3 Detekční činidla

- Dragendorffovo činidlo

Zásobní roztok Dragendorffova činidla se připraví smísením roztoku A a roztoku B v poměru 1 : 1 (v/v).

Detekční roztok se připraví smísením 5 ml zásobního roztoku s roztokem 10 g kyseliny vinné v 50 ml vody.

roztok A: 1,7 g zásaditého dusičnanu bismutitého a 20 g kyseliny vinné se rozpustí v 80 ml vody.

roztok B: 16 g KI se rozpustí ve 40 ml vody.

Zásobní i detekční roztok byly uchovávány v chladničce při teplotě 4°C.

- Mayerovo činidlo

Roztok byl připraven rozpuštěním 5 g KI ve 30 ml vody. Následně bylo přidáno 1,35 g práškového chloridu rtuťnatého a mícháno do rozpuštění.

#### 4.1.4 Vyvíjecí soustavy pro preparativní a analytickou TLC

- S<sub>1</sub>: cHex : Et<sub>2</sub>NH 9 : 1
- S<sub>2</sub>: To : Et<sub>2</sub>NH 9 : 1
- S<sub>3</sub>: To : EtOAc : MeOH 1 : 1 : 0,1

#### 4.1.5 Chromatografické absorbenty

- komerční hliníková deska Merck 60 Silicagel GF<sub>254</sub> for TLC
- nalévaná deska s oxidem hlinitým Merck Silicagel 60 GF<sub>254</sub>
- neutrální oxid hlinitý (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) pro chromatografii, 63 – 200 μm

#### 4.1.6 Přístrojové vybavení

- Vakuová odparka Laborota 20 Heidolph (Heidolph, Schwabach, Germany)
- Spektrometr EI/MS na GC/MS systému Agilent 7890A GC 5975 (Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA)
- Spektrometr Varian VNMR S500 NMR (Varian, Palo Alto, California, USA)
- UV lampa
- Polarimetr P3000 (A.Krüss Optronic, Hamburg, Germany)

#### 4.1.7 Rostlinný materiál

- sušená drcená kůra *Geissospermum vellosii*

#### 4.1.8 Činidla pro stanovení cholinesterasové inhibiční aktivity

- Roztok 5mM DTNB:

Roztok se připraví rozpuštěním naváženého množství DTNB v takovém množství 100 mM fosfátového pufru pH 7,4, aby vzniknul 5 mM roztok. Vzniklý roztok je čirý nebo mírně nažloutlý a skladuje se v chladničce při teplotě 4°C po dobu maximálně jednoho týdne.

- Roztok 10mM ATChI:

Roztok se připraví rozpuštěním odpovídajícího množství látky ve vodě, aby vzniklá koncentrace byla 10 mM a roztok zůstal čirý. Činidlo se skladuje v chladničce při teplotě 4°C po dobu maximálně jednoho týdne.

- Roztok 10 mM BuTChI:

Roztok se připraví rozpuštěním odpovídajícího množství látky ve vodě, aby vzniklá koncentrace byla 10 mM a roztok zůstal čirý. Činidlo se skladuje v chladničce při teplotě 4°C po dobu maximálně jednoho týdne.

#### 4.1.9 Pufry

- 100 mM fosfátový pufr pH 7,4

Pufr se připraví smísením 57 ml roztoku A a 243 ml roztoku B a 300 ml vody.

Zásobní roztok A je 200 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1 litr roztoku obsahuje 24,0g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>).

Zásobní roztok B je 200 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (1 litr roztoku obsahuje 28,4 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>).

## 4.2 Testování biologické aktivity izolovaných látek

### 4.2.1 Chemikálie

- acetylthiocholin jodid (Sigma-Aldrich) (10mM roztok)
- butyrylthiocholin jodid (Sigma-Aldrich) (10mM roztok)
- 5,5' -ditiobis-2nitrobenzoová kyselina ≥98% (Sigma Aldrich) (5mM roztok)
- dimethylsulfoxid p.a. (Sigma-Aldrich) (DMSO)
- galanthamin hydrobromid 95% (Changsha Organic Herb Inc., China)
- huperzin A 95% (TAZHONGHUI) (Tai'an zhonghui Plant Biochemical Co., Ltd., China)
- 5mM fosfátový pufr pH 7,4
- 5mM fosfátový pufr pH 7,4 obsahující 150 mM chloridu sodného
- 100mM fosfátový pufr pH 7,4
- Rekombinantní AChE (Univerzita Hradec Králové)

- Rekombinantní BuChE (Univerzita Hradec Králové)

#### 4.2.2 Přístroje

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

Podmínky měření:

Měřeno při teplotě 37 °C v prostředí fosfátového pufru (pH 7,4). Spektrofotometrické stanovení barevných produktů při vlnové délce 436 nm pro AChE a 412 nm pro BuChE

### 4.3 Vlastní stanovení inhibiční aktivity izolovaných alkaloidů

Pro stanovení hodnoty IC<sub>50</sub> byla použita Ellmanova spektrofotometrická metoda s použitím 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoové kyseliny (DTNB)178 [ $\lambda = 436$  nm (AChE), nebo  $\lambda = 412$  nm (BuChE)]. Během stanovení je sledován nárůst absorbance za 1 min. Hodnoty IC<sub>50</sub> jsou vypočítány ze získaných hodnot poklesu aktivity AChE nebo BuChE nelineární regresí v programu GraphPaD Prism (verze pro Windows; výrobce GraphPaD Software, San Diego, CA, USA). Výsledky byly porovnány s hodnotami IC<sub>50</sub> známých inhibitorů cholinesteras - galanthaminem a huperzinem A. Procenta inhibice (% I) jsou počítána podle vzorce:

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

% I – procento inhibice;  $\Delta A_{Bl}$  – pokles absorbance slepého vzorku během 1 min;  $\Delta A_{Sa}$  – absorbance testovaného vzorku během 1 min.

#### 4.3.1 Stanovení aktivity látek

Nejprve byl proveden screening při 100 mM, pokud byla inhibiční aktivita vyšší než 50%, došlo ke stanovení IC<sub>50</sub>. Pro měření inhibiční aktivity látky jsou použity koncentrace: 40; 10; 4; 1 a 0,4 mM, případně další série koncentrací v tomto početním modu, je-li aktivita vysoká. Do poslední 6. řady je pipetován DMSO jako slepý vzorek.

Získané inhibiční aktivity IC<sub>50</sub> AChE a IC<sub>50</sub> BuChE pro jednotlivé látky byly porovnávány s inhibičními aktivitami referenčních látek – galanthaminem (IC<sub>50</sub> AChE = 1,710 ± 0,065 μM, IC<sub>50</sub> BuChE = 42,301 ± 0,065 μM), Huperzinem A (IC<sub>50</sub> AChE = 0,033 ± 0,001 μM, IC<sub>50</sub> BuChE > 1000 μM) a berberinem (IC<sub>50</sub> AChE = 0,705 ± 0,104 μM, IC<sub>50</sub> BuChE = 30,721 ± 3,492 μM).

