

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA FARMACEUTICKEJ BOTANIKY

DIPLOMOVÁ PRÁCA

Alkaloidy *Vinca minor* L. a ich biologická aktivita II.

Vedúci diplomovej práce: PharmDr. Jakub Chlebek, Ph.D.

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

Hradec Králové, 2021

Simona Pavuková

CHARLES UNIVERSITY
FACULTY OF PHARMACY IN HRADEC KRALOVE
DEPARTMENT OF PHARMACEUTICAL BOTANY

DIPLOMA THESIS

Vinca minor L. alkaloids and their biological activity II.

Supervisor: PharmDr. Jakub Chlebek, Ph.D.

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

Hradec Králové, 2021

Simona Pavuková

Týmto by som sa chcela poďakovať svojmu školiteľovi PharmDr. Jakubovi Chlebkovi Ph.D. za odborné vedenie mojej diplomovej práce, trpezlivosť a vytvorenie príjemnej, priateľskej, pracovnej atmosféry. Ďalej by som sa rada poďakovala celému tímu katedry farmaceutickej botaniky a kolegom z laboratória za ich záujem a pomoc. Veľké ďakujem taktiež patrí doc. PharmDr. Jiřímu Kunešovi, Ph.D., prof. RNDr. Lubomírovi Opletalovi, CSc. a Mgr. Janě Maříkovej za zmeranie a interpretáciu NMR spektier a biologickej aktivity.

Prehlasujem, že táto práca je mojím pôvodným autorským dielom. Celá literatúra a ďalšie zdroje, z ktorých som pri spracovaní práce čerpala sú uvedené v zozname použitej literatúry a v práci sú riadne citované. Práca nebola použitá k získaniu iného alebo rovnakého titulu.

V Hradci Králové, 2021

Simona Pavuková

OBSAH

1. ÚVOD.....	12
2. CIEĽ PRÁCE.....	14
3. Teoretická časť.....	15
3.1. Demencie.....	15
3.1.1. Alzheimerova demencia.....	16
3.1.1.1. Epidemiológia.....	16
3.1.1.2. Rizikové faktory.....	16
3.1.1.3. Patofyziológia.....	17
3.1.1.3.1. Senilné plaky.....	17
3.1.1.3.2. Neurofibrilárne kľbká.....	18
3.1.1.3.3. Apoliproteín E.....	19
3.1.1.3.4. Oxidačný stres a mitochondriálna dysfunkcia.....	19
3.1.1.3.5. Rastové faktory.....	20
3.1.1.3.6. Zápalové mechanizmy.....	20
3.1.1.4. Diagnostika.....	21
3.1.1.5. Klinický obraz.....	22
3.1.1.6. Terapia.....	23
3.1.1.6.1. Acetylcholín.....	23
3.1.1.6.2. Cholinesterázy.....	24
3.1.1.6.3. Inhibítory cholinesteráz.....	25
3.1.1.6.4. Inhibítory NMDA receptorov.....	27
3.1.1.6.5. Rastliny tradičnej čínskej medicíny a ich pozitívny vplyv v terapii AD.....	28
3.1.1.6.6. Potencionálne prístupy v terapii AD.....	31
3.2. <i>Vinca minor</i> L. (Apocyanaceae).....	35
3.2.1. Všeobecná charakteristika.....	35
3.2.2. Botanická charakteristika.....	36
3.2.3. Použitie v ľudovom liečiteľstve.....	36
3.2.4. Obsahové látky <i>Vinca minor</i> L.....	37
3.2.4.1. Alkaloidy rodu <i>Vinca</i> L.....	37
3.2.4.2. Obsahové látky <i>Vinca minor</i> L. a ich biologická aktivita.....	44
4. Experimentálna časť.....	48
4.1. Materiál.....	48
4.1.1. Rozpúšťadlá a chemikálie.....	48

4.1.2.	Pomocné materiály a roztoky	49
4.1.3.	Tlmivé roztoky	49
4.1.4.	Detekčné činidlá	49
4.1.5.	Chromatografické adsorbenty	50
4.1.6.	Prístrojové vybavenie	50
4.2.	Metódy	50
4.2.1.	Všeobecné postupy	50
4.2.1.1.	Príprava a čistenie rozpúšťadiel	50
4.2.1.2.	Odparovanie rozpúšťadiel	50
4.2.1.3.	Sušenie a uchovávanie frakcií a izolovaných čistých látok	51
4.2.2.	Chromatografia	51
4.2.2.1.	Detekcia alkaloidov	51
4.2.2.2.	Príprava sklenených dosiek pre preparatívnu TLC	51
4.2.2.3.	Stĺpcová chromatografia	51
4.2.2.4.	Tenkovrstevná chromatografia	51
4.2.3.	Štruktúrna analýza	52
4.2.3.1.	HRMS analýza	52
4.2.3.2.	ESI/MS analýza	52
4.2.3.3.	NMR analýza	52
4.2.3.4.	Optická otáčavosť	52
4.3.	Izolácia alkaloidov	53
4.3.1.	Rastlinný materiál	53
4.3.2.	Príprava sumárneho extraktu a stĺpcová chromatografia chromoformového výtrepku CHCl ₃ -A	53
4.3.3.	Chromatografická separácia spojených frakcií VM 323 – 337	53
4.3.4.	Izolácia jednotlivých alkaloidov	55
4.3.4.1.	Spracovanie podfrakcie č. 81 – 93	56
4.3.4.2.	Spracovanie podfrakcie č. 57 – 80	56
4.4.	Stanovenie cholinesterázovej inhibičnej aktivity Ellmanovou metódou	57
4.4.1.	Príprava erytrocytarnej AChE a BuChE z plazmy	57
4.4.2.	Stanovenie cholinesterázovej inhibičnej aktivity	58
4.5.	Stanovenie inhibičnej aktivity alkaloidov voči POP	58
4.6.	Stanovenie inhibičnej aktivity alkaloidov voči GSK-3 β	59
5.	Výsledky	60
5.1.	Štruktúrna analýza	60

5.1.1.	SP-1 (zlúčenina 81 – 93/3) - nová zlúčenina.....	60
5.1.1.1.	NMR analýza	60
5.1.1.2.	ESI/MS analýza	60
5.1.1.3.	HRMS analýza	60
5.1.1.4.	Optická otáčavosť	61
5.1.2.	SP-2 (–)-pikrinin (zlúčenina 81 – 93/4)	61
5.1.2.1.	NMR analýza	61
5.1.2.2.	ESI/MS analýza	61
5.1.2.3.	Optická otáčavosť	61
5.1.3.	SP-3 deacetylakuammilin (zlúčenina 57 – 80/3).....	61
5.1.3.1.	NMR analýza	62
5.1.3.2.	ESI/MS analýza	62
5.1.3.3.	Optická otáčavosť	62
5.2.	Inhibičná aktivita izolovaných alkaloidov voči AChE, BChE, POP a GSK-3β.....	63
6.	DISKUSIA.....	64
7.	Zoznam použitej literatúry	66
8.	ABSTRAKT	79
9.	ABSTRACT.....	80

PREHĽAD OBRÁZKOV

Obr. 1 Štruktúra donepezilu	26
Obr. 2 Štruktúra (<i>S</i>)-rivastigmínu.....	26
Obr. 3 Štruktúra galantamínu	27
Obr. 4 Štruktúra memantínu.....	28
Obr. 5 Štruktúra huperzínu A	29
Obr. 6 Štruktúra gastrodínu.....	30
Obr. 7 Štruktúra kurkumínu	30
Obr. 8 Štruktúra berberínu	31
Obr. 9 Rastlina <i>Vinca minor</i> L.	36
Obr. 10 Štruktúra reserpinínu.....	39
Obr. 11 Štruktúra vinorínu	40
Obr. 12 Štruktúra (-)-pikrinínu	41
Obr. 13 Štruktúra (-)-minovínu	42
Obr. 14 Štruktúra (+)-vinkatínu	44
Obr. 15 Štruktúra vinkamínu.....	46
Obr. 16 Štruktúra vinpocetínu.....	47
Obr. 17 Kontrolná TLC spojených podfrakcií zo sumárnej alkaloidnej frakcie VM 323 – 327	54
Obr. 18 Kontrolná TLC súhrného delenia podfrakcií frakcie 48 – 93 z kolóny	55
Obr. 19 Kontrolná TLC podfrakcií frakcie 57 – 80	57
Obr. 20 Štruktúra alkaloidu SP-1	60
Obr. 21 Štruktúra (-)-pikrinínu	61
Obr. 22 Štruktúra deacetylakuammilínu	62

PREHLAD TABULIEK

Tab. 1 Taxonomické zaradenie <i>Vinca minor</i> L.	35
Tab. 2 Príklady sarpaginových alkaloidov u niektorých druhov rodu <i>Vinca</i>	38
Tab. 3 Príklady ajmalinových alkaloidov u niektorých druhov rodu <i>Vinca</i>	39
Tab. 4 Príklady akuamminových alkaloidov u niektorých druhov rodu <i>Vinca</i>	41
Tab. 5 Príklady eburnaminových alkaloidov u niektorých druhov rodu <i>Vinca</i>	41
Tab. 6 Príklady oxindolových alkaloidov u niektorých druhov rodu <i>Vinca</i>	43
Tab. 7 Obsahové látky <i>Vinca minor</i> L. a ich biologická aktivita.....	44
Tab. 8 Stĺpcová chromatografia spojených frakcií VM 323 – 327 ¹	54
Tab. 9 Výsledky stĺpcovej chromatografie spojenej frakcie 48 – 81	55
Tab. 10 Výsledky merania inhibičných aktivít	63

ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK

A β	β -amyloid
Acetyl-CoA	acetylkoenzým A
AD	Alzheimerova demencia
ACh	acetylcholín
AChE	acetylcholínesteráza
ApoE	apoliproteín E
APP	amyloidný prekurzorový proteín
ATP	adenozíntrifosfát
BDNF	mozgový neurotrofický faktor
BPSD	behaviorálne a psychologické príznaky demencie
BuChE	butyrylcholínesteráza
CFTs	karboxylové terminálne fragmenty
CNS	centrálne nervová sústava
DPP- IV	dipeptidylpeptidáza IV
GSK3 β	glykogénsyntáza kináza-3 β
HupA	huperzín A
ChAT	cholínacetyltransferáza
ChE	cholínesteráza
IACHe	inhibitory acetylcholínesterázy
IL	interleukín
IP3	inositol-1,4,5 trifosfát
mat NGF	zrelý nervový rastový faktor
NFT	neurofibrilárne kľbká
NGF	nervový rastový faktor

NMDA	<i>N</i> -metyl- <i>D</i> -aspartát
PAS	periférne anionické miesto
PDE	fosfodiesteráza
p75NTR	pan neurotrofický receptor p75
POP	prolyloligopeptidáza
ROS	reaktívne formy kyslíka
sAPP α	extracelulárny proteín vznikajúci po štiepení APP α -sekretázou
sAPP β	extracelulárny proteín vznikajúci po štiepení APP β -sekretázou
Trk	tyrozinkinázový receptor
VACHT	vezikulárny acetylcholínový transportér

1. ÚVOD

Rastliny bývajú vystavené mnohým stresovým faktorom z vonkajšieho prostredia. Okrem nevhodných vplyvov z okolia, existuje aj neustála hrozba zo strany predátorov a patogénov. Aby sa mohli vysporiadať s rozmanitosťou týchto nepriaznivých podmienok, museli prejsť evolučnou adaptáciou. A to vypracovaním sofistikovaných stratégií obrany a syntézou širokej škály prírodných bioaktívnych zlúčenín.[1] Zaujímavú skupinu látok predstavujú zlúčeniny inhibujúce cholinesterázy (ChE), spomaľujúce inaktiváciu acetylcholínu (ACh) po synaptickom uvoľnení. Potenciálnym zdrojom inhibítorov cholinesteráz (IChE) sú sekundárne metabolity rastlín, kde najväčšiu časť týchto prírodných metabolitov s potenciálnou inhibičnou aktivitou tvoria alkaloidy. Ďalej sem môžeme zaradiť terpeny a látky odvodené od šikimovej kyseliny.[2] V centrálnom nervovom systéme (CNS) sa nachádzajú dva typy enzýmov ChE, a to acetylcholinesteráza (AChE) a butyrylcholinesteráza (BuChE).[3] Ukázalo sa, že niektoré rastlinné druhy, ktoré vykazujú inhibičnú aktivitu voči spomínaným enzýmom sú relevantnou možnosťou v terapii rôznych neurodegeneratívnych porúch, a to najmä Alzheimerovej demencie (AD).[4]

V posledných rokoch sme svedkami rozsiahlych výskumov zameraných na hľadanie nových molekúl s inhibičnou aktivitou voči spomínaným ChE. Skutočnosť, že sa prírodne vyskytujúce zlúčeniny z rastlín považujú za potenciálny zdroj nových inhibítorov, viedla k objaveniu významného počtu sekundárnych metabolitov a rastlinných extraktov vykazujúcich inhibičnú aktivitu voči daným enzýmom. [5] Žiaľ u mnohých rastlín a zlúčenín, ktoré preukázali danú aktivitu, relevantnú v terapii alzheimerovej demencie, sú klinické údaje veľmi obmedzené. Klinická účinnosť a potenciálna toxicita niektorých rastlín preto vyžaduje podrobnejšie skúmanie.[4]

Historicky prvou látkou prírodného pôvodu, u ktorej boli potvrdené acetylcholinesterázové inhibičné účinky, bol indolový alkaloid fyzostigmín, izolovaný zo semien *Physostigma venosum* Balf. K ďalším zaujímavým IChE patrí terapeuticky využívaný galantamín, ktorý sa vo veľkej miere vyskytuje v čeľadi Amaryllidaceae a terapeuticky perspektívny lykopodiový alkaloid huperzín A, izolovaný z čínskeho plavúňa *Huperzia serrata* (Thunb. ex Murray) Trevis.[4] Zaujímavú cholinesterázovú inhibičnú aktivitu vykazujú aj alkaloidné extrakty rastlín z čeľade Apocynaceae.[6]

Rastlina *Vinca minor* L.a je jedným z voľne rastúcich zástupcov u nás. Táto čeľaď zahŕňa viac ako 2000 rastlinných druhov vyskytujúcich sa prevažne v tropických a subtropických oblastiach. V tradičnej medicíne našli svoje uplatnenie v terapii horúčky,

malárie, cukrovky, bolesti a gastrointestinálnych ochorení. Mnohé z nich sú bohatým zdrojom významných sekundárnych metabolitov, iné poskytujú tvrdé drevo alebo sa pestujú len ako okrasné rastliny. Typickými obsahovými látkami vyskytujúcimi sa skrz celou čeľad'ou sú indolové alkaloidy, kardioaktívne glykozidy, sekoiridoidné a iridoidné monoterpény a taktiež kaučuky, ktoré sú rozptýlené v latexe.[7,8]

Druh *V. minor* zahŕňa vyše 50 alkaloidov indolového typu. Vinkamin je najdôležitejším alkaloidom vykazujúcim výrazný cerebrovaskulárny a neuroprotektívny účinok.[9] V súčasnosti nachádza uplatnenie jeho semisyntetický derivát vinpocetin, ktorý sa vyznačuje širokou škálou farmakologických a biochemických účinkov, vrátane stimulácie vazodilatácie mozgu, zvýšenia tolerancie mozgového tkaniva voči hypoxickým a ischemickým útokom, či dokonca inhibičným účinkom na fosfodiesterázu (PAD).[5]

Izoláciu indolových alkaloidov z *V. minor* L. sa zaoberá výzkumná skupina ADINACO na katedre farmaceutickej botaniky v Hradci Králové.[10] Cieľom tejto diplomovej práce je pokúsiť sa o izoláciu biologicky aktívnych alkaloidov namierených voči vybraným terapeutickým cieľom AD.