## 4.4 Stanovení inhibiční aktivity vůči GSK-3 $\beta$

### 4.4.1 Chemikálie

- Dimethylsulfoxid p.a. (DMSO) (Sigma-Aldrich)
- Adenosin 5-trifosfát (ATP) (Sigma-Aldrich)
- GSM (Sigma-Aldrich)
- GSK-3 $\beta$  (Sigma-Aldrich)
- SB 415286 (Sigma-Aldrich)
- souprava činidel Kinase-Glo (Promega) (Sigma-Aldrich)
- Pufir pH 7,4(složení: octan hořečnatý (Sigma-Aldrich)
- Kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA) (Sigma-Aldrich)
- Tetra sodná sůl EGTA (Sigma-Aldrich)
- 2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethansulfonová kyselina (HEPES) (Sigma-Aldrich)

### 4.4.2 Přístroje

- Multireader Victor X3

### 4.4.3 Stanovení inhibiční aktivity

Stanovení inhibiční aktivity proběhlo ve spolupráci s dr. Vincenzou Andrisano z Department for Life Quality Studies University of Bologna. Stanovení bylo provedeno pomocí Kinase-Glo Kit (Promega Biotech Iberica, S.L., Madrid, Španělsko), humánní rekombinantní GSK-3 $\beta$  a GSM substrát napodobující svalovou glykogen synthasu (Merck Millipore, Darmstadt, Německo) luminiscenční metodou podle Bakiho et al. Stanovení bylo provedeno v bílých 96 jamkových destičkách s plochým dnem. V každé jamce bylo 10  $\mu$ l roztoku testované látky v DMSO o výsledné koncentraci 1 mM naředěného pufrem (50 mM HEPES, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA a 15 mM octanu hořečnatého) na požadovanou koncentraci. K tomuto roztoku bylo přidáno 10  $\mu$ l ATP (výsledná koncentrace 1  $\mu$ M), 10  $\mu$ l 100  $\mu$ M GSM a 10  $\mu$ l GSK-3 $\beta$  (20 ng). Negativní kontrola byla vytvořena přidáním dalších 10  $\mu$ l pufru a kdo pozitivní kontroly bylo přidáno 10  $\mu$ l standardu SB-415286. Celková koncentrace DMSO ve výsledné směsi nepřesáhla 5 %. Reakční směs byla 30 min inkubována při teplotě 37 °C, poté byla enzymatická reakce zastavena přidáním 40  $\mu$ l Kinase-Glo činidla. Po dalších 10 min byla měřena luminiscence (dlouhodobý typ luminiscence). Hodnoty IC<sub>50</sub> byly spočítány a vyhodnoceny pomocí programu GraphPaD Prism (verze pro Windows; výrobce GraphPaD Software, San Diego, CA, USA).

## **4.5 Obecné postupy:**

### **4.5.1 Příprava a čištění rozpouštědel**

Všechna komerčně dodávaná rozpouštědla byla před použitím predestilována dle běžných laboratorních zvyklostí.

Po tomto procesu byla rozpouštědla uchovávána v tmavých lahvích pro zamezení působení slunečního záření.

### **4.5.2 Odpařování**

Získané alkaloidní extrakty byly odpařeny na rotační vakuové odparce Heidolph za sníženého tlaku a ve vodní lázni o teplotě 40°C.

Pro odpaření menších množství extraktů byla použita pouze vodní lázeň o teplotě 45°C a proud vzduchu.

Zahuštěné extrakty byly skladovány v chladničce při teplotě 3 °C.

### **4.5.3 Tenkovrstvá chromatografie**

Podle potřeby se využily buď komerčně vyráběné hliníkové desky, nebo individuálně nalité skleněné desky. Vzorky byly nanášeny na startovní čáru rozpuštěné v malém množství chloroformu. Skleněné komory různých velikostí byly naplněny vybranou mobilní fází a nasyceny po dobu 20-25 minut. Množství mobilní fáze bylo zvoleno tak, aby v ní byl spodní okraj desky ponořen a zároveň hladina nedosahovala ke startovní čáře.

Po vyvinutí byly desky vysušeny.

### **4.5.4 Příprava litých desek**

Skleněné desky o rozměru 15x15 cm byly opláchnuty chloroformem. Do kádinky bylo naváženo 6,5 g silikagelu a přidáno cca 20 ml vody. Po důkladném zamíchání se vzniklá suspenze rovnoměrně nalila na desku a nechala 24 hodin zaschnout.

### **4.5.5 Detekce**

Vyvinuté chromatogramy se po důkladném vysušení vložily pod UV lampu. Detekce probíhala při 254 nm. Silikagel z desek působením UV záření zeleně fluoreskoval, oblasti s alkaloidy se projeví jako tmavá místa – docházelo na nich ke zhášení UV záření. Pak byl



chromatogram podroben nástřiku Dragendorffovým činidlem. Pozitivní reakce potvrzující přítomnost alkaloidů se projevila oranžovým zbarvením.

#### **4.5.6 Sloupcová chromatografie**

Kolona byla připravena naléváním suspenze  $\text{Al}_2\text{O}_3$  v mobilní fázi. Následovalo vytvoření roztěru (etherový extrakt a malé množství rozpouštědla) a jeho nanesení na kolonu. Poté byla kolona promývána mobilní fází na principu gradientové eluce, kdy se postupně měnil poměr jednotlivých složek (Tabulka 2). Při přerušení eluce byla celá kolona chráněna před přímým slunečním zářením vrstvou látky.

#### **4.5.7 GC/MS analýza**

Analýza izolovaných látek byla provedena na plynovém chromatografu Agilent 7890A GC 5975, který pracuje s hmotnostním detektorem při elektronové ionizaci 70 eV a za teplotního programu 100-180°C (7 minut), 180°C (1 minuta) a 180-300°C (24 minut). Použitou kolonou byla Hp-5 MS (30 m × 0,25 mm × 0,25 μm, Agilent Technologies, USA). Jako nosný plyn bylo použito helium o průtokové rychlosti 1 ml/min. Nástřik vzorku byl proveden při teplotě 180°C a objem byl 1 μl methanolického roztoku (split 1:10).

Identifikace alkaloidů proběhla porovnáním jejich spekter se spektry dostupnými v komerční knihovně NIST 11 (National Institute of Standards and Technology Library USA), s daty publikovanými v odborné literatuře a se standardy látek, které již byly izolovány na našem pracovišti.

#### **4.5.8 NMR analýza**

NMR spektra ( $^1\text{H}$ -NMR a  $^{13}\text{C}$ -NMR) byla měřena na přístroji Bruker Avance DRX 500 Spectrometer, a to při pracovní frekvenci 500 MHz pro  $^1\text{H}$  a 125 MHz pro  $^{13}\text{C}$ . Měření bylo prováděno v  $\text{CDCl}_3$  (deuteriochloroformu) při teplotě 25 °C. Chemické posuny  $\delta$  byly zaznamenávány v jednotkách pars per milion (ppm). Hodnoty  $^1\text{H}$ -NMR spektra jsou vztaženy k inertnímu standardu (tetramethylsilan; 7,26 ppm) a hodnoty  $^{13}\text{C}$ -NMR spektra k signálu rozpouštědla (77,0 ppm).

#### **4.5.9 Měření optické otáčivosti**

Optická otáčivost methanolových nebo chloroformových roztoků izolovaných látek byla měřena na polarimetru P3000. Specifická otáčivost jednotlivých látek byla vypočtena na základě níže uvedeného vzorce.

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

a – naměřená otáčivost [°]

c – koncentrace měřené látky [g/100ml]

l – délka kyvety [dm]

t – teplota měření [°C]

## 5 Izolace

### 5.1 Zpracování drogy

Od dodavatele *Amazon Herbs Surinam* bylo v říjnu 2018 objednáno celkem 48 kg sušené kůry. Kůra byla rozemleta na kousky o velikosti do cca 5 mm.

Dokladný vzorek byl uchován na katedře farmaceutické a označen jako AL-G74.

### 5.2 Extrakce

Rozdrobněná kůra byla vložena do Erlenmayerových baněk a přidal se 96% EtOH tak, aby výsledný poměr droga : rozpouštědlo byl cca 1 : 4. Droga byla dvakrát vařena po dobu 30 minut pod zpětným chladičem. Vzniklý extrakt byl zfiltrován a poté odpařen na rotační vakuové odparce. Tím byl získán primární extrakt tmavě hnědé barvy a lehce viskózní konzistence o hmotnosti cca 5 kg.

Primární extrakt byl rozpuštěn v 0,5 l 95% EtOH a převeden do destilační baňky. Do baňky se pak přidalo 1,5 l vody, vzniklá směs byla zahřáta na 60°C a EtOH byl odpařen. Do zbytku se přidalo cca 5 litrů horké vody o teplotě 80°C a směs byla důkladně promíchána.

Dále bylo třeba upravit pH směsi na hodnoty mezi 1,3-1,5. Toho bylo dosaženo přidáním 5% kyseliny chlorovodíkové. Vzniklý roztok byl doplněn vodou na 15 l a přes noc se nechal sedimentovat. Další den byl opatrně dekantován a zfiltrován přes vrstvu neutrální křemelinu. Zachycený zbytek na křemelině byl promyt menším množstvím vody. Celkově bylo získáno asi 17,5 l roztoku pro vytřepávání.

### 5.3 Vytřepávání terciárních bází

Ještě před samotným vytřepáváním byl vzniklý roztok naředěn v poměru 1 : 1 destilovanou vodou. Každý jeden litr takto vzniklé směsi byl převeden do Erlenmayerovy baňky, alkalizován 200 ml 10% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> a smíchán s 500 ml chloroformu.

První třepání se provádělo přímo v baňce, poté byl roztok přefiltrován přes vliselín do třepáčky. Po důkladném a pětkrát opakovaném vytřepání se vyčkalo na ustanovení rovnováhy a spodní chloroformová vrstva byla odpuštěna. Chloroformový výtřepek byl zfiltrován a odpařen na odparce. Tímto postupem bylo získáno 1530 g tmavě hnědého sirupovitého extraktu.

## 5.4 Čištění extraktu

Celkové množství 1530 g sirupovitého extraktu z předchozího kroku bylo rozpuštěno v  $\text{CHCl}_3$  a rozděleno do 6 baněk po 255 g. Baňka byla zahřata na  $70^\circ\text{C}$ , čímž došlo ke ztekucení obsahu. K němu bylo poté přidáno 200 ml 5%  $\text{HCl}$  a důkladně promícháno ve vodní lázni. K obsahu baňky se pak přidalo ještě 500 ml destilované vody a znovu promícháno. Vzniklá suspenze se nechala mírně vychladnout a poté byl kyselý vodný obsah převeden do jiné baňky. Původní baňky obsahovaly nerozpuštěné zbytky, postup se tedy identicky opakoval. Jediným rozdílem bylo, že na konci byly ještě na 5 minut ponořeny do ultrazvukové lázně. Každá ze šesti baněk byla zpracovávána zvlášť. Na konci byly nerozpuštěné zbytky z baněk spojeny, přelity 500 ml 5%  $\text{HCl}$  a důkladně zamíchány. Dále bylo přidáno 600 ml destilované vody a znovu zamícháno. Kyselá vodná vrstva byla převedena do jiné nádoby. Obsahy jednotlivých baněk byly spojeny, naředěny destilovanou vodou, ponechány vychladnout a následně zfiltrovány. Tímto postupem bylo získáno 12,5 l hnědého kyselého vodného roztoku.

Tento vodný roztok alkaloidů byl rozdělen po jednom litru do dělicích nádob. Každý jeden litr byl alkalizován 230 ml 10%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Poté se vytřepávalo etherem. Na první vytřepávání se použilo 600 ml, poté ještě 4x 300 ml. Vodná a etherová fáze se dobře rozdělila, kromě toho se vyloučila ještě hnědošedá sraženina. Spodní vodná vrstva byla odpuštěna stranou do další nádoby; horní etherové vrstvy byly spojeny, přefiltrovány a bylo z nich odpařeno rozpouštědlo. Tímto postupem vznikl hnědožlutý, velmi viskózní alkaloidový odparek o hmotnosti 50,4 g, který byl využit pro sloupcovou chromatografii v dalším kroku.

Odpuštěná vodná vrstva po detekci Mayerovým činidlem silně reagovala na přítomnost alkaloidů. Proto byla vytřepána chloroformem; nejprve 500 ml a poté ještě 5x 350 ml. Spojené chloroformové výtřepky byly zfiltrovány a odpařeny na vakuové odparce. Pro další práci nebyl tento výtřepek využíván, byl pouze uskladněn v chladničce na katedře.

## 5.5 Sloupcová chromatografie

Celkové množství 50,4 g alkaloidního odparku bylo rozpuštěno v potřebném množství ethylacetátu a chloroformu a v poměru 1:4 smícháno s adsorbentem. Došlo k postupné adsorpci na stacionární fázi, rozpouštědla byla odpařena. Takto připravený roztěr byl připraven k nanesení na sloupec.