2. CIEĽ PRÁCE

Cieľ diplomovej práce:

- izolácia aspoň jedného alkaloidu v čistej forme za použitia chromatografických metód z vybranej frakcie získanej na chromatografickom stĺpci zo sumárneho alkaloidného extraktu z vňate *V. minor*,
- podiel na identifikácii obsahových látok spektrálnymi metódami MS/NMR a zmeranie optickej otáčavosti,
- podiel na stanovenie biologickej aktivity izolovaných látok na ľudskú acetylcholinesterázu, butyrylcholinesterázu, prolyloligopeptidázu a glykogensyntázu-kinázu 3 β .

3. Teoretická časť

3.1. Demencie

Pôvod slova demencia pochádza z latinského *de-* (od, z) a *mens-* (mysel') a doslovne ho môžeme preložiť ako nemysliaci, nerozumný či šialený.[11] Toto slovo sa objavilo v našej histórii dávno pred tým, než bolo pomenované. Jeho význam je možné vystopovať u antických lekárov či filozofov, ktorí úpadok duševných funkcií pripisovali vysokému veku. Demenciu ako lekárske termín zaviedol až Francúz Philip Pinel v roku 1797 a nazval ním rôzne choroby, ktoré vedú k poklesu intelektových schopností. Rozlíšiť syndróm demencie od iných porúch bolo aj v priebehu 19. storočia pomerne nejasné. Za prelom v dejinách pojmu demencie považujeme 90. roky minulého storočia, kedy sa začalo hovoriť o AD, ktorú prvýkrát popísal nemecký psychiater a neuropatológ Alois Alzheimer.[12–14] Demencia je podľa medzinárodnej klasifikácie chorôb charakterizovaná ako „syndróm spôsobený chorobou mozgu, zvyčajne chronickej alebo progresívnej povahy, kedy dochádza k porušeniu mnohých vyšších nervových kortikálnych funkcií, ku ktorým patrí pamäť, myslenie, orientácia, chápanie, počítanie, schopnosť učiť sa, jazyk a úsudok. Zvyčajne je pridružené porušené chápanie a príležitostne mu predchádza i zhoršenie emočnej kontroly, sociálneho správania alebo motivácie.“ [15]

Demencie zaradzujeme medzi tzv. organické mozgové ochorenia. Etiologicky sa uplatňujú hlavne choroby, ktoré poškodzujú mozgové tkanivo. U atroficko-degeneratívnych demencií je hlavným etiopatogenetickým činiteľom atrofia mozgu, ktorá je sprevádzaná tvorbou a ukladaním patologických proteínov. Preto ich niekedy možno označiť aj ako proteinopatie. Svoju úlohu nezohrávajú len samotné proteíny, ale uplatňujú sa aj iné mechanizmy, ktoré vysokou mierou vplyvajú na priebeh daného ochorenia. Sekundárne symptomatické demencie vznikajú na podklade vaskulárnych, metabolických a traumatických zmien na mozgu.[16–18].

V literatúre sa častokrát stretávame s termínom tzv. starecká demencia, ktorá nadobúda význam len ak ňou označujeme demenciu, ktorá nastala vo vyššom veku tzv. seni (65+) alebo ak ju chceme odlíšiť od presenilnej demencie, ktorá nastala v presenii, teda vo veku mladšom. Spájať ju s prirodzeným starnutím je častokrát mylné a zavádzajúce, pretože demencia vzniká vždy na podklade chorobného procesu a starnutie rozhodne nepovažujeme za jej synonymum.[18]

3.1.1. Alzheimerova demencia

AD je závažné postupne progredujúce a irreverzibilné neurodegeneratívne ochorenie, ktoré sa prejavuje syndrómom demencie a končí letálne. Zaradujeme ju medzi najčastejšie príčiny demencie vôbec a celosvetovo sa odhaduje, že predstavuje 50 – 60 % všetkých prípadov demencie.[19,20]

3.1.1.1. Epidemiológia

V súvislosti so starnutím populácie narastá počet pacientov trpiacich závažnými poruchami pamäte až demenciou. Zhodnotiť zdravotný stav vo vyššom veku je pomerne náročné skrz fakt, že niektoré menej nápadne ochorenia, kam radíme psychiatrické poruchy ako sú demencie či depresie, sú častokrát nedostatočne diagnostikované alebo dokonca neliečené.[21] Podľa Alzheimer's Disease International je v najvyspelejších krajinách v rukách lekárov takmer polovica pacientov, naopak v tých menej rozvinutých či štátoch so strednými príjmami menej než 10 %.[22]

Demencie v útlom detskom a strednom veku sú pomerne vzácne a ojedinelé. Zlom nastáva až v dôchodkovom veku, kedy sa s každým pribúdajúcim rokom zvyšuje jej výskyt. Vo vekovej kategórii nad 60 rokov trpí demenciou každý 5 – 8. človek a celosvetovo sa odhaduje, že postihuje takmer 50 miliónov ľudí.[23,24]

Odpovedať na otázku, koľko ľudí v Českej republike postihuje AD či iná forma demencie alebo dokonca, ktoré vekové skupiny či pohlavie sú najviac ohrozené, nie je vôbec jednoduché. V domácich podmienkach totiž doposiaľ neexistuje žiaden relevantný výskum, ktorý by tieto parametre mapoval. Preto sa vo väčšine prípadov opierame o výsledky zo zahraničných prevalenčných štúdií. Avšak podľa demografických odhadov trpí dnes v Českej republike demenciou 150 000 až 200 000 ľudí, z toho takmer viac než dve tretiny sú ženy.[16,23]

3.1.1.2. Rizikové faktory

Za najvýznamnejší a neovplyvnilný rizikový faktor AD možno považovať vek. Druhým najdôležitejším faktorom je prítomnosť apolipoproteínu E4 (ApoE4), ktorý je považovaný za hlavný genetický rizikový faktor. U ľudí, u ktorých nenachádzame prítomnosť alely pre ApoE4 je riziko vzniku AD 9%, najvyššie riziko predstavujú heterozygoti 83%. Mutácie génu pre amyloidný prekursorový proteín (APP), presenilínu 1 a presenilínu 2 vedú k včasne nastupujúcej familiárnej AD. Štúdie týkajúce sa celého genómu identifikovali viac ako 20 lokusov spojených so zvýšeným rizikom vzniku AD, ukazujúce na imunitné, zápalové reakcie,

recykláciu endozomálnych vezikúl a metabolizmus lipidov. Kardiovaskulárne a psychosociálne faktory považujeme za hlavné modifikovateľné faktory AD.[16,25–27]

3.1.1.3. Patofyziológia

Na molekulovej úrovni je cholinergná hypotéza prvým a najviac študovaným prístupom popisujúcim patofyziológiu AD. Bola definovaná pred viac ako 30 rokmi minulého storočia ako primárny degeneratívny proces, schopný selektívneho poškodenia skupiny cholinergných neurónov v hippocampe, frontálnom kortexe, amygdale a ostatných štruktúr podieľajúcich sa na kognitívnych procesoch. Tieto zmeny sú zodpovedné za zníženú reguláciu cholinergných markerov, ako je acetyltransferáza a AChE, ktoré úzko korelujú s nástupom kognitívnej poruchy. Okrem iného dochádza k zhoršenému uvoľňovaniu celkového množstva ACh a deficitu v expresii nikotínových či muskarínových receptorov.[28] Zaujímavé je, že hladina BuChE významne stúpa.[29]

Za syndrómom demencie sa ukrýva mnoho príčin preto je nasledujúci prehľad čisto výberový, popisujúci základné klinickopatologické aspekty daného ochorenia.[23]

3.1.1.3.1. Senilné plaky

Za jednu z hlavných kľúčových histopatologických charakteristík pacientov trpiacich AD, možno považovať prítomnosť extracelulárnych senilných plakov pozorujúc v okolí neurónov, či glií. Hlavnou zložkou týchto plakov je β -amyloid ($A\beta$), ktorý je zložený zo 40 – 42 aminokyselín a vzniká enzymatickým štiepením APP, kódovaného génom na 21. chromozóme.[30] APP je exprimovaný na intra- aj extracelulárnych membránach a jeho hlavná úloha v organizme býva stále nejasná. No z hľadiska množstva možných izoforiem ktoré má, sa vedcom podarilo niektoré z jeho funkcií objasniť. Medzi jeho možné funkcie patrí modulácia synaptickej plasticity, stabilizácia vnútrobunkovej hladiny vápnika či rast axónov.[31]

Ako už bolo spomenuté, APP podlieha proteolytickému štiepeniu, ktoré sa môže uberať dvomi smermi, a to podľa toho, či $A\beta$ vznikne alebo nie. α -Sekretáza je zodpovedná za neamyloidogénnu dráhu štiepenia APP, kedy vznikajú solubilné *N*-terminálne fragmenty ($sAPP\alpha$), po ktorých už $A\beta$ nevzniká. $sAPP\alpha$ zohráva dôležitú úlohu v neuronálnej plasticite a regulácii proliferácie nervových kmeňových buniek, dôležitých pre včasný vývoj CNS. Produkcia $A\beta$ v amyloidogénnej dráhe zahŕňa postupné štiepenie APP pomocou β - a γ -sekretázy. K dosiahnutiu optimálnej aktivity, vyžaduje β -sekretáza kyslé prostredie, ktoré je zabezpečené endozómami. Expresia β -sekretázy sa prirodzene zvyšuje vekom, ale výrazné zvýšenie pozorujeme v mozgovej kôre pacientov s AD. Po štiepení APP pomocou tejto

sekretázy dochádza k uvoľneniu rozpustého peptidu sAPP β , ktorý je zodpovedný za odumieranie neurónových buniek. Po zásahu α - a β -sekretázy zostávajú karboxylové terminálne fragmenty (CFTs) α CFT a β CFT asociované s membránou, kde vyčkávajú na ďalšie štiepenie sprostredkované pomocou γ -sekretázy. Ukázalo sa, že nadprodukcia β CFT má cytotoxický účinok a spôsobuje degeneráciu neurónov. Spracovanie α CFT pomocou γ -sekretázy vedie k tvorbe p83 peptidu, ktorý podlieha následnej degradácii. Za základ senilných plakov považujeme A β 40 a A β 42, ktoré vznikajú štiepením β CFT.[32–34]

3.1.1.3.2. Neurofibrilárne kľbká

τ -Protein patrí do skupiny príbuzných proteínov, viažucich sa na mikrotubuly a zohráva veľmi dôležitú úlohu v zachovaní ich stability.[35] Kódovaný je génom, ktorý je umiestnený na dlhom ramienku chromozómu 17 v pozícii 17q21, a pozostáva najmenej zo 16 exónov.[36] τ -Protein je zložený z *N*-terminálnej časti (projekčná doména), ktorá obsahuje kyslú a oblasť bohatú na prolín. Vďaka tejto oblasti sú τ -proteíny schopné prepojiť mikrotubuly s cytoskeletom a eliminovať ich pružnosť. Nasleduje C-terminálna bázická oblasť, ktorej význam spočíva v polymerizácii mikrotubulov.[37–39]

Stupeň fosforylácie τ -proteínu reguluje samotnú stabilitu mikrotubulov. Kinázy, zodpovedné za fosforyláciu a špecifické fosfatázy, zodpovedné za defosforyláciu, regulujú tento stupeň. V natívnej nefosforylovanej forme je tento proteín dezorganizovaný, flexibilný a tepelne stabilný. Keď sa τ -proteín stane patologickým, podstúpi rôzne posttranslačné úpravy ako je glykozylácia, nitrácia, ubikvitinácia alebo hyperfosforylácia. Posttranslačnými úpravami dochádza k zmene konformácie proteínu, ktoré vedú k neschopnosti väzby na mikrotubuly a k následnej agregácii fosforylovaných τ -proteínov. Tento proces je spôsobený dereguláciou kináz a fosfatáz pôsobiach na tento proteín.[40] K hyperfosforylácii τ -proteínu dochádza prostredníctvom proteínkináz, ktoré môžeme rozdeliť do dvoch skupín:

- „prolin-directed kinázy“: glykogensyntáza kináza-3 β (GSK-3 β), cyklín dependentná kináza a mitogénom aktivovaná proteínkináza,
- „non-prolin directed kinázy“: proteínkináza A, proteínkináza C a kalmodulin, modifikujúce aminokyseliny v blízkosti kyslej časti proteínu.[41,42]

Ukázalo sa, že nadmerná expresia GSK-3 β u transgénnych myší indukuje hyperfosforyláciu a následne jeho neurodegeneráciu. Oba tieto procesy môžeme zvrátiť pôsobením lítia alebo inhibítormy GSK-3 β . Okrem iného sa podieľa na proliferácii buniek, apoptóze a embryonálnom vývoji.[43]

Po fosforylácii dochádza k rozpleteniu proteínu a následnému združovaniu jeho vlákien do párových helikálnych filamentov, tvoriacich základ pre tvorbu neurofibrilárnych kĺbkov (NFT). Vnútrobnkový depozit týchto kĺbkov porušuje cytoarchitektoniku buniek, čo následne vedie k ich apoptóze.[16]

3.1.1.3.3. Apolipoproteín E

ApoE je multifunkčný proteín zohrávajúci veľmi dôležitú úlohu v metabolizme lipidov, neurobiologických a neurodegeneratívnych procesoch.[44] Ľudský ApoE je zložený z 299 aminokyselín s molekulovou hmotnosťou 34 kDa. ApoE existuje v troch izoformách. Jednotlivé izoformy ApoE kódované tromi génovými alelami sa od seba líšia v polohách 112 a 158, kde je prítomný buď cysteín alebo arginín: ApoE2 (Cys112, Cys158), ApoE3 (Cys112, Arg158), a ApoE4 (Arg112, Arg158). Ukázalo sa, že práve tieto polymorfizmy jednotlivých aminokyselín podstatne menia štruktúru a funkciu ApoE, čím dochádza k modulácii ich väzbových vlastností k lipidom či receptorom. Napríklad väzba ApoE4 má vyššiu afinitu k lipoproteínom s veľmi nízkou hustotou než ApoE3 a ApoE2, ktoré sa prednostne viažu na lipoproteíny s hustotou vysokou.[45,46]

Hlavnou funkciou ApoE je sprostredkovať väzbu lipoproteínov alebo lipidových komplexov v plazme či intersticiálnych tekutinách na špecifické receptory, čím sa uplatňuje na homeostatickej kontrole obsahu lipidov v plazme a tkanivách.[44]

Vedci zistili, že hlavným miestom syntézy ApoE sú hepatocyty. ApoE taktiež môžeme nájsť v nadobličkách, semeníkoch, slezine, makrofágoch či mozgu. V CNS je produkovaný hlavne astrocytmi, kde zabezpečuje hlavný transport lipidov v mozgomiechovom moku.[45,46]

Imunohistopatologické dôkazy poukazujú na to, že ApoE výrazne ovplyvňuje depozíciu A β do senilných plakov, čím dochádza k rozvoji amyloidovej angiopatii. Depozícia A β vo forme senilných plakov je intenzívnejšia u pacientov, u ktorých pozorujeme prítomnosť alely pre ApoE4.[45]

3.1.1.3.4. Oxidačný stres a mitochondriálna dysfunkcia

Oxidačný stres je redoxný stav vyplývajúci z nerovnováhy medzi generáciou a detoxifikáciou reaktívnych druhov kyslíka (ROS). Tieto reaktívne formy sú fyziologicky nevyhnutné vedľajšie produkty, ktoré pôsobia ako dvojsečný meč v biologickom systéme. Sú súčasťou mnohých patologických, fyziologických či biochemických pochodov.[47]

Hoci ľudský mozog predstavuje len 2 % telesnej hmotnosti, spotrebuje približne 20 % kyslíka dodávaného dýchacím systémom. Vysoká spotreba energie mozgu znamená vyššiu náchylnosť voči oxidačnému stresu ako ktorýkoľvek iný orgán. Neurón, ako základná funkčná jednotka mozgu je obzvlášť citlivá na oxidačné poškodenie, pretože má vyššiu rýchlosť metabolizmu ako iné bunky. Oxidácia lipidov, proteínov a nukleových kyselín v neurónoch možno považovať za častý patologický rys AD. Neuróny obsahujú veľké množstvo polynасыtených mastných kyselín, ktoré môžu interagovať s ROS, čo následne vedie k samovoľnej kaskáde peroxidácie lipidov a deštrukcii molekúl.[48]

Mitochondrie sú hlavným zdrojom oxidačného stresu, z dôvodu konštantnej produkcie superoxidového aniónu, ktorý je aj napriek prítomnosti mitochondriálneho antioxidantného systému zodpovedný za vznik 90 % endogénneho ROS. Dysfunkčná mitochondria je menej efektívnym výrobcom adenosintrifosfátu (ATP), ale účinnejším výrobcom ROS.[47]

3.1.1.3.5. Rastové faktory

Neurotrofíny zahŕňajú širokú škálu štruktúrne príbuzných peptidov, ktoré regulujú diferenciáciu, rast a prežitie neurónov v centrálnom aj periférnom nervovom systéme.[49,50] Do skupiny tzv. „klasických neurotrofínov“ zaradujeme NGF (nervový rastový faktor), BDNF (mozgový neurotrofický faktor), neurotrofín 3 a neurotrofín 4,5.[51] Pôvodne vznikajú prekursorové pro-peptidy, vykazujúce odlišné biologické vlastnosti než zrelé formy.[52] Funkcia neurotrofínov závisí od ich hlavných receptorov, selektívnej tyrozínkinázy (Trk) a pan-neurotrofického receptoru p75 (p75NTR). Po väzbe na Trk receptory dochádza k fosforylácii proteínov tyrozínu a spustení signálnej kaskády všeobecne spojenej s prežitím neurónov. Naopak väzba na p75NTR receptor a sortilin vyvoláva apoptózu buniek. Zrelý NGF (matNGF) sa viaže na p75NTR s nižšou afinitou v porovnaní s pro-NGF. Aktivácia dráh prostredníctvom p75NTR môže spustiť pro- alebo anti-apoptický signál. Vedci zistili, že v kortikálnych oblastiach mozgu pacientov s AD je znížená expresia génov TrkA a hladina proteínov, zatiaľ čo hladiny p75NTR ostávajú nezmenené. [53–58] Z toho vyplýva, že novými potenciálnymi prístupmi v terapii AD sú antagonisti p75NTR alebo agonisti TrkA.[59]

3.1.1.3.6. Zápalové mechanizmy

Mikroglie sú rezidentné makrofágy, ktoré tvoria približne 10 % všetkých buniek v CNS. Sú jedny z prvých imunitných buniek aktívnych počas zápalovej reakcie a predstavujú prvú líniu bunkovej obrany proti napadajúcim patogénom, či iným druhom poškodenia mozgu. Tieto bunky sa diferencujú z kmeňových buniek v kostnej dreni a následne putujú do mozgu

a miechy. Za normálnych podmienok existujú v tzv. pokojovom stave a ich hlavnou úlohou je pozorne sledovať CNS pred blížiacim sa patogénom. K aktivácií a zmene ich morfológických vlastností dochádza pri rôznych inzultoch mozgu (trauma, infekcia, neurodegenerácia) a ich hlavným cieľom je detekovať prípadné poškodenie. Aktivované mikroglie zohrávajú veľmi dôležitú úlohu vo fagocytóze patogénov či odstraňovaní degenerujúcich buniek v mieste poškodenia. Pribúdajúce dôkazy poukazujú na skutočnosť, že zápalové procesy sprostredkované mikrogliami majú nie len protektívny, ale aj škodlivý účinok. Po ich aktivácií dochádza k produkcii zápalových mediátorov vrátane cytokínov, chemokínov, indukovateľnej syntázy oxidu dusnatého, cyklooxygenáz-2 a voľných radikálov ako sú ROS, ktoré môžu rušiť neurónové funkcie a spôsobiť tak ich poškodenie. Aktivované mikroglie tiež produkujú širokú škálu neuroprotektívnych faktorov, ktoré pomáhajú predchádzať neurónovým poškodeniam, ako napríklad BDNF, NGF či neurotrofický faktor odvodený od gliových buniek.[60,61]

V závislosti od ich aktivovaného stavu môžeme mikroglálne bunky vo všeobecnosti klasifikovať na protizápalový fenotyp M1 a M2. Fenotyp M1 je aktivovaný „klasicky“ pomocou Toll-like receptoru alebo interferónu γ . Je zodpovedný za produkciu prozápalových cytokínov, ktoré nakoniec vedú k poškodeniu neurónov v mieste tkaniva. Naopak fenotyp M2 je „alternatívne“ aktivovaný interleukínom 4 (IL-4) alebo IL-13 a podieľa sa na uvoľňovaní vysokých hladín protizápalových látok, ktoré majú za úlohu dané tkanivo opraviť.[60,61]

Posledné výskumy preukazujú prítomnosť aktivovaných mikroglíí na miestach depozície A β , čo naznačuje, že tieto gliové bunky môžu fyzicky interagovať s A β a regulovať ich hladiny v mozgu. Ďalší dôkaz poskytujúci súvislosť medzi dysfunkciou mikroglíí a patogenézou AD pochádza z genetických štúdií a poukazuje na fakt, že nulová mutácia génu TREM 2, ktorý je špecificky exprimovaný mikrogliami v CNS, úzko koreluje so závažnou hyperfosforyláciou τ -proteínu.[60,61]

3.1.1.4. Diagnostika

V ranom štádiu AD je veľmi dôležitá včasná a správna diagnostika a diferenciálne odlíšenie choroby, napríklad od benígnej zúblivosti starnúcich osôb, alebo od miernej kognitívnej poruchy.[20] K tomu nám môže dopomôcť dôkladná anamnéza, fyzikálne aj testovacie metódy. Ako skríningový test býva najčastejšie používaný krátky test kognitívnych funkcií alebo test kreslenia hodín. Avšak ani jeden z nich nie je plne špecifický, preto sa s výhodou používajú zložitejšie testy kognitívnych funkcií, predovšetkým „Alzheimer disease assessing scale-cognitive subscale“. Diagnosticky dôležitý je tiež samotný priebeh a prejavy demencie.[62]

Medzi podporujúce nálezy patrí prítomnosť mediálnej temporálnej atrofie vzniknutej v dôsledku zníženia objemu hipokampu, entorhinálneho kortexu a amygdaly, preukázateľná metódou magnetickej rezonancie. Významná je taktiež abnormálna prítomnosť biomarkerov v mozgovomiechovom moku. Jedná sa o nízku koncentráciu A β , vyššiu koncentráciu celkového τ -proteínu alebo zvýšenú koncentráciu fosforylovaného τ -proteínu. Medzi ďalšie diagnostické prvky môžeme zaradiť, dôkaz autozomálne dominantných mutácií v rodine alebo nálezy na molekulárnom zobrazení mozgu pomocou pozitronovej emisnej topografie. Jedná sa o metódu, ktorá identifikuje zhluky A β pomocou protilátky označovanej ako pittsburská zlúčenina b, alebo preukazuje hypometabolizmus pomocou značenej fluorodeoxyglukózy v temporálnych a parietálnych lalokoch.[19]

3.1.1.5. Klinický obraz

Pre AD je charakteristický veľmi pomalý a nenápadný začiatok, ktorý je niekedy až tak nenápadný, že si prvé príznaky všimne skôr okolie než samotný pacient. AD zaradzujeme medzi kortikálne demencie. Preto prvé príznaky reprezentujú poruchy z oblasti kognitívnych funkcií, kedy dochádza k defektu tzv. epizodickej pamäte. Táto porucha sa častokrát prejavuje zabúdaním, kedysi zaužívaných, každodenných rituálov. Pomerne často sa vyskytujú tzv. vizuospeciálne poruchy, ktoré sa v praxi prejavujú stratou orientácie v čase a v priestore. Pri výraznejšom postihnutí pacient stráca schopnosť logického myslenia, či dokonca logických úvah. Pridružuje sa porucha reči, ktorá je síce plynulá, ale obsahovo veľmi jednoduchá a stereotypná.[21]

Okrem kognitívnych porúch môžeme u pacientov pozorovať konštantný výskyt behaviorálnych a psychologických príznakov demencie (BPSD). Často sú tak nápadné, že neznepokojujú len samotného pacienta, ale i okolie. U chorého pozorujeme hlavne agitovanosť, výbušnosť, zmeny nálad, či dokonca úzkosť a depresiu. S BPSD súvisia aj pridružené psychotické príznaky, ktoré sa vyskytujú veľmi zriedkavo, a to halucinácie a bludy. V terminálnom štádiu dochádza k absolútnemu rozpadu osobnosti. Pacienti nie sú schopní verbálne komunikovať, sú imobilní, inkontinentní a plne odkázaní na pomoc ostatných. AD končí letálne po 7–15 rokoch od stanovenia diagnózy. Bezprostrednou príčinou smrti obvykle býva pľúcne ochorenie (hypostatická pneumónia, bronchopneumónia), dekubitná sepsa alebo následok úrazu.[13,23]

3.1.1.6. Terapia

Doposiaľ sa nepodarilo objasniť komplexnú etiopatogéniu tejto choroby. Preto sa prístupy používané v súčasnosti opierajú už o známe patogenetické mechanizmy. Napriek intenzívnej snahe vo vývoji nových liekov, máme v dnešnej dobe k dispozícii len dva základné farmakologické prístupy ovplyvňujúce acetylcholinergný a glutamátergny systém. Nasledujúci text pojednáva o farmakoterapii kognitívnej, teda tej, ktorá moduluje klinický obraz daného ochorenia.[63–65]