Tabulka 1: Parametry sloupcové chromatografie

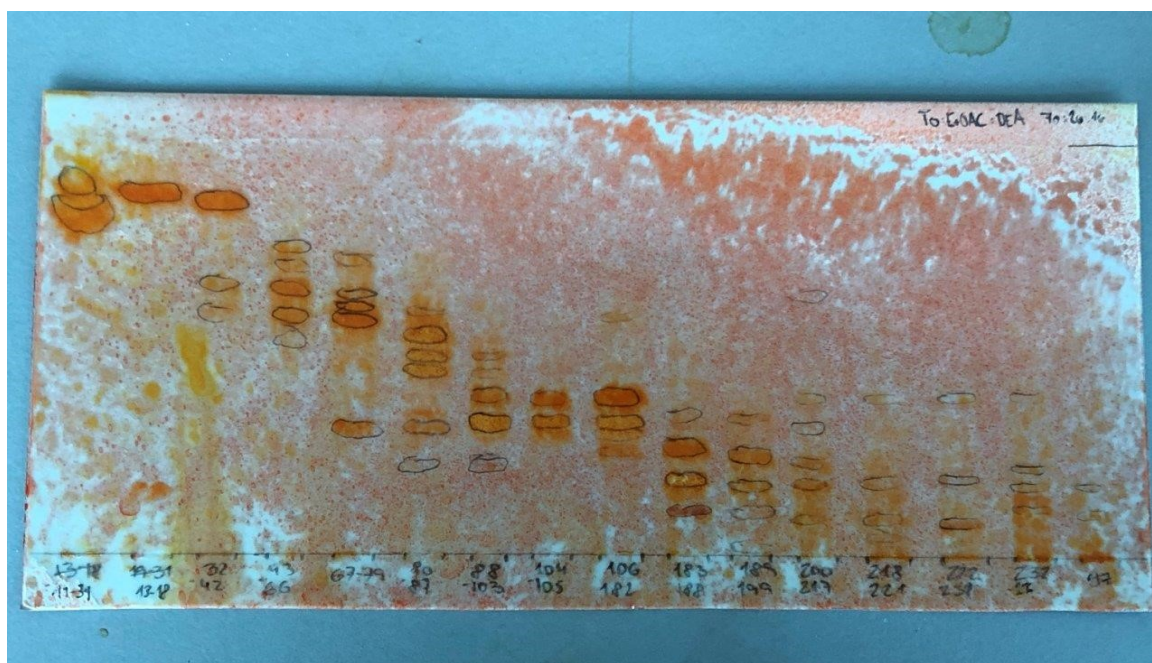
Hmotnost odparku	50,4 g
Hmotnost adsorbentu	2050 g
Rozměry kolony	7,2 x 50 cm
Mrtvý objem	1600 ml
Objem frakce	250 ml
Doba toku	20 min

Rozdělení na sloupci bylo provedeno postupem takzvané gradientové eluce, kdy postupně dochází k úpravě poměrů jednotlivých složek mobilní fáze za účelem stoupající polarity. Prolévání sloupce zahájeno směsí chloroform : benzín v poměru 1 : 1. Následně byl postupně zvyšován podíl chloroformu až na 100% kolem 180. frakce. Dále byl chloroform mísen s ethanolem až do poměru 1:1 (Tabulka 2).

Tabulka 2: Průběh sloupcové chromatografie

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

Během této práce bylo zachyceno celkově 272 frakcí po 250 ml. Na základě analytických tenkovrstvých chromatografií byly jednotlivé frakce spojeny a vytvořeno tak celkově 16 frakcí (GV1 až GV16). Rozdělení frakcí bylo ověřeno vyvinutím na komerčně vyráběných hliníkových deskách Silica Gel 60 F254 od firmy Merck (Obrázek 12).



Obrázek 12: Souhrnné TLC frakcí GV1-GV16

## 5.6 Zpracování frakce GV-9 – preparativní TLC

V rámci této diplomové práce byla nadále zpracována frakce GV-9. Extrakt byl rozpuštěn v ethylacetátu a pomocí pera v čáře nanesen na startovní linii předem připravených nalitých skleněných desek. Desky byly následně vyvinuty v předem nasycených komorách, nejprve se jako mobilní fáze použila směs  $S_1$ , pak  $S_2$ . Po vyvinutí a důkladném vysušení proudem horkého vzduchu byly pod UV lampou patrné 4 oddělené vrstvy GV9-(A- D). Tyto vrstvy byly zaznamenány a následně vyškrábnutím i se silikagelem rozděleny na jednotlivé čtyři zóny. Poté proběhla jejich eluce ze stacionární fáze v eluční koloně – vzorky byly naneseny na kolonu a promývány směsí EtOH:CHCl<sub>3</sub> (1:1). Následovalo odpaření rozpouštědel a krystalizace. Jednotlivé vzorky byly podrobeny strukturální analýze.



Obrázek 13: Chromatogram po nástřiku Dragendorffovým činidlem, zobrazeno rozdělení jednotlivých podfrakcí GV9A-D.

## 5.7 Zpracování podfrakce GV-9-C

Pro další práci byla zvolena podfrakce C. Zpracovávané množství o hmotnosti 210 mg bylo rozpuštěno v chloroformu a v čáře perem nanese na skleněnou desku se silikagelem. Následovalo vyvíjení ve vhodné mobilní fázi ( $S_3$ ), které bylo zopakováno dvakrát. Po vysušení se pod UV lampou zobrazily tři oddělené vrstvy, které byly označeny jako C1, C2 a C3. Stejně jako v předchozím kroku i zde proběhlo ohraničení jednotlivých vrstev a poté jejich vyškrábnutí, eluce a přečištění.



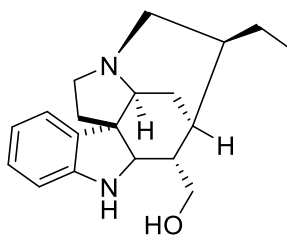
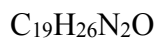
## 6 Výsledky

### 6.1 Struktura izolovaného alkaloidu

#### 6.1.1 GV-9C: Geissoschizolin

Látka byla identifikována jako indolový alkaloid geissoschizolin.

**Sumární vzorec:**



Obrázek 14: Geissoschizolin

**Molekulová hmotnost:**

Mr: 298,422

**MS analýza:**

MS (EI):  $m/z$  (%) = 298 (13), 281 (6), 240 (3), 221 (1), 199 (25), 180 (9), 168 (100), 156 (10), 144 (46), 130 (26), 115 (10), 94 (10), 77 (8), 70 (13), 55 (10).

**NMR analýza:**

Získaná spektra byla porovnána s literaturou [71].