3.1.1.6.1. Acetylcholín

ACh je všestranná molekula, ktorá pôsobí nielen ako neurotransmitter, ale tiež ako neuromodulátor nervového systému.[66] Syntéza ACh prebieha v cytoplazme cholinergných neurónov z cholínu a acetyl-koenzýmu A (Acetyl-CoA), pôsobením enzýmu cholínacetyltransferázy (ChAT). Následne je ACh transportovaný vezikulárnym acetylcholinovým transportérom z cytosolu do synaptických vezikúl. Acetyl-CoA je dodávaný mitochondriou, kdežto väčšina cholínu pochádza priamo z potravy. Po depolarizácii cholinergných neurónov je ACh exocytovaný zo synaptických vezikúl a následne uvoľnený do synaptickej štrbiny, kde interaguje s muskarínovými a nikotínovými receptormi. Jeho účinok netrvá príliš dlho a hneď potom je inaktivovaný AChE alebo BuChE na kyselinu octovú a cholín. Cholín, ktorý je produkovaný pri tejto degradácii sa recykluje, tj. prenáša sa za pomoci aktívneho transportného systému do nervových zakončení, kde sa z neho syntetizujú nové molekuly ACh.[67]

Rozlišujeme dve hlavné skupiny cholinergných receptorov: nikotínové, asociované s ionovými kanálmi a muskarínové, sprážené s G-proteínom. Oba tieto receptory sú exprimované v centrálnom a periférnom nervovom systéme. V mozgu sú receptory pre ACh exprimované pre- aj postsynapticky a slúžia k sprostredkovaniu neuromodulačných funkcií ACh. Nikotínové receptory pozostávajú z piatich podjednotiek, ktorých vzájomná kombinácia určuje farmakologické a fyziologické vlastnosti. V súčasnosti je známych dvanásť rôznych podjednotiek ($\alpha 2$ - $\alpha 10$ a $\beta 2$ - $\beta 4$). $\alpha 4\beta 2$ majú najvyššiu afinitu k nikotínu. $\alpha 7$ nikotínový receptor sa líši od iných tým, že je vysoko priepustný pre Ca^{2+} a hrá jedinečnú úlohu v synaptickej modulácii.[66]

Muskarínové receptory sú široko distribuované v ľudskom tele a sprostredkujú odlišné fyziologické funkcie, ktoré závisia od miesta pôsobenia a podtypu receptora. Je známe,

že existuje päť rôznych podtypov muskarínových receptorov (M1–M5), hoci presná lokalizácia a funkčná úloha všetkých týchto podtypov nebola úplne objasnená.[68]

3.1.1.6.2. Cholinesterázy

ChE je generický pojem označujúci rodinu príbuzných enzýmov, ktoré hydrolyzujú cholinové estery rýchlejšie, ako iné estery za optimálnych podmienok. Jedná sa o serínové hydrolázy, patriace do rodiny esteráz. V ľudskom tele existujú dva typy ChE a to: AChE a BuChE.[69]

AChE, ako už bolo uvádzané, patrí do skupiny serín-proteínových hydroláz prítomných v cholinergných nervových synapsiách a nervosvalovej platničke. Špecifickým substrátom pre AChE je ACh, ktorý činnosťou tohoto enzýmu rýchlo hydrolyzuje na acetát a cholín. Touto hydrolýzou je terminovaná fyziologická funkcia ACh ako neuromediátora prenášajúceho nervové vzruchy v cholinergnom systéme. Štruktúrne sa jedná o α/β proteín obsahujúci dvanásť β -skladaných listov, ktoré obklopuje štrnásť α -skrutkovic.[70] Samotná hydrolytická reakcia prebieha v katalytickom mieste, ktoré sa nachádza na dne úzkej a 20 Å hlbkej kavity, ktorú lemuje štrnásť aromatických kyselín. Toto najdôležitejšie, inak nazývané esteratické miesto obsahuje tri esenciálne aminokyseliny Ser200, His440 a Glu327, a spolu vytvárajú katalytickú triádu. Podieľajú sa na prenose acetylovej skupiny z ACh na Ser200. Zásadnú úlohu v procese hydrolýzy zohráva aj anionické miesto zložené z Trp84, Tyr130, Phe330 a Phe331. Je zodpovedné za väzbu kvartérnej amóniovej skupiny substrátu s kationovými π -interakciami. V dôsledku interakcie s aniónovým miestom je zabezpečená správna orientácia ACh v kavite. Medzi ďalšie významné súčasti AChE považujeme oxyaniónový otvor, acylovú kapsu a periférne anionické miesto. Oxyaniónový otvor je komplex vytvorený a stabilizovaný Gly118, Gly119 a Ala201 z AChE. Úloha acylovej kapsy spočíva v substrátovej špecifickosti. Tvar acylovej kapsy je determinovaný dvoma zvyškami a to: aromatickými aminokyselinami Phe288 a Phe290. Phe288 a Phe290 bránia prístupu väčších molekúl priamo do katalytického centra. Periférne anionické miesto (PAS), inak označované aj ako β -anionické, pozostáva z piatich aminokyselín Tyr70, Asp72, Tyr121, Trp279 a Tyr334. PAS sa nachádza pri vstupe do aktívnej kavity a zodpovedá za ďalšie činnosti vrátane interakcie s $A\beta$. S PAS sú schopné interagovať nekompetitívne inhibítory AChE.[70–72]

Znalosť štruktúry a vlastností katalytickej triády AChE vedie k návrhu a vývoji nových inhibítorov AChE (IAChE) ako potencionálnych terapeutík pre liečbu AD. Mechanizmus ich inhibície sa uplatňuje tiež pri vývoji reaktivátorov ako antidot pri liečbe otráv nervovo paralytickými látkami. Ďalšie uplatnenie IAChE je v liečbe myasténie gravis.[73]

BuChE, inak označovaná aj ako pseudocholinesteráza či nešpecifická cholinesteráza, býva v ľudskom tele syntetizovaná v mnohých tkanivách vrátane svalov, obličiek, srdca, pľúc a pečene, ktorá je považovaná za najväčší rezervoár tohto enzýmu.[74,75]

Niektorí vedci sa domnievajú, že BuChE nezohráva v tele žiadnu zásadnú rolu skrz fakt, že na rozdiel od AChE nemá žiaden fyziologický substrát. Okrem AChE môže AChE hydrolyzovať taktiež BuChE, avšak rýchlosť jej hydrolýzy je podstatne nižšia. Ľudia s deficitom BuChE, t.j. pacienti trpiaci na hypocholinesterasemiu, vykazujú minimálnu alebo žiadnu aktivitu tohto enzýmu v plazme, a preto sú zraniteľnejší voči niektorým drogám. BuChE je hlavným detoxifikačným enzýmom prírodného i syntetického kokaínu v plazme a jeho neaktívne metabolity produkované BuChE, metylestery ekgonínu a kyseliny benzoovej sú rýchlo vylučované ľadvinami. Exogénne podávanie BuChE teda urýchľuje metabolizmus kokaínu, čím znižuje jeho behaviorálne a toxické účinky.[69,75,76]

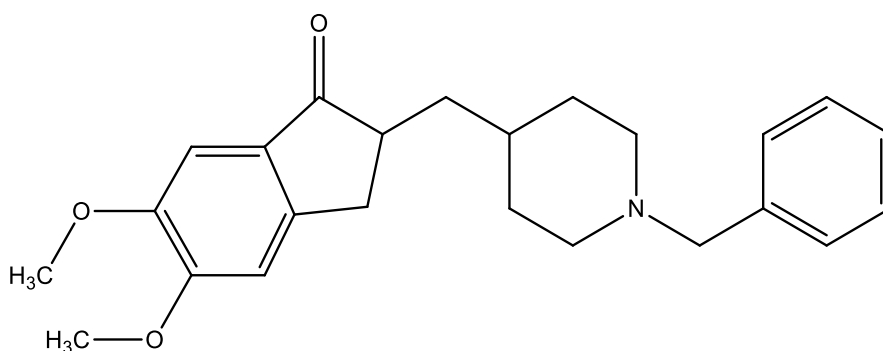
Za patologických podmienok pozorujeme signifikantne zvýšenú aktivitu BuChE a jeho prítomnosť v senilných plakoch tvorených A β . [77]

3.1.1.6.3. Inhibítory cholinesteráz

Jednou z variant ako docieľiť zvýšenie cholinergnej transmisie je spomaliť odbúravanie ACh zo synaptickej štrbiny. ACh je odbúravaný AChE, ktorá sa nachádza v synaptickej štrbine a BuChE bežne sa vyskytujúcou v krvi. Hoci BuChE býva často ignorovaná, v rozvoji AD môže byť jej úloha veľmi dôležitá, pretože v najviac poškodených oblastiach mozgu, ako je hipokampus či temporálny kortex, stúpa jej aktivita o 40 – 90 %.[78] Súčasná terapia AD funguje na princípe inhibície časti enzýmu AChE, čo v konečnom dôsledku spôsobí predĺženie času zotrvania ACh prítomného v synaptickej štrbine.[79] Zlatým štandardom v terapii AD sú bezpochyby IChE – donepezil, rivastigmín a galantamín, ktoré napomáhajú stabilizovať postupné zhoršovanie kognitívnych funkcií. Jedná sa preto o symptomatickú liečbu, ktorá napomáha zmierňovať príznaky daného ochorenia.[80] Účinok IChE je omnoho komplexnejší než sa na prvý pohľad môže zdať. Zistilo sa, že niektoré z vyššie spomínaných látok zároveň interagujú s nikotínovými receptormi. To by mohlo viesť k záveru, prečo ich klinický účinok nie vždy koreluje s ich cholinesterázovou inhibičnou aktivitou. Napríklad galantamín napomáha cholinergnej transmisii aj po ukončení jeho podávania, čo by mohlo signalizovať, že jeho účinok nie je obmedzený len na inhibíciu AChE, ale mohol by zahŕňať aj systematické zmeny. Ďalším z jeho mechanizmov účinku je práve interakcia s nikotínovými receptormi, na ktoré pôsobí pozitívnu alosterickú moduláciou.[81–83]

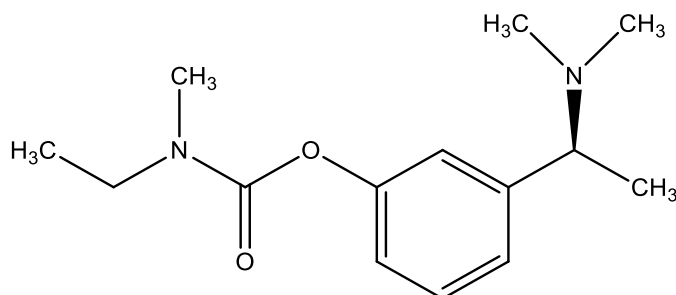
Prvou látkou, u ktorej boli zistené účinky spojené s inhibíciou AChE bol fyzostigmín. Získaval sa zo semien *Physostigma venosum* Balf., č. Fabaceae ako parasymptomimetický rastlinný alkaloid a svoje uplatnenie získal v terapii glaukomu či gastroparéze. Napriek schopnosti prechádzať hematoencefalitickou bariérou, boli u neho objavené závažné nežiaduce účinky, pre ktoré nebol nikdy schválený k terapii AD.[84]

Donepezil (Obr. 1) je vysoko selektívny a reverzibilný piperidinový derivát, vykazujúci inhibičné vlastnosti voči AChE.[85] Okrem inhibície AChE vykazuje aj ďalšie mechanizmy účinku, a to na molekulovej a bunkovej úrovni. Blokuje rôzne aspekty excitotoxickéj kaskády indukovanej glutamátom, zmiernuje účinky oxidačného stresu či znižuje expresiu zápalových cytokínov.[86]



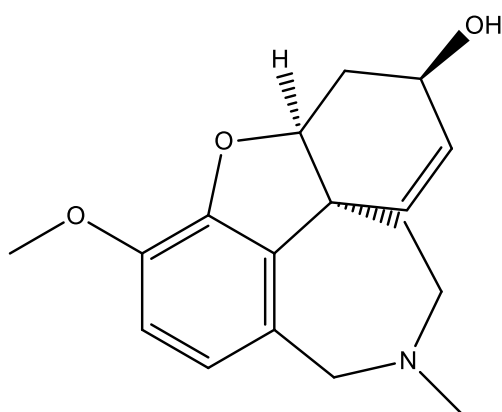
Obr. 1 Štruktúra donepezilu

Rivastigmín (Obr. 2) je zástupca karbamátových derivátov a ako jediný pôsobí reverzibilnou inhibíciou na AChE a BuChE. Metabolizovaný je priamo AChE a preto u neho nepozorujeme významné liekové interakcie. Farmakokinetický profil rivastigmínu ukázal, že transdermálna náplasť v porovnaní s perorálnou aplikáciou, poskytuje plynulejšiu a nepretržitú suplementáciu liečiva po dobu 24 hodín, čo v konečnom dôsledku výrazne eliminuje jeho nežiaduci vplyv na gastrointestinálny trakt.[87]



Obr. 2 Štruktúra (*S*)-rivastigmínu

Galantamín (Obr. 3) je izochinolinový alkaloid pôvodne izolovaný z *Galanthus woronowii* Losinsk., ale pre komerčné účely sa získava synteticky alebo extrakciou z bylín rodu *Narcissus* L. a *Leucojum* L. patriace do čeľade Amaryllidaceae.[88] Je to reverzibilný IChE (inhibícia BuChE je nevýznamná) a zároveň alosterický modulátor nikotínových receptorov.[64] Galantamín je výrazne metabolizovaný pečeneňým systémom cytochrómov P450 (popríklad CYP 2D6 a 3A4), po ktorom nasleduje glukuronidácia. Hepatotoxičita sa môže vyskytnúť v dôsledku jeho idiosynkratického metabolizmu na toxicky alebo imunogénny medziprodukt. Obecnne možno galantamín považovať za dobre tolerovanú látku.[89]



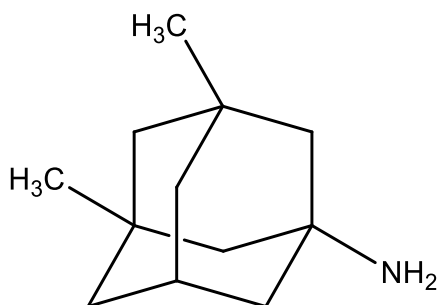
Obr. 3 Štruktúra galantamínu

3.1.1.6.4. Inhibítory NMDA receptorov

Glutamátový systém je ďalším neurotransmitterovým systémom, u ktorého dochádza k poškodeniu jeho základnej fyziologickej funkcie. Miera poškodenia závisí od progresie daného ochorenia. Glutamát pôsobí excitačne takmer na všetky neuróny v CNS a jeho správna funkcia je nevyhnutná v mechanizmoch pamäte a učenia. Viaže sa na svoje ionotropné receptory, umožňujúce influx katiónov (Na^+ , Ca^{2+} , K^+) do vnútra bunky. Za fyziologických podmienok je iónový kanál *N*-methyl-D-aspartátových (NMDA) receptorov zablokovaný Mg^{2+} a až po uvoľnení glutamátu dochádza k depolarizácii membrány, čím sú Mg^{2+} ióny nútené opustiť kanál. Po stimulácii NMDA receptoru dochádza po vstupe Ca^{2+} iónov k dlhodobému ovplyvneniu synaptickej plasticity. Pri rozpade neurónov dochádza k nadmernému vylučovaniu excitačných aminokyselín s čím je spojená hyperexcitácia ionotropných NMDA receptorov. Tento jav je zosilnený tým, že v niektorých oblastiach mozgu dochádza k zníženému spätnému vychytávaniu glutamátu. Pri výraznej stimulácii týchto receptorov, spojených s otváraním

iónových kanálov, dochádza k nadmernému influxu Ca^{2+} iónov do neurónov. To má za následok spustenie celej kaskády dejov vedúcich k destabilizácii vnútorného prostredia neurónov a aktivácií proteinkináz, čím dochádza k odhaleniu patologických génov a k bunecnej apoptóze. Z farmakologického hľadiska je teda žiadané pôsobiť proti tejto hyperexcitácii vhodným antagonistom. V súčasnosti sa v klinickej praxi používa zatiaľ jeden liek.[90]

Memantín (Obr. 4) je nekompetitívny antagonist glutamátových NMDA receptorov. Blokuje ich chronickú hyperaktivitu a tým aj zvýšený vtok vápnika do neurónov, čo v konečnom dôsledku vedie k ich smrti. Za ďalší predpokladaný efekt memantínu možno považovať zníženie degenerácie τ -proteínu inhibíciou enzýmu GSK-3 β . [91,92]



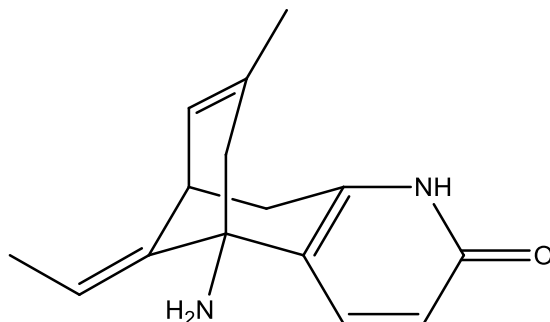
Obr. 4 Štruktúra memantínu

3.1.1.6.5. Rastliny tradičnej čínskej medicíny a ich pozitívny vplyv v terapii AD

Tradičná čínska medicína sa v Číne praktizuje viac ako 2000 rokov. V posledných rokoch sa vedcom podarilo izolovať mnoho aktívnych farmakologicky účinných látok. Mnohé z nich vykazovali pozitívny vplyv v terapii AD s menším výskytom vedľajších účinkov ako bežné lieky používajúce sa v súčasnej medicíne. V nasledujúcom prehľade sumarizujem najnovší pokrok vo výskume tradičných čínskych bylín a ich obsahových látok, ktorý poukazuje na ich úlohu v liečbe AD a možné farmakologické účinky.[93]

Huperzín A (HupA) (Obr. 5) je prírodný lykoidinový alkaloid extrahovaný z čínskej byliny *Huperzia serrata* (Thunb. ex Murray) Trevis., č. Lycopodiaceae, ktorý je považovaný za najúčinnjší IChE.[94,95] V porovnaní s ostatnými komerčne dostupnými liekmi vykazuje Hup A vyššiu biologickú dostupnosť a priechodnosť cez hematoencefalitickú bariéru.[96] Hup A má neuroprotektívne vlastnosti spočívajúce v schopnosti chrániť bunky pred peroxidom vodíka, A β , glutamátom či ischemií.[97] V poslednej dobe je značný záujem o tzv. syntetické

hupríny, zlúčeniny kombinujúce štrukturálne vlastnosti HupA a takrínu. Huprín X nielenže vykazuje inhibíciu voči AChE, ale taktiež sa u neho pozorujú priaznivé účinky pri znižovaní amyloidogénnych procesov. Žiaľ do dnešnej doby neboli publikované žiadne klinické štúdie s použitím tejto zlúčeniny.[98]

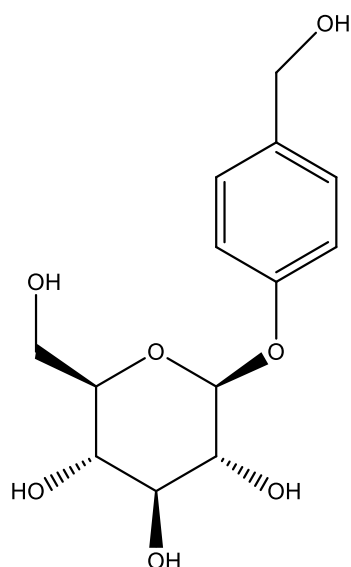


Obr. 5 Štruktúra huperzínu A

Listy stromu *Ginkgo biloba* L., č. Ginkgoaceae, boli po stáročia súčasťou tradičnej čínskej medicíny. Na začiatku 70. rokov Dr. Willmar Schwabe Pharmaceuticals navrhol postup k extrakcii a štandardizácii vysoko koncentrovaných a stabilných extraktov práve z týchto listov.[99] Štandardizovaný extrakt z *G. biloba* (EGb761) je zmes mnohých aktívnych látok s rozdielnymi farmakologickými účinkami avšak výsledný efekt je synergický. Hlavnými nositeľmi farmakologickej aktivity sú flavónové glykozidy (kvercetin, kempferol, isoharmnetin) a terpenové laktóny (ginkgolidy a bilobalidy). Ochrana mitochondrií a protizápalový účinok sprostredkujú predovšetkým ginkgolidy a bilobalidy. Diskutuje sa aj o možnosti inhibície faktoru aktivujúceho krvné doštičky zablokovaním jeho receptora. Extrakt pravdepodobne zabraňuje tvorbe A β a zvyšuje hladiny niektorých neurotransmiterov v mozgu. Nedávne štúdie potvrdzujú aj mierne anxiolytické a protistresové účinky, vzhľadom k možnosti inhibície monoaminoxidáz A,B.[100,101]

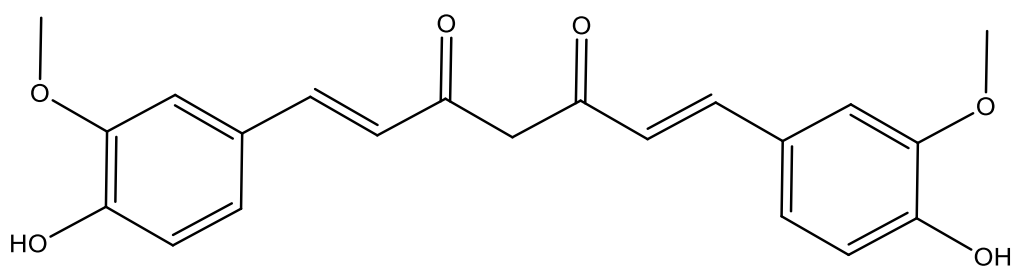
Gastrodia elata Blume, č. Orchidaceae je saprofytická rastlina vyskytujúca sa najmä v horských oblastiach východnej Ázie.[102] Hlavnou liečivou časťou je jej podzemok, nazývaný Rhizoma Gastrodiae. Od 50. rokov minulého storočia bolo izolovaných viac než 81 zlúčenín vrátane fenolov, polysacharidov, organických kyselín či sterolov. Gastrodín (Obr. 6) ako fenolický glykozid bol druhou izolovanou zlúčeninou hneď po vanilylalkohole a považuje sa za hlavnú bioaktívnu zložku Rhizomy Gastrodiae. Pri štandardizácii kvality sa obsah gastrodínu považuje za najdôležitejší fytochemický marker.[103] Štúdie *in vivo* a *in vitro* preukázali významné terapeutické účinky gastrodínu v liečbe AD. Tieto účinky sú spojené so

zvýšenou expresiou ChAT a inhibíciou AChE. Iné štúdie odhalili, že extrakt zvyšuje α -sekretázou sprostredkované spracovanie APP, čo v konečnom dôsledku potvrdzuje jeho neuroprotektívne účinky.[98,103]



Obr. 6 Štruktúra gastrodínu

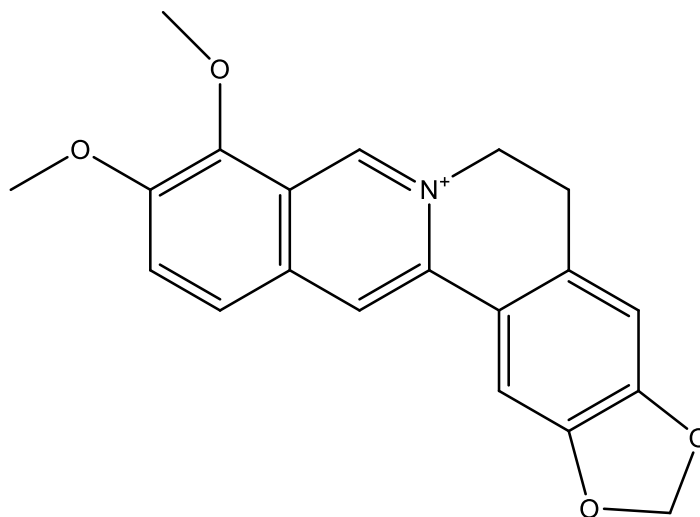
Kurkumín (Obr. 7) je fenolová zlúčenina extrahovaná z podzemku vytrvalej byliny *Curcuma longa* L., č. Zingiberaceae.[104] Jeho pozitívny vplyv v neuropatológii AD spočíva v prevencii oxidatívneho poškodenia vyvolaného $A\beta$ a zápalovými procesmi. Okrem toho reguluje aj ďalšie aspekty participujúce vo vzniku AD. Znižuje hladinu cholesterolu, reguluje mikrobiálnu aktivitu, inhibuje AChE a pôsobí antioxidantne.[105]



Obr. 7 Štruktúra kurkumínu

Zaujímavé výsledky prinieslo testovanie izochinolinového alkaloidu berberínu (Obr. 8), ktorý je izolovaný z koreňov čínskej byliny *Coptis chinensis* Franch., č. Ranunculaceae.[104] Jedná sa o žltý rastlinný alkaloid s horkou chuťou, ktorý sa v čínskej a ajurvédскеj medicíne

používa už najmenej 3000 rokov. Historicky sa berberín používal aj ako žlté farbivo kvôli svojej charakteristickej farbe. Ukázalo sa, že berberín zohráva neuroprotektívnu úlohu pri rôznych neurologických a neurodegeneratívnych poruchách. Nielenže obmedzuje patogenéziu extracelulárnych senilných plakov či intracelulárnych NFT, ale taktiež u neho pozorujeme inhibičnú aktivitu voči AChE, BuChE a monoaminoxidáze A a B.[106,107]



Obr. 8 Štruktúra berberínu

3.1.1.6.6. Potencionálne prístupy v terapii AD

V posledných desaťročiach nám rozsiahly výskum v oblasti molekulárneho a bunkového patomechanizmu AD poskytol významný pokrok v porozumení tejto choroby. Hlavným predmetom výskumu sú terapeutiká založené na schopnosti modulovať tvorbu A β a NFT, ktoré by sa v blízkej budúcnosti mohli stať vedúcou skupinou v terapii AD. V predklinických štúdiách bolo testovaných mnoho potenciálnych kandidátov, žiaľ mnohé z nich nepriniesli v klinických štúdiách sľubné výsledky. V nasledujúcich kapitolách sú zhrnuté súčasné ciele hodnotené z hľadiska terapeutického prínosu v terapii AD.[108]

Antiamyloidová terapia

V snahe znížiť cerebrálne hladiny A β , považujeme za najsľubnejšiu stratégiu liečby AD prevenciu mozgovej amyloidogenézy, a to inhibíciou patologickej A β oligomerizácie. Dimerizácia monomérneho A β je predpokladom tvorby agregátov, ktoré sú neurotoxické a ich sérové hladiny u pacientov s AD korelujú s klinickým prejavom daného ochorenia.[109,110]

β -Sekretáza je transmembránová aspartylproteáza, podieľajúca sa na primárnom štiepení APP za sAPP β a membránovo viazaného CTF β , čo v konečnom dôsledku vedie

k vzniku A β . Ukázalo sa, že β -sekretáza má mnoho ďalších substrátov. Jedným z prvých identifikovateľných a pomenovaných bol neuregulín, ktorého spracovanie pomocou tohto enzýmu je potrebné k regulácii axónovej myelinizácii v CNS. Po sérii klinických štúdií I. fázy preukázajúcich bezpečnosť, znášateľnosť a účinnosť v znižovaní hladín A β , pokročili inhibítory β -sekretázy do II. a III. fázy. Žiaľ momentálne nie sú k dispozícii žiadne výsledky, ktoré by podporovali ich benefit.[110]