**Optická otáčivost:**

$[\alpha]_D^{25} = 121,5^\circ$  (c = 0,12; MeOH)

## 6.2 Inhibiční účinek izolované látky vůči cholinesterasám

Tabulka 3: Inhibiční aktivita izolované látky (tučně) a standardů

Látka	% inhibice AChE (100 $\mu$ M)	AChE: IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	% inhibice BuChE (100 $\mu$ M)	BuChE: IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)
<b>Geissoschizolin</b>	<b>12,82 <math>\pm</math> 2,99</b>	<b>&gt; 100</b>	<b>40,40 <math>\pm</math> 1,42</b>	<b>&gt;100</b>
Berberin <sup>ST</sup>	-	0,71 $\pm$ 0,10	-	30,72 $\pm$ 3,49
Galanthamin <sup>ST</sup>	-	1,71 $\pm$ 0,07	-	42,30 $\pm$ 0,07
Huperzin A <sup>ST</sup>	-	0,03 $\pm$ 0,00	-	> 100

Standard = <sup>ST</sup>

## 6.3 Inhibiční účinek izolované látky vůči GSK3 $\beta$

Tabulka 4: Inhibiční aktivita izolované látky (tučně) a standardu

Látka	% inhibice GSK3 $\beta$ (50 $\mu$ M)	GSK3 $\beta$ : IC <sub>50</sub> (nM)
<b>Geissoschizolin</b>	<b>82,66 <math>\pm</math> 6,04</b>	<b>&gt;100</b>
SB-415286 <sup>ST</sup>	-	70

Standard = <sup>ST</sup>

## 7 Diskuze a závěr

Náplní této diplomové práce byla izolace alkaloidů z kůry *Geissospermum vellosii* a zkoumání jejich biologické aktivity se zaměřením na lidské cholinesterasy a GSK3- $\beta$ . Právě tyto enzymy představují potenciální cíle pro léčiva, která mohou ovlivňovat průběh Alzheimerovy choroby. Počty diagnostikovaných tímto onemocněním každoročně narůstají, zejména ve vyspělých zemích světa, kde se s vyšší životní úrovní prodlužuje předpokládaný věk dožití. Léčba demencí představuje obrovský problém pro ekonomiky těchto zemí, protože náklady na jejich léčbu jsou vysoké. Kromě přímých nákladů, kam lze zařadit vývoj nových léčiv, výrobu těch stávajících nebo výstavbu specializovaných center, se velkou částí podílí i náklady nepřímé. Pacienti se středně těžkým až těžkým průběhem demencí jsou odkázáni na neustálou pomoc pečovateli nebo rodinných příslušníků. Tato péče pak znemožňuje ekonomickou aktivitu těchto jedinců a často je pro ně psychicky velmi náročná, i proto, že se u části pacientů s progresivním průběhem onemocnění mohou objevit i další psychiatrické poruchy. Dlouhodobé vystavování stresu v kombinaci s náročnou péčí o nemocné může představovat další problém do budoucna i pro dosud zdravé jedince.

Alzheimerova choroba je nevléčitelné onemocnění. Dokážeme tedy pouze oddálit těžší stádia choroby. V současné době je paleta používaných léčiv omezena především na inhibitory cholinesteras, jelikož samotné podávání acetylcholinu není terapeuticky přínosné – je rychle rozkládán AChE a navíc není schopen prostoupit hematoencefalickou bariérou. Na léčbu AN jsou v ČR oficiálně používáni pouze tři zástupci – rivastigmin, donepezil a galanthamin. Rivastigmin vzniknul strukturální modifikací přírodně vyskytujícího se alkaloidu fyzostigminu, který je obsažen v puchýřnatci jedovatém (*Physostigma venenosum*). Dalším zástupcem současně používaných AChEi je galanthamin, který se přírodně vyskytuje v několika rostlinách čeledi *Amaryllidaceae*. Inhibiční vliv zmíněných alkaloidů na acetylcholinesterasu je již dlouhodobě znám. I z tohoto důvodu je nutné uvědomit si, že v přírodě lze s největší pravděpodobností nalézt další alkaloidy, které mohou prokázat zajímavou aktivitu vůči cholinesterasám. Právě proto je vhodné podrobit výzkumu i další, dosud méně prozkoumané rostliny a jejich obsahové látky. Pokud by se u nich prokázala solidní žádoucí aktivita, existuje šance, že získáme další nová léčiva, která by v budoucnu bylo možné použít při terapii.

O to více je vhodné podrobit výzkumu látky z rostlin, které jsou po velmi dlouhou dobu užívány v tradiční lidové medicíně. Jak již bylo zmíněno v úvodu, věřím v určitou lidskou intuici. Dokladem může být například používání *Huperzia serrata* v tradiční čínské medicíně. Tato rostlina obsahuje mimo jiné i alkaloid huperzin A, který je dnes v některých zemích využíván jako léčivo nebo doplněk stravy při terapii AN. Různě připravované extrakty z *Geissospermum vellosii* jsou na území Jižní Ameriky využívány stovky let, podle mého názoru to může naznačovat, že skutečně nějaký pozitivní vliv na lidské zdraví vykazují. I přesto, že se jedná spíše o méně známou rostlinu, byla už od dvacátého století podrobena řadě výzkumů. Ty se týkaly především působení obsažených látek právě na cholinesterasy a dále byly věnovány antimalarickému působení. S některými z nich jsem se v rámci této diplomové práce seznámil a jsem přesvědčen, že rostlina představuje perspektivní předmět zkoumání zejména z hlediska obsažených alkaloidů.

Právě alkaloidy obsažené v GV mají rozličnou a poměrně složitou strukturu. Ať už jako celkové extrakty nebo jednotlivé izolované látky prokázaly široké spektrum působení. Provedení dalších studií a výzkumů, týkajících se například působení obsažených látek proti některým tělním parazitům nebo jejich cytotoxické aktivity, by teoreticky mohlo přinést zajímavé strukturní předlohy pro nová léčiva.

Jako velmi nadějně se zdá být použití některých látek obsažených v GV jako přídatné terapie k současně používaným konvenčním chemoterapeutikům. Podle některých studií dochází k synergickému působení látek, což umožňuje snížit použitou dávku chemoterapeutika a zvýšit selektivitu takových látek k nádorovým buňkám. Tím se může snížit míra nežádoucích účinků, které jsou u cytostatik bohužel často přítomné. V rámci další fytochemické práce na rostlině s největší pravděpodobností proběhne snaha o izolaci flavopereirinu, který podle některých studií prokázal pozitivní aktivitu při ovlivňování nádorových buněk.

V rámci této diplomové práce byl získán alkaloidní extrakt, který byl na základě sloupcové chromatografie rozdělen na šestnáct frakcí. Pro další práci byla vybrána frakce GV-9. Na základě provedených tenkovrstvých chromatografií byl izolován indolový alkaloid geissoschizolin, jehož struktura byla určena pomocí MS, NMR a optické otáčivosti. Tato získaná data byla porovnána s dostupnou literaturou.