γ -Sekretáza je významným terapeutickým cieľom v liečbe AD, pretože sa významnou mierou podieľa v regulácii posledného kroku za vzniku A β . Štúdie u zvierat signalizujú, že inhibítory γ -sekretázy, ktoré boli podané orálnou alebo parenterálnou cestou sú reálne schopné znížiť cerebrálnu hladinu A β . Semagacestat je inhibítor γ -sekretázy, ktorý postúpil do III. fázy klinického hodnotenia. Avšak štúdia nebola dokončená, pretože predbežná analýza ukázala, že liečba semagacestatom nebola účinná a dokonca viedla k zhoršeniu kognitívnych funkcií. U pacientov, ktorí podstúpili liečbu semagacestatom pozorovali aj významné gastrointestinálne nežiaduce účinky, infekcie a nemelanómové rakoviny kože. Zmeny oproti východiskovým laboratórnym hodnotám, ktoré boli spojené s podávaním semagacestatu, zahŕňali zníženie hladín IgG a IgA. Tieto neuspokojivé výsledky si vyžadovali dôkladnejšiu analýzu. Jednou z možných príčin zlyhania terapie je práve interferencia inhibítorov γ -sekretázy s transmembránovým receptorom Notch, ktorý je podľa všetkého zodpovedný za vyššie spomínané nežiaduce účinky. Medzi ďalšie skúmané inhibítory γ -sekretázy zaradujeme begacestat a avagacestat, ktoré sú momentálne v II. fáze klinického hodnotenia.[111,112]

Blokátory agregácie A β

Tramiprosat je glykosaminoglykan viažuci sa na monoméry A β a tým zabraňuje jeho následnej oligomerizácii a agregácii. Podávanie tramiprostatu viedlo k výraznému zlepšeniu kognitívnych funkcií.[108]

ELND005 je ďalšou zlúčeninou s antioligomerizačnými vlastnosťami. Táto látka účinne znížila pokles A β a zvrátila kognitívny deficit u transgénnych myši.[108]

Kolostrinín je peptid bohatý na prolín a pôvodne bol izolovaný z ovčieho mlieka. Proteínový komplex má silné imunoregulačné vlastnosti. Experimentálne štúdie naznačujú, že kolostrinín výrazne inhibuje agregáciu A β a rozpúšťa už vopred vytvorené fibrily.[108]

Gelsolin je proteín viažuci aktín a zároveň kľúčovým regulátorom aktínových vlákien. Vnútro bunkový gelsolin je prítomný v cytozole a mitochondriách, extracelulárny v plazme

a mozgovomiechovom moku. Štúdie potvrdili jeho schopnosť viazať sa na A β a blokovať jeho následnú agregáciu.[108]

Imunoterapia zameraná proti A β

Vakcinácia je ďalším potencionálne sľubným prístupom umožňujúcim predchádzať tvorbe a hromadeniu senilných plakov. AN1792 bola prvá aktívna vakcína testovaná na ľudských pacientoch. Avšak u 6 % z nich sa postupne vyvinula meningoencefalitída a preto štúdie nemohli naďalej pokračovať. Počiatočné výsledky boli odrádzajúce a nepreukázali významné rozdiely v kognitívnych funkciách. Až neskôr sa ukázalo, že približne 60 % pacientov si postupne vytvorilo príslušné protilátky.[108]

Bapineuzumab je monoklonárna protilátka 3D6 namierená proti A β . Druhá fáza klinického hodnotenia nepreukázala žiadne klinicky významné výsledky. Problémom pri podávaní bapineuzumabu bol výskyt parenchymálneho vazogénneho edému. Na základe týchto výsledkov sa zastavil jeho klinický výzkum a vo výzume pokračuje jeho nová forma AAB- 003.[113]

Solanezumab bola druhou monoklonárnou protilátkou, ktorá vstúpila do klinického hodnotenia. Táto látka sa viaže na monoméry rozpustný A β , čím znižuje jeho patológiu.[113]

Ďalšou sľubnou protilátkou je gantenerumab, ktorý prednostne interaguje s agregovaným A β a zároveň neovplyvňuje jeho hladiny v plazme. Momentálne prebieha jeho tretia fáza klinického výzkumu.[108]

Inhibítory prolyloligopeptidázy

Prolyloligopeptidáza (POP) je enzým zo skupiny serínových proteáz, kam okrem iného radíme aj dipeptidylpeptidázu IV (DPP-IV) a oligopeptidázu B. DPP IV zohráva dôležitú úlohu v regulácii absorpcie glukózy a metabolizme degradácie inkretínov (GLP-1 a GIP). Inhibítory DPP IV teda zvyšujú sekréciu inzulínu a predlžujú polčas rozpadu GLP-1 a GIP. POP je exprimovaná hlavne v mozgu a prvýkrát bola spomenutá v súvislosti s inaktiváciou oxytocínu v maternici. Tento enzým hydrolyzuje peptidy obsahujúce prolyl na C-konci prolínových zvyškov. Substráty enzymatického štiepenia POP sú vo väčšine prípadov významnými modulátormi kognitívnych funkcií. Aj keď ich štiepenie pomocou POP považujeme za proces fyziologický, môže urýchliť priebeh starnutia, alebo navodiť proces vedúci k neurodegenerácii.[114]

Posledné štúdiá poukazujú na jej význam v terapii schizofrénie, bipolárnej afektívnej poruchy a porúch kognitívnych, napríklad tých, ktoré sa vyskytujú pri AD, a to najmä z dôvodu jej účasti na metabolizme inositol-1,4,5-trifosfátu (IP₃), ktorý je kľúčovou molekulou v transdukčnej kaskáde neuropeptidovej signalizácie. Neuropeptidy indukujú a zvyšujú hladiny IP₃ väzbou na svoj receptor v membráne endoplazmatického retikula a následnou indukciou uvoľňujú Ca²⁺, o ktorom sa predpokladá, že hrá rozhodujúcu úlohu v učení a pamäti.[115]

Potencionálne vlastnosti inhibítorov POP v oblasti zlepšenia kognitívnych funkcií upútali záujem farmaceutických firiem a bolo študovaných niekoľko látok. Avšak doteraz postúpila iba látka S 17092, a to do prvej fázy klinického hodnotenia. Aj cez zaujímavé výsledky v tejto klinickej fáze, jej ďalší vývoj literatúra už neuvádza.[116]

Inhibítory GSK-3β

GSK-3β je hlavným kinázovým fosforylačným enzýmom podieľajúcim sa na fosforylácii τ-proteínu. Tideglusib je irreverzibilný inhibítor tohoto enzýmu. Ukázalo sa, že denné podávanie tideglusibu transgénnym myšiam v dávke 200 mg/kg počas troch mesiacov viedlo k zlepšeniu kognitívneho a behaviorálneho deficitu, výraznému poklesu fosforylácie τ či zabráneniu tvorbe a ukladaniu Aβ. Okrem iného vykazoval protizápalové a neuroprotektívne účinky *in vivo*. Záverom možno povedať, že tideglusib je všeobecne dobre tolerovaná látka, vykazujúca prvé náznaky potenciálnej terapeutickkej účinnosti u pacientov s miernou až stredne závažnou formou AD.[117]

3.2. *Vinca minor* L. (Apocyanaceae)

3.2.1. Všeobecná charakteristika

Slovenský názov: Zimozeleň menšia

Synonymá: *Vinca humilis* Salisb., *Vinca intermedia* Tausch, *Vinca ellipticifolia* Stokes, *Vinca acutiflora* Bertol., *Perivinca minor* Scop. [118]

Tab. 1 Taxonomické zaradenie *Vinca minor* L.

Ríša	Plantae
Oddelenie	Magnoliophyta
Rad	Gentianales
Čeľad'	Apocyanaceae
Rod	<i>Vinca</i>
Druh	<i>Vinca minor</i> L.

Vzorec čeľade Apocyanaceae: ♀ * K(5) [C(5-4) A5]G(2)

Rastlinu *Vinca minor* L., radíme do čeľade Apocyanaceae. Čeľad' má približne 4600 druhov rastlín rozdelených do 424 rodov. Členovia tejto rodiny sú distribuovaní predovšetkým v tropických a subtropických oblastiach a väčšina z nich je jedovatá. Mnohé z nich sa pestujú ako okrasné rastliny. Apocyanaceae patrí do radu Gentianales, kam okrem iného zaradzujeme aj Gelseminaceae, Gentianaceae, Loganiaceae a Rubiaceae. Mnohé z nich sú bohaté na zdroj významných chemických zlúčenín, iné poskytujú tvrdé drevo a iba niektoré rôzne druhy ovocia.[119] Rod *Vinca* L. je pôvodom z Európy, severozápadnej Afriky a juhozápadnej Ázie. Celkovo zahŕňa 8 druhov a poddruhov rastlín medzi ktoré radíme *V. difformis* Pouret, *V. erecta* Regel & Schmalh, *V. pubescens* d'Urv., *V. herbacea* Waldst. & Kit., *V. major* L., *V. minor* L., *V. Soneri* a *V. ispartensis* Koyuncu & Eksi.[120,121] Monoterpenoidné indolové alkaloidy tvoria najväčšiu a najheterogénnejšiu skupinu sekundárnych metabolitov a sú široko distribuované vrámci celého rodu.[122] Ich biosyntéza vychádza z tryptofánu a iridoidného terpénu sekolaganínu, ktorý je sám o sebe prírodným produktom a jeho biosyntetická dráha doposiaľ nebola úplne objasnená. Striktosidín je ich výsledným kondenzačným produktom a zároveň predlohou zlúčeninou v ďalších postupoch biosyntézy.[123] Pre rod *Vinca* L. sú charakteristické nasledujúce skupiny indolových alkaloidov: sarpaginové, akuamminové, eburnaminové, ajmalinové a oxindolové.[124]

3.2.2. Botanická charakteristika

Zimozeleň menšia je vytrvalá polokrovitá pri bázi drevnatejúca bylinná rastlina rastúca do výšky 15–20 cm. Podzemok je dlhý, plazivý a zakoreňujúci. Má málo stopkaté, protistojné, kožovité, kopijovité až elipsovité, na líci lesklé a rube svetlejšie listy. Kvety sú obojpohlavné, dlho stopkaté, vyrastajúce jednotlivo v pazuchách listov na vztýčených výhonkoch. Kolorit modrý až modrofialový. Plodom je mechúrik. Zimozeleň je myrmekochorná, kedy šírenie semien zabezpečujú mravce. Rozmnožuje sa hlavne vegetatívne pomocou výhonkov. Kvitne v období od marca do júla.[7,125,126]

Táto rastlina pochádza zo severného Španielska, strednej a južnej Európy, západného Francúzska a Kaukazu. U nás je jediným voľne žijúcim zástupcom čeľade Apocyanaceae vyskytujúcim sa predovšetkým na Morave a vo východných a severných Čechách. Rastie roztrúsene na polotienistých až tienistých miestach, listnatých a zmiešaných lesoch. Preferuje vlhké a málo kyslé pôdy, bohaté na živiny.[8,127]



Obr. 9 Rastlina *Vinca minor* L.

3.2.3. Použitie v ľudovom liečiteľstve

Kedysi sa s veľkou obľubou využívala v ľudovom liečiteľstve. Zbierala sa jej kvitnúca vňať, *Herba vincae*, z ktorej sa v súčasnosti izolujú jednotlivé alkaloidy. Zber vňate prebiehal v letnom období a sušil v čo najkratšom čase pri teplote do 45 °C. Okrem spomínaných

alkaloidov obsahuje saponiny, triesloviny, pektin a deriváty kyseliny ursolovej a flavonovej. Starovekí lekári ju ordinovali pri hnačkách úplavnicového charakteru a na bolesť zubov odporúčali prežúvanie jej stoniek a listov. V Číne sa využívala pre svoje adstringentné, diuretické a antitusické účinky a v Indii sa jej šťava z listov využívala k ošetrovaniu osieho bodnutia. K terapii krvácajúcich stavov sa podávala vo forme odvaru, podávaného v pomere 1 čajová lyžička vňati na 2,50 – 3,00 dcl vody. Vzhľadom k toxicite jej alkaloidov, považujeme drogu za jedovatú.[125,128,129]

3.2.4. Obsahové látky *Vinca minor* L.

Z *V. minor* L. sa doposiaľ podarilo izolovať viac než 50 indolových alkaloidov.[8] V sušenej droge sa ich obsah pohybuje v rozmedzí od 0,15 – 0,68 %.[130] (+)-Vinkamin je najdôležitejším alkaloidom izolovaným z listov *V. minor* L. a jeho kvantitatívne zastúpenie v droge tvorí 25 – 65 %. Má významný vplyv na cerebrovaskulárny systém a potvrdené neuroprotektívne účinky.[8,130] Kyseliny ursolová, β -sitosterol, flavonoidy a fenolové zlúčeniny (vinkosid, kvercetin, robinin, kaempferol, 2,3-dihydroxybenzoová kyselina) sú ďalšie zo zlúčenín izolovaných z tejto rastliny.[130]

3.2.4.1. Alkaloidy rodu *Vinca* L.

Alkaloidy nájdené v rastlinách z rodu *Vinca* L., patria medzi tzv. *Vinca* alkaloidy. Objav *Vinca* alkaloidov, vinblastinu a vinkristinu, pôvodne izolovaných z *Catharantus roseus* (L.) G. Don tiež známej ako *Vinca rosea* L. bol významným medzníkom vo vývoji nových liekov na prírodnej báze. Po ich objavení v 50. rokoch 20. storočia sa *Vinca* alkaloidy stali prvými prírodnými protirakovinovými látkami, ktoré sa v terapii začali uplatňovať. Žiaľ z rastliny nebolo možné izolovať potrebné množstvo týchto látok, pretože k získaniu 1 g vinblastinu, bolo potrebných približne pol tony suchých listov a preto sa hľadali možnosti ako tieto látky pripraviť synteticky. Okrem toho je známe, že bisindolová povaha týchto alkaloidov priniesla zistenie, že bisindoly sú oveľa aktívnejšie než sa na prvý pohľad mohlo zdať. V dôsledku toho tieto látky hlboko stimulovali vyhľadávanie a vývoj nových liekov založených na prírodných látkach alkaloidovej povahy.[131,132]