Získané množství alkaloidu umožnilo také testování jeho biologické aktivity vůči lidským cholinesterasám a vůči GSK-3 $\beta$ . Zjištěné hodnoty inhibice cholinesteras geissoschizolinem ACh = 12,82  $\pm$  2,99 %, BuChE = 40,40  $\pm$  1,42 % naznačují, že látka při ovlivňování cholinesteras nevykazuje žádoucí aktivitu a tudíž je pro tento účel nevýznamná.

Inhibice GSK-3 $\beta$  získaným alkaloidem se prokázala jako perspektivní. V budoucnu lze očekávat další výzkum týkající se využití obsahových látek GV v terapii kognitivních poruch spojených s AN.

Dále bude probíhat další izolace a studium obsažených látek. Vzhledem k častému využívání extraktů z rostliny při terapii malárie bude zkoumán vliv aktivních látek na inhibici prvoků rodu *Plasmodium*. Také v této oblasti se využití alkaloidů GV zdá potenciálně přínosné.

## 8 Abstrakt

Růžička, L.: Izolace alkaloidů druhu *Geissospermum vellosii* Allemão a studium jejich biologické aktivity. Diplomová práce, Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra farmakognozie, Hradec Králové, 2020.

V rámci této diplomové práce byly zkoumány alkaloidy z jihoamerického stromu *Geissospermum vellosii*, který je v dané oblasti tradičně používán na léčbu různých onemocnění včetně kognitivních deficitů spojených se stárnutím organismu<sup>1</sup>. Práce je založená na předchozím výzkumu, který se zabýval inhibicí lidských cholinesteras a glykogensyntasy-kinasy 3  $\beta$  (GSK-3  $\beta$ ), čehož je možné využít v terapii Alzheimerovy choroby. Právě výskyt tohoto onemocnění v posledních desítkách let narůstá a představuje velkou zátěž nejen pro zdravotnictví, ale i pro ekonomiku vyspělých zemí<sup>2</sup>.

Izolace vycházela ze surové nadrcené kůry. Postupně bylo za pomoci extrakce a vytřepávání získáno 50,4 g nažloutlého hustého etherového výtřepku, který vykazoval zajímavou aktivitu vůči AChE a BuChE ( $IC_{50} = 15,19 \pm 0,96 \mu\text{g/ml}$  pro AChE a  $IC_{50} = 0,37 \pm 0,049 \mu\text{g/ml}$  pro BuChE). Ten byl nadále za pomoci sloupcové chromatografie rozdělen na 16 frakcí.

Pro další práci byla z hlediska obsažených látek vybrána frakce GV9, která byla dále zpracována pomocí tenkovrstvé chromatografie. Byl získán bílý krystalický alkaloid, u kterého byla pomocí fyzikálně-chemických metod stanovena struktura.

Izolovaný alkaloid byl na základě MS a NMR spekter po porovnání s dostupnými daty v literatuře identifikován jako indolový alkaloid geissoschizolin.

Izolovaný alkaloid nevykazoval solidní inhibiční aktivitu vůči lidským cholinesterasám (inhibice AChE =  $12,82 \pm 2,99 \%$ , inhibice BuChE =  $40,40 \pm 1,42 \%$ ). Dále byla měřena jeho aktivita i na GSK-3  $\beta$ , která dosahovala lepších výsledků.

Práce byla podpořena z projektu SVV 260 550.

Klíčová slova:

*Geissospermum vellosii*, acetylcholinesterasa, butylcholinesterasa, kůra, biologická aktivita, alkaloidní extrakty, izolace alkaloidů, GC/MS analýza

Reference:

- 1) Lima, J. A. et al. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of a *Geissospermum vellosii* stem bark fraction. *An. Acad. Bras. Ciênc.* [online]. 2016, sv. 88, 1, str. 237-248. ISSN 0001-3765.
- 2) Kumar, V. et al.: *Robbins basic pathology*. 8. vydání. Philadelphia: Saunders/Elsevier. 2007. 960 s. ISBN 978-1-4160-2973-1.

## 9 Abstract

Růžička, L. Isolation of alkaloids from *Geissospermum vellosii* Allemão and study of their biological activity. Diploma thesis, Department of pharmacognosy, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Charles University, Czech Republic, 2020.

The aim of this diploma thesis are alkaloids from *Geissospermum vellosii*. This tree native in South America is commonly used for treatment of various diseases, including cognitive deficits in elder people<sup>1</sup>. The study is based on previous research that was focused on inhibition of human cholinesterases and glycogen synthase 3  $\beta$  (GSK-3  $\beta$ ), which can be used in treatment of Alzheimer disease. Incidence of this disease is rising up in the last decades and it represents a big burden for both health service and economy of developed countries<sup>2</sup>.

Isolation was carried out from crude crushed stem bark. After extraction and agitation, 50.4 g of thick yellowish ether extract was obtained. This extract showed activity against cholinesterases ( $IC_{50} AChE = 15.19 \pm 0.96 \mu\text{g/ml}$  and  $IC_{50} BuChE = 0.37 \pm 0.049 \mu\text{g/ml}$ ). Later, this extract was separated to 16 fractions by column chromatography.

Fraction GV9 was chosen for additional research. Thin layer chromatography was carried out for purification and extraction of white crystalline alkaloid. Structure was determined by physical-chemical methods.

Obtained alkaloid was later identified as indole alkaloid geissoschizoline, based on the MS and NMR spectres available in literature.

Isolated geissoschizoline did not show significant inhibition activity against human cholinesterases (inhibition of AChE =  $12.82 \pm 2.99 \%$  and inhibition of BuChE =  $40.40 \pm 1.42 \%$ ). Its activity against GSK-3  $\beta$  was measured and showed better results.

*This work was supported financially by project SVV 260 550.*

Key words:

*Geissospermum vellosii*, acetylcholinesterase, butylcholinesterase, bark, biological activity, alkaloidal extracts, isolation of alkaloids, GC/MS analysis

References:

- 1) Lima, J. A. et al. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of a *Geissospermum vellosii* stem bark fraction. *An. Acad. Bras. Ciênc.* [online]. 2016, vol. 88, n.1, pp. 237-248. ISSN 0001-3765.
- 2) Kumar, V. et al.: Robbins basic pathology. 8th edition. Philadelphia: Saunders/Elsevier. 2007. 960 p. ISBN 978-1-4160-2973-1.