Rod *Vinca* zahŕňa širokú skupinu rastlín, ktoré sú bohaté na indolové alkaloidy rôznych štruktúrnych vzorcov, z ktorých mnohé majú značnú terapeutickú hodnotu. Jednotlivé druhy sa líšia spektrom a množstvom jednotlivých alkaloidov.[133] Ako už bolo vyššie uvádzané pre rod *Vinca* sú charakteristické nasledujúce skupiny indolových alkaloidov:

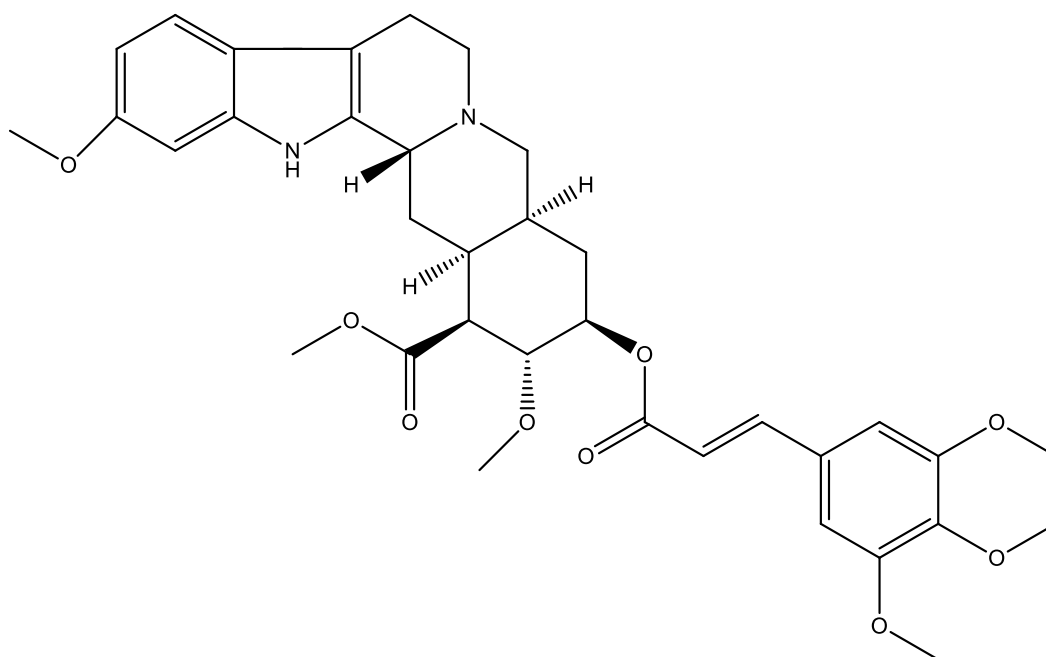
- typ sarpaginový
- typ ajmalinový
- typ akuamminový
- typ eburnaminový
- typ oxindolový

Sarpaginové alkaloidy

Alkaloidy spojené so sarpaginom sú významnými predstaviteľmi čeľade Apocyanaceae, a to predovšetkým rody *Rauwolfia* a *Alstonia*. Svoje uplatnenie našli v ľudovom liečiteľstve pre svoje protirakovinové, antibakteriálne, protizápalové a antimalarické účinky. Sarpaginové alkaloidy sú svojou štruktúrou podobné ajmalinovým.[134]

Tab. 2 Príklady sarpaginových alkaloidov u niektorých druhov rodu *Vinca*

Názov alkaloidu	Výskyt	Literatúra
isovallesiachotamin	<i>V. minor</i>	[6]
vallesiachotamin	<i>V. minor</i>	[6]
vinkoridin	<i>V. minor</i>	[135]
1-norvinkorin	<i>V. minor</i>	[136]
vinkorin	<i>V. minor</i>	[137]
(-)-reserpin	<i>V. minor, V. major</i>	[138,139]
reserpinin	<i>V. minor, V. major</i>	[138,140]
tombozin	<i>V. erecta</i>	[141]
6-hydroxytombozin (ervincidin)	<i>V. erecta</i>	[141]
O-benzoyltombozin	<i>V. erecta</i>	[141]
akuammidin	<i>V. erecta</i>	[141]



Obr. 10 Štruktúra reserpininu

Ajmalinové alkaloidy

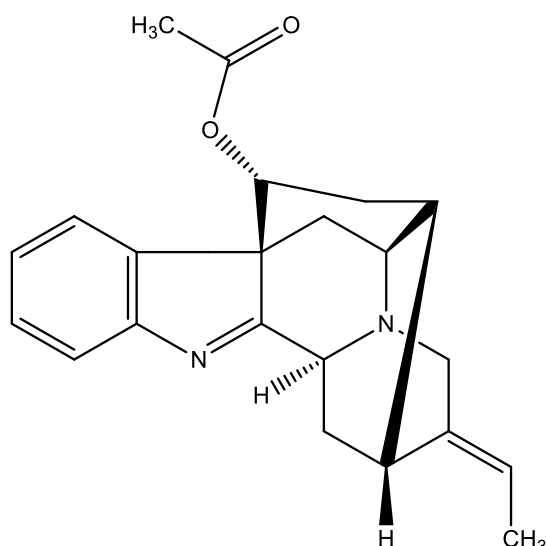
Ajmalinové alkaloidy obsahujú polycyklický ajmalinový kruhový systém. Jedná sa o alkaloidy čeľade Apocyanaceae a najviac rozšírené sú v nasledujúcich rodoch; *Alstonia*, *Aspidosperma*, *Melodinus*, *Cabucala*, *Vinca*. Z nich je zďaleka najdôležitejším rod *Rauwolfia*. [142] Hlavným predstaviteľom tejto skupiny je klinicky veľmi dôležitý indolový alkaloid ajmalin, izolovaný z koreňa rastliny *Rauwolfia serpentina* Benth. [142,143]

Tab. 3 Príklady ajmalinových alkaloidov u niektorých druhov rodu *Vinca*

Názov alkaloidu	Výskyt	Literatúra
(-)-vinorin	<i>V. minor</i>	[142]
10-methoxytetraphyllicin	<i>V. major</i> , <i>V. elegantissima</i> var. <i>V. major</i>	[142]
(+)-10-methoxyvinorin	<i>V. erecta</i> , <i>V. major</i>	[142]
(-)-majoridin (majdinin)	<i>V. erecta</i> , <i>V. major</i> , <i>V. pubescens</i>	[142]
majorinin	<i>V. major</i>	[142]
(+)-quebrachidin	<i>V. libanotica</i> , <i>V. erecta</i>	[141,142]

Tab. 3 Príklady ajmalinových alkaloidov u niektorých druhov rodu *Vinca* (pokračovanie)

Názov alkaloidu	Výskyt	Literatúra
(-)-vinkamajin	<i>V. difformis</i> , <i>V. major</i> , <i>V. herbacea</i> , <i>V. libanotica</i> , <i>V. minor</i> , <i>V. erecta</i>	[138,139,141,142]
17-epivinkamajinin (vinkamajinin)	<i>V. major</i>	[142]
(+)-vinkarin	<i>V. erecta</i> , <i>V. herbacea</i> , <i>V. major</i>	[142]



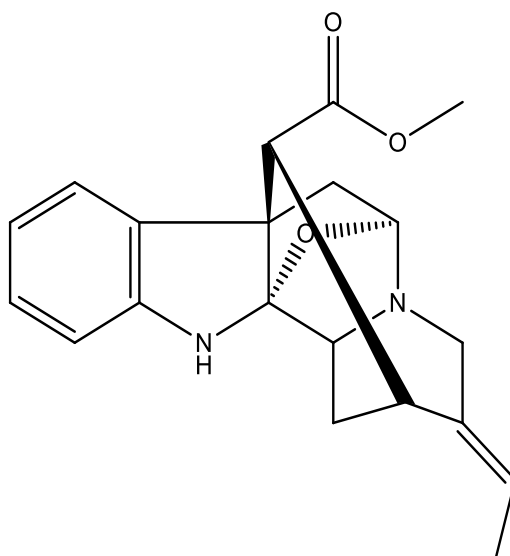
Obr. 11 Štruktúra vinorinu

Akuamminové alkaloidy

Akuammin, v literatúre uvádzaný aj ako vinkamajoridin, bol pôvodne izolovaný zo semien stromu *Picralima nitida* Stapf., č. Apocyanaceae. Ukázalo sa, že zvyšuje hypertenzívne účinky adrenalínu, hoci pri samostatnom podaní vykazuje účinky hypotenzívne. Okrem toho má výrazné lokálne anestetické účinky, zrovnateľné s kokaínom. Niektorí vedci sa dokonca domnievajú, že práve akuamin je zodpovedný za antilipázovú aktivitu extraktu *Vinca minor* L.[144,145]

Tab. 4 Príklady akuamminových alkaloidov u niektorých druhov rodu *Vinca*

Názov alkaloidu	Výskyt	Literatúra
akuammin	<i>V. major</i>	[140]
pikrinin	<i>V. minor</i> , <i>V. herbacea</i>	[146]
(+)-striktamin (vinkamidin)	<i>V. minor</i>	[147]



Obr. 12 Štruktúra (-)-pikrininu

Eburnaminové alkaloidy

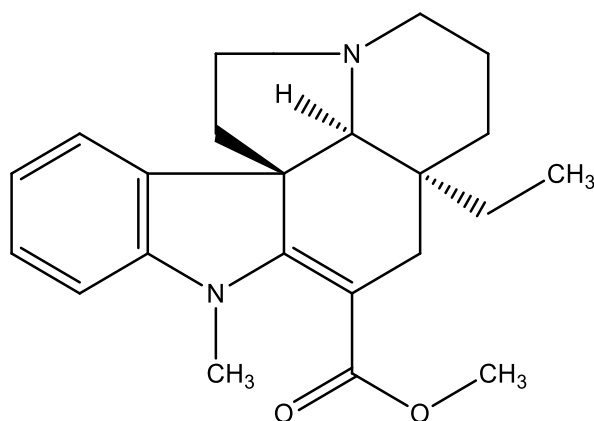
Alkaloidy tejto skupiny patrí medzi indolové alkaloidy s pentacyklickou štruktúrou rovnakej konštitúcie, niekedy tiež nazývanej vinkan a eburnan. Obe kostry vyskytujúce sa v rôznych prírodných látkach však nie sú identické, ale enantiomérne. [148]

Tab. 5 Príklady eburnaminových alkaloidov u niektorých druhov rodu *Vinca*

Názov alkaloidu	Výskyt	Literatúra
(+)-vinkamin	<i>V. minor</i>	[138]
apovinkamin	<i>V. minor</i>	[149]
(+)-eburnamonin	<i>V. minor</i>	[149]
11-methoxyeburnamonin	<i>V. minor</i>	[148]
11,12-dimethoxyeburnamonin	<i>V. minor</i>	[148]
minovin	<i>V. minor</i>	[6]
vincaminoridin	<i>V. minor</i>	[135]

Tab. 5 Príklady eburnaminových alkaloidov u niektorých druhov rodu *Vinca* (pokračovanie)

Názov alkaloidu	Výskyt	Literatúra
(±)-vinkadiformin	<i>V. minor</i>	[150]
minovincin	<i>V. minor</i>	[150]
minovincinin	<i>V. minor</i>	[150]
9-methoxyvinkamin	<i>V. minor</i>	[150]
16-methoxyvinkadiformin	<i>V. minor</i>	[151]
vinkaminin	<i>V. minor</i>	[152]
vinkaminorein	<i>V. minor</i>	[152]
vinkaminorin	<i>V. minor</i>	[152]
vincetin	<i>V. minor</i>	[152]
vincinin	<i>V. minor</i>	[152]
vincin	<i>V. minor</i>	[152]
(-)-eburnamine	<i>V. minor</i>	[152]
isovinkamin	<i>V. minor</i>	[152]
epivinkamin	<i>V. minor</i>	[152]



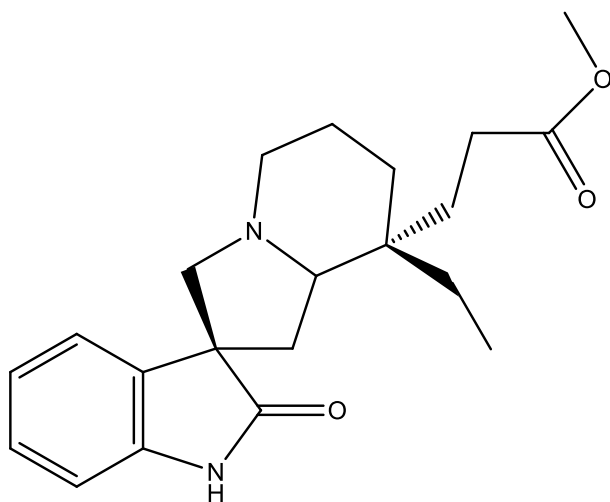
Obr. 13 Štruktúra (-)-minovinu

Oxindolové alkaloidy

Oxindolové deriváty sú charakteristické prítomnosťou heterocyklického systému spiro[pyrolidín-7,7'-oxindolu] a štruktúrnou podobnosťou s alkaloidmi z heteroyohimbanovej skupiny. Ich typické chemické vlastnosti a časté obmeny molekuly vychádzajú z vysokej reaktivity substituentu na C₇. Tieto bázy sú štruktúrne analógy karapanaubínu a líšia sa polohami a konfiguráciami na C₃, C₁₅, C₁₉ a C₂₀. Výnimku tvorí alkaloid vinkatín, ktorý ako jediný obsahuje heterocyklický skelet aspidospermidínu.[153]

Tab. 6 Príklady oxindolových alkaloidov u niektorých druhov rodu *Vinca*

Názov alkaloidu	Vybraný druh <i>Vinca</i>	Literatúra
vinerin	<i>V. erecta</i> , <i>V. minor</i>	[138,153]
(+)-vinkatín	<i>V. minor</i>	[153]
<i>N</i> -acetylvinerin	<i>V. erecta</i>	[153]
vineridín	<i>V. erecta</i> , <i>V. minor</i>	[138,153]
majdín	<i>V. major</i> , <i>V. herbacea</i> , <i>V. erecta</i> , <i>V. pubescens</i> , <i>V. elegantissima</i> var. <i>V. major</i> , <i>V. minor</i>	[138,140,153]
isomajdín	<i>V. major</i> , <i>V. pubescens</i> , <i>V.</i> <i>herbacea</i> , <i>V. elegantissima</i> var. <i>V. major</i>	[153]
herboxín	<i>V. herbacea</i> , <i>V. elegantissima</i> var. <i>V. major</i>	[153]
herbalín	<i>V. herbacea</i>	[153]
vinín	<i>V. major</i>	[139]



Obr. 14 Štruktúra (+)-vinkatinu

3.2.4.2. Obsahové látky *Vinca minor* L. a ich biologická aktivita

Stručný prehľad biologických aktivít jednotlivých alkaloidov izolovaných z *V. minor* je uvedený v nasledujúcej tabuľke.