## 10 Literatura

1. Nevšimalová, S. et al. *Neurologie*. Prague : Galén, 2002. 80-7262-160-2.
2. Kumar, V. et al. *Robbin's basic pathology*. Philadelphia : Saunders/Elsevier, 2007. 978-1-4160-2973-1.
3. Mölsa, P.K., Martilla, R.J, Rinne, U.K. Survival and cause of death in Alzheimer's disease and multi-infarct dementia. *Acta Neurologica Scandinavica*. 1. 8 1986, Sv. 74, 2, stránky 103-107, 159-164.
4. Ulloa, C. et al. An integrated assessment of the vascular plant species of the Americas. *Science*. 2017, Sv. 358, 6370, stránky 1614-1617.
5. World Checklist of Selected Plant Families. [Online] 2019. [Citace: 25. 1 2020.] [https://wcsp.science.kew.org/synonymy.do?name\\_id=88949](https://wcsp.science.kew.org/synonymy.do?name_id=88949).
6. Lorenzi, H. *Brazilian Trees*. Nova Odessa : Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2002. 85-86714-15-1.
7. *Geissospermum laeve* (Vell.) Miers | Plants of the World Online. [Online] 2018. [Citace: 26. 01 2020.] <http://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:79123-1#distribution-map>.
8. Miers, J. *On the Apocynaceae of South America*. London : Williams and Norgate, 1878. stránky 84-86. 978-3337315160.
9. Opletal, L. Daidalea. [Online] Farmaceutická fakulta UK v Hradci Králové. [Citace: 01. 02 2020.] <https://apps.faf.cuni.cz/daidalea/PlantFamily.asp?id=6>.
10. *Geissospermum vellosii* (Pao Pereira) Tree – Tropilab. [Online] 2018. [Citace: 28. 1 2020.] <https://tropilab.com/bergibita.html>.
11. DeFilipps, R. *Medicinal Plants of the Guianas (Guyana, Surinam, French Guiana)*. 2004.
12. Beljanski, M. Traditional Use of Pao Pereira. [Online] [Citace: 10. 2 2020.] <https://www.beljanski.org/engl/press/traditional-use-of-pao-pereira/>.
13. Lamertin, H. *Journal de médecine, de chirurgie et de pharmacologie*. Bruxelles : Librairie medicale de H. Lamertin, 1887. str. 246. Sv. 84. 978-0331237832.
14. Reis, Siri von. *Drugs and Foods from Little-Known Plants*. Harvard : Harvard University Press, 1973. str. 225. 9780674729209.
15. El Sayed, M.T. et al. Indoles as anticancer agents. *Advances in Modern Oncology Research*. 1, 6. 10 2015, Sv. 1, 20-35.
16. Silva E Silva, J.V. et al. Flavopereirine—An Alkaloid Derived from *Geissospermum vellosii*—Presents Leishmanicidal Activity In Vitro. *Molecules*. 2019, Sv. 24, 4.
17. Jhy-Ming, Li et al. Flavopereirine Suppresses the Growth of Colorectal Cancer Cells through P53 Signaling Dependence. *Cancers (Basel)*. 2019, Sv. 11, 7.

18. Dewick, P. *Medicinal Natural Products*. West Sussex : John Wiley & Sons Ltd., 2002. 0471496405.
19. Rapoport, H. et al. Alkaloids of *Geissospermum vellosii*. Isolation and Structure Determinations of Vellosimine, Vellosiminol, and Geissolosimine. *Journal of the American Chemical Society*. 1. 9 1962, Sv. 27, 9.
20. Vieira Aquino, P.G. et al. Aspidosperma Terpenoid Alkaloids — Biosynthetic Origin, Chemical Synthesis and Importance. [Online] 30. 9 2015. [Citace: 1. 3 2020.] <https://www.intechopen.com/books/phytochemicals-isolation-characterisation-and-role-in-human-health/aspidosperma-terpenoid-alkaloids-biosynthetic-origin-chemical-synthesis-and-importance>.
21. Rapoport, H. Alkaloids of *Geissospermum vellosii*. Further Studies on Geissospermine and the Structures of the Indolic Cleavage Products, Geissoschizine and Apogeissoschizine. *Journal of the American Chemical Society*. 1. 8 1960, Sv. 82, 16.
22. Manske, R.H.F. *The Alkaloids: Chemistry and Physiology*. Ontario : Academic Press, 1965. stránky 679-691. Sv. 8. 978-0124695085.
23. Rapoport, H. Geissovelline, a New Alkaloid from *Geissospermum vellosii*. *Journal of the American Chemical Society*. 1973, Sv. 38, 2.
24. *Phytochemical Studies on Geissospermum Sericeum*. Ramos, A.d.S. et al. Florianopolis : autor neznámý, 2012.
25. Werner, J.A., et al. Evidence for a role of 5-HT(1A) receptor on antinociceptive action from *Geissospermum vellosii*. *Journal of Ethnopharmacology*. 2009, Sv. 125, 1.
26. Ishiyama, H., et al. Two New Indole Alkaloids from *Aspidosperma Subincanum* and *Geissospermum vellosii*. *ChemInform*. 2006, Sv. 37, 23.
27. Paccioni, J. et al. Alkaloids of *Geissospermum argenteum* (Apocynaceae). *Phytochemistry*. 1978, Sv. 17, 12.
28. Gordillo-Román, B. et al. Absolute configuration of indoline alkaloids from *Geissospermum reticulatum*. *Tetrahedron*. 2013, Sv. 54, 13.
29. WHO. Dementia. [Online] WHO, 19. 9 2019. [Citace: 2. 4 2020.] <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/dementia>.
30. Raboch, J. et al. *Psychiatrie*. Prague : Galén, 2001. stránky 149-150. 80-7262-140-8.
31. Preidt, Robert. The High Costs of Alzheimer's. [Online] 28. 3 2018. [Citace: 25. 4 2020.] <https://www.webmd.com/alzheimers/news/20180320/the-high-costs-of-alzheimers#1>.
32. Wilson, R.S. et al. Heritability of Different Forms of Memory in the Late Onset Alzheimer's Disease Family Study. *Journal of Alzheimer's Disease*. 26. 2 2011, Sv. 23, 2.
33. Mahley, R.W. et al. Apolipoprotein E4: A causative factor and therapeutic target in neuropathology, including Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 27. 3 2007, Sv. 103, 15.



34. Goetz, C.G. *Textbook of clinical neurology*. Philadelphia : Saunders Elsevier, 2007. 1416036180.
35. Birks, J.S. Cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. [Online] Cochrane, 25. 1 2006. [Citace: 20. 4 2020.] <https://www.cochranelibrary.com/cdsr/doi/10.1002/14651858.CD005593/full>.
36. Alldredge, B.K. et al. *Applied therapeutics : the clinical use of drugs*. Baltimore : Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, 2013. str. 2385. 978-1-60913-713-7.
37. Sheardová, K. et al. Doporučené postupy pro terapii Alzheimerovy nemoci a ostatních demencí. *Neurologie pro praxi*. 10. 1 2009, stránky 1-2.
38. Li, J. et al. Huperzine A for Alzheimer's disease. [Online] Cochrane, 23. 4 2008. [Citace: 20. 4 2020.] <https://www.cochranelibrary.com/cdsr/doi/10.1002/14651858.CD005592.pub2/full>.
39. Zhong, M.Q. et al. Huperzine A: Is it an Effective Disease-Modifying Drug for Alzheimer's Disease? *Frontiers in Aging Neuroscience*. 2014, Sv. 6, 216.
40. Jiráček, R. Doporučené postupy psychiatrické péče. [Online] Psychiatrická společnost ČLS JEP, 2018. [Citace: 25. 4 2020.] <https://postupy-pece.psychiatrie.cz/alzheimerova-choroba-3>.
41. Malárie. *Wikiskripta*. [Online] [Citace: 12. 5 2020.] <https://www.wikiskripta.eu/w/Mal%C3%A1rie>.
42. WHO. *World Malaria Report 2019*. Geneva : WHO, 2019. 978-92-4-156572-1.
43. Murray, C.J. et al. Global malaria mortality between 1980 and 2010: a systematic analysis. *The Lancet*. 4. 2 2012, Sv. 379, 9814, stránky 413-431.
44. Stejskal, F. et al. Diagnostika, léčba a profylaxe malárie v ČR. *Klin. mikrobiol. inf. lék.* 2018, Sv. 24, 1.
45. EURARTESIM 320mg/40mg. *Státní ústav pro kontrolu léčiv*. [Online] [Citace: 14. 5 2020.] <http://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?code=0168726&tab=info>.
46. Hande, K.R. Etoposide: four decades of development of a topoisomerase II inhibitor. *European Journal of Cancer*. 1998, Sv. 34, 10.
47. Samuelsson, G. *Drugs of Natural Origin: a Textbook of Pharmacognosy*. Stockholm : Swedish Pharmaceutical Press, 2004. 978-91-974318-4-2.
48. Richter, I. et al. Taxany v léčbě karcinomu prsu. *Remedia*. [Online] [Citace: 15. 5 2020.] <http://www.remédia.cz/Clanky/Prehledy-nazory-diskuse/Taxany-v-lecbe-karcinomu-prsu/6-F-1vA.magarticle.aspx>.
49. Wang, B.S. et al. Efficacy and Safety of Natural Acetylcholinesterase Inhibitor Huperzine a in the Treatment of Alzheimer's Disease- An Updated Meta-Analysis. *Journal of Neural Transmission*. 17. 2 2009, Sv. 116, 4, str. 1.
50. Physostigmine - DrugBank. [Online] 2005. [Citace: 2. 3 2020.] <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00981>.

51. Fadaeinasab, M. et al. New Indole Alkaloids from the Bark of *Rauvolfia Reflexa* and their Cholinesterase Inhibitory Activity. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 1. 10 2015, Sv. 37, 5, stránky 1-3.
52. Lima, J.A. et al. *Geissospermum vellosii* stem bark: Anticholinesterase activity and improvement of scopolamine-induced memory deficits. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 5 2009, Sv. 92, 3, stránky 508-513.
53. Passive Avoidance Task | Behavioral and Functional Neuroscience Laboratory. [Online] Stanford Medicine, 2020. [Citace: 14. 3 2020.] <https://med.stanford.edu/sbfnl/services/bm/lm/bml-passive.html>.
54. Tacrine | PubChem. [Online] National Center for Biotechnology Information, 2020. [Citace: 14. 03 2020.] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Tacrine>.
55. Vigny, M. et al. Active- Site Catalytic Efficiency of Acetylcholinesterase Molecular Forms in Electrophorus, Torpedo, Rat and Chicken. *European Journal of Biochemistry*. 28. 6 1978, Sv. 85, 2.
56. Lima, J.A. et al. Docking of the alkaloid geissospermine into acetylcholinesterase: a natural scaffold targeting the treatment of Alzheimer's disease. *Journal of Molecular Modeling*. 2011, Sv. 17, 6.
57. Milliken, W. Traditional Anti-Malarial Medicine in Roraima, Brazil. *Economic Botany*. 6 1997, Sv. 51, 3, str. 231.
58. Muñoz, V. et al. A search for natural bioactive compounds in Bolivia. *Journal of Ethnopharmacology*. 17. 8 2001, Sv. 77, 1, stránky 1-3.
59. Mbeunkui, F. et al. In vitro antiplasmodial activity of indole alkaloids from the stem bark of *Geissospermum vellosii*. *Journal of Ethnopharmacology*. 31. 1 2012, Sv. 139, 2, stránky 471-477.
60. Steele, J.C.P. et al. Indole and  $\beta$ -Carboline Alkaloids from *Geissospermum sericeum*. *Journal of Natural Products*. 3. 1 2002, Sv. 65, 1, stránky 1-4.
61. Bertani, S. et al. Evaluation of French Guiana traditional antimalarial remedies. *Journal of Ethnopharmacology*. 8. 4 2005, Sv. 98, 1-2.
62. Andrade-Neto, V. F. de et al. In vitro inhibition of *Plasmodium falciparum* by substances isolated from Amazonian antimalarial plants. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 1. 7 2007, Sv. 102, 3.
63. Beljanski, M. et al. Selective Inhibition of in vitro Synthesis of Cancer DNA by Alkaloids of  $\beta$ -Carboline Class. *Pathology*. 1982, Sv. 50, 2.
64. Beljanski, M. THE ANTICANCER AGENT PB-100, SELECTIVELY ACTIVE ON MALIGNANT CELLS, INHIBITS MULTIPLICATION OF SIXTEEN MALIGNANT CELL LINES, EVEN MULTIDRUG RESISTANT. *Genetics and Molecular Biology*. 2000, Sv. 23, 1.
65. Abgrall, J.M. *Healing Or Stealing? Medical Charlatans in the New Age*. New York : Algora Publishing, 2000. 978-1892941510.

66. Hsuan-Te, Y. et al. Flavopereirine induces cell cycle arrest and apoptosis via the AKT/p38 MAPK/ERK1/2 signaling pathway in human breast cancer cells. *European Journal of Pharmacology*. 2019, Sv. 863, 1.
67. Zhengui, X. et al. Opposing Effects of ERK and JNK-p38 MAP Kinases on Apoptosis. *Science*. 1995, Sv. 270, 5240.
68. Olson, J.M. et al. p38 MAP kinase: a convergence point in cancer therapy. *Trends in Molecular Medicine*. 2005, Sv. 10, 3.
69. Vogelstein, B. et al. Surfing the p53 network. *Nature*. 2000, Sv. 408, 6810.
70. Jun, Y. et al. The plant extract of Pao pereira potentiates carboplatin effects. *Pharmaceutical Biology*. 2013, Sv. 52, 1.
71. Kokkonda, P. et al. Biomimetic Total Syntheses of (-)-Leucoridines A and C through the Dimerization of (-)-Dihydrovalparicine. *Angewandte Chemie International Edition*. 2015, Sv. 46, 48.