Tab. 7 Obsahové látky *Vinca minor* L. a ich biologická aktivita

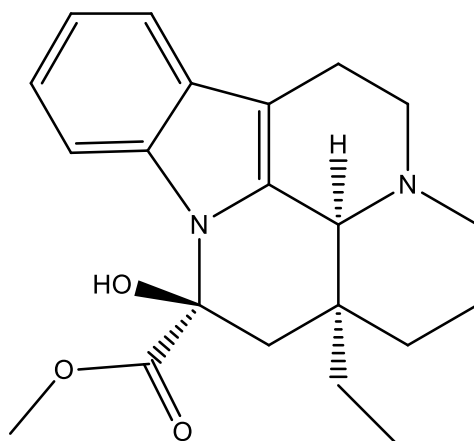
Názov alkaloidu	Biologická aktivita	Literatúra
(+)-striktamin (vinkamidin)	Antibakteriálny účinok proti <i>Enterococcus faecalis</i> .	[154]
(-)-vinkarubin	Cytotoxický účinok namierený proti bunkám leukémie P388.	[8]
(+)-vinkaminorin	Cytotoxický účinok namierený proti bunkám leukémie P388.	[8]
(+)-vinkaminorein	Cytotoxický účinok namierený proti bunkám leukémie P388.	[8]
(-)-pikrinin	Antitusické a antiastmatické účinky. Inhibícia Na ⁺ /glukózového kotransportu zapojeného do reabsorpcie glukózy v obličkách.	[146]

Tabuľka 7 Obsahové látky *Vinca minor* L. a ich biologická aktivita (pokračovanie)

Názov alkaloidu	Biologická aktivita	Literatúra
(+)-vinkamin	Pozitívne modulačné účinky v metabolizme CNS a neuronálnej homeostázy, antihypoxické a neuroprotektívne účinky, zlepšenie prietoku krvi v mozgu, spotreby kyslíka a využitie glukózy. Sedatívne a hypotenzívne účinky.	[8,155]
reserpinin	Antipsychotické a antihypertenzívne účinky.	[155]
(-)-reserpin	Antihypertenzívne účinky súvisiace s jeho schopnosťou vyčerpať katecholamíny z periférnych sympatických nervových zakončení. Sedatívne a cytotoxické účinky.	[156]
(-)-vinkadiformin	Antiplazmodiálna aktivita <i>in vitro</i> cytotoxický účinok.	[157]
(-)-akuammicin	Plný agonista κ -opioidných receptorov.	[158]
majdin	Indukcia apoptózy, antioxidantný a chelatačný účinok <i>in vitro</i> .	[159]
(+)-eburnamenin	Vazodilatačné účinky (v porovnaní s vinkaminom výraznejšie).	[156]
vallesiachotamin	<i>In vitro</i> cytotoxické účinky voči ľudským melanómovým bunkám pri koncentrácii 50 μ M.	[160]
apovinkamin	Neuroprotektívny, antioxidantný a antiischemický účinok.	[161]
vinorin	Cytotoxický účinok v koncentrácii 50–100 μ M. Regenerácia a senzibilizácia sedacieho nervu u potkanov po podaní injekcie v dávke 15–30 mg/kg.	[162]

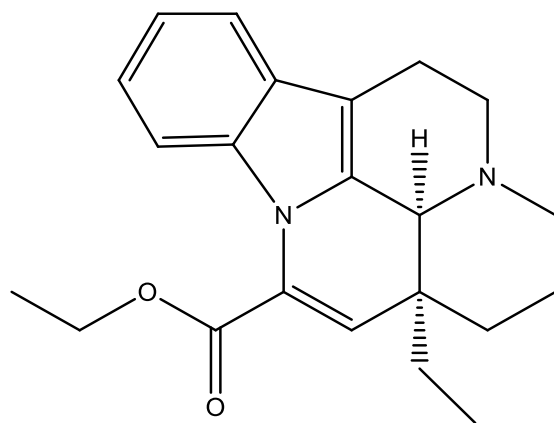
Vinkamin je zástupca eburnaminových derivátov. Štúdie preukázali jeho priaznivý vplyv na obehový systém, ktorý spočíva v znížení arteriálneho krvného tlaku, srdcového výdaja a srdcovej frekvencie. K jeho neuroprotektívnym účinkom, prispela skutočnosť, že vinkamin a jeho polosyntetické deriváty (vinpocetin a vinkanol) blokujú napätovo riadené sodíkové kanály.[163,164] Laboratórne testy u zvierat, presnejšie u potkanov zistili, že po opakovanom dennom podávaní toxického $AlCl_3$ došlo k zvýšeniu oxidačného stresu, zvýšeným hladinám

oxidu dusnatého, prostaglandínu E2 a narušení centrálnej cholinergnej neurotransmisie spojenej s abnormálnou aktivitou AChE. Po podaní vinkamínu v dávke 10 – 20 mg/kg došlo k ovplyvneniu týchto nepriaznivých účinkov. Vyššie zvolené dávky naopak vykazovali prooxidačné a protizápalové vlastnosti.[165]



Obr. 15 Štruktúra vinkamínu

Vinpocetin je syntetický etylester apovinkamínu, prvýkrát syntetizovaný koncom 60. rokov minulého storočia.[166] V súčasnosti je známy pod obchodným názvom Cavinton® a jeho terapeutická indikácia spočíva v liečbe cerebrovaskulárnych porúch, kam radíme vaskulárnu demenciu a ischemickú hypoperfúziu.[167] Zdá sa, že vinpocetín vykazuje niekoľko pozitívnych farmakologických a biochemických účinkov, zahrňujúce vazodilatáciu mozgu, zvýšenie tolerancie mozgového tkaniva voči hypoxickým a ischemickým útokom, antikonvulzívny a inhibičný účinok na PDE či dokonca zlepšenie hematologických tokových vlastností. Neuroprotektívne účinky vychádzajú z jeho schopnosti inhibovať napät'ovo riadené sodíkové kanály, čím účinne blokuje hromadenie sodíka v neurónoch, znižuje reperfúzne poškodenie a môže byť prospešný pri znižovaní toxického poškodenia vyvolaného účinkami oxidačného stresu v dôsledku anoxie.[9] Ďalším zo spomínaných účinkov je inhibícia kalmodulín dependentnej PDE, ktorá navodí zvýšenie intracelulárnych hladín cyklického guanozínmonofosfátu. Výsledný efekt spočíva v znížení agregácie trombocytov a zvýšení mikrocirkulácie mozgu.[166]



Obr. 16 Štruktúra vinpocetinu

4. Experimentálna časť

4.1. Materiál

4.1.1. Rozpúšťadlá a chemikálie

- acetón p. a. (CH_3COCH_3) (Ing. Švec-Penta, Praha)
- acetylthiocholín jodid $\geq 99\%$ (Sigma-Aldrich)
- amoniak vodný roztok p. a. (NH_3) (Ing. Švec-Penta, Praha)
- bajkalín 95% (Sigma-Aldrich)
- butyrylthiocholín jodid $\geq 99\%$ (Sigma-Aldrich)
- cyklohexán p. a. (CH_x) (Ing. Švec-Penta, Praha)
- dietylamin p. a. (Et_2NH) (Ing. Švec-Penta, Praha)
- dietyléter p. a. (Et_2O) (Lechner, CZ)
- dimetylsulfoxid $\geq 99,5\%$ (DMSO) (Sigma-Aldrich)
- 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoová kyselina $\geq 98\%$ (DTNB) (Sigma-Aldrich)
- etanol 95% (EtOH) (Lihovar Chrudim, CZ)
- etyl-acetát p. a. (EtOAc) (Ing. Švec-Penta, Praha)
- etyléndioxytetraoctová kyselina (EDTA) (Sigma-Aldrich)
- fyzostigmín $\geq 98\%$ (Sigma-Aldrich, CZ)
- galantamín hydrobromid $> 98\%$ (Changsha Oeganic Herb Inc., China)
- huperzín A 98% (Tai'an Zhonghui Plant Biochemical Co., Ltd., China)
- hydrát disodnej soli adenosín 5'-trifosfátu $\geq 99\%$ (ATP) (Sigma-Aldrich)
- chloroform p. a. (CHCl_3) (Ing. Švec-Penta, Praha)
- izopropanol p. a. (IPA) (Ing. Švec-Penta, Praha)
- kyselina chlorovodíková 35% (HCl) (Ing. Švec-Penta, Praha)
- kyselina mravčia p. a. (HCOOH) (Sigma-Aldrich)
- metanol p. a. (MeOH) (Ing. Švec-Penta, Praha)
- Z-Gly-Pro-p-nitroanilid $\geq 99\%$ (Sigma-Aldrich)
- octan amónny $\geq 98\%$ (Sigma-Aldrich)
- octan horečnatý tetrahydrát $\geq 98\%$ (Sigma-Aldrich)
- Z-Pro-prolinal $\geq 98\%$ (Sigma-Aldrich)
- prolyloligopeptidáza (Sigma-Aldrich)

- 4-(2-hydroxyethyl)piperazín-1-etansulfónová kyselina 95,5% (HEPES) (Sigma-Aldrich)
- tetrasodná soľ etylénglykol-bis(-aminoethyléter)-*N,N,N,N*-tetraoctovej kyseliny \geq 97% (EGTA) (Sigma-Aldrich)
- 3-[(3-chlór-4-hydroxyfenyl)amino]-4-(2-nitrofenyl)-1H-pyrol-2,5-dión \geq 98% (Sigma-Aldrich)

4.1.2. Pomocné materiály a roztoky

- kremelina Celite C 535 John's Manville (Sigma-Aldrich, CZ)
- kyselina sírová 2% (w/w) (Ing. Švec-Penta, Praha)
- silikagel perly (Ing. Švec-Penta, Praha)
- síran sodný bezvodý č. (Ing. Švec-Penta, Praha)
- uhličitan sodný 10% roztok (w/w)
- vata

4.1.3. Tlmivé roztoky

- 5mM fosfátový roztok o pH 7,4 obsahujúci 150 mM chloridu sodného
- 5mM fosfátový tlmivý roztok o pH 7,4
- 100mM fosfátový tlmivý roztok pH 7,4

4.1.4. Detekčné činidlá

D 1: Dragendorffovo činidlo

Roztok A bol pripravený rozpustením 1,7 g bázičného dusičnanu bismutitého a 20 g kyseliny vínnej v 80 ml vody.

Roztok B bol pripravený rozpustením 16 g jodidu draselného v 40 ml vody. Zásobný roztok vznikol zmiešaním roztoku A a B v objemovom pomere 1:1. Roztok použitý k detekcii bol pripravený pridaním 5 ml zásobného roztoku k roztoku 10 g kyseliny vínnej v 50 ml vody. Detekčný roztok bol štandardne uchovávaný v chladničke pri 4 °C.[168]

D 2: Mayerovo činidlo

Bol pripravený rozpustením 1,36 g chloridu ortuťnatého a 5 g jodidu draselného v 100 ml vody.[169]

4.1.5. Chromatografické adsorbenty

- *stĺpcová chromatografia*: silikagel (Fisher Scientific, CZ); Silikagel Fluka 0,063 – 0,200 mm deaktivovaný prídavkom 10 % vody
- *analytická TLC*: Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck, CZ), TLC dosky s rozmermi 20×20 cm
- *preparatívna TLC*: dosky nalievané s 0,2 cm vrstvou silikagelu; Kieselgel 60 GF₂₅₄ (Merck)

4.1.6. Prístrojové vybavenie

- polarimeter P3000 (A. Krüss Optronic, Germany)
- vákuová odparka Laborota 4000 efficient (Heidolph, Germany)
- ultrazvuková kúpeľ Sonorex Super 10P (Bandelin, Berlin, Germany)
- centrifuga Boeco U-32R (Boeco, Hamburg, Germany) vybavená rotorom Hettich 1611 (Hettich, Tuttlingen, Germany)
- reader SynergyTM HT Multi - Detection Microplate Reader (BioTek, USA)
- štatistický program GraphPad Prism 6.07 Windows (Graph PaD Software, San Diego, CA, USA) a GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Software Inc., CA, USA)
- spektrometer ESI-MS Thermo Finnigan LCQDuo (GenTech Scientific, Inc., New York, USA)
- spektrometer VNMR S500 (Varian, Palo Alto, California, USA)
- spektrometer Synapt G2Si (Waters, Manchester, UK)

4.2. Metódy

4.2.1. Všeobecné postupy

4.2.1.1. Príprava a čistenie rozpúšťadiel

Pred použitím boli všetky komerčne používané rozpúšťadlá prečistené destiláciou. Prvých 5 % destilátu sme odstránili (kvôli možnému znečisteniu vodou), pričom sme následne zvyšných asi 90 % rozpúšťadla vydestilovali a následne uchovali v tmavých stojatkách chránených pred svetlom.

4.2.1.2. Odparovanie rozpúšťadiel

Frakcie obsahujúce zvyškové rozpúšťadlá z kvapalinovej chromatografie či preparatívnej tenkovrstvej chromatografie boli odparené na rotačnej vakuovej odparke Laborota 4000 Heidolph pri zníženom tlaku vo vodnom kúpeli pri teplote 40 °C.

4.2.1.3. Sušenie a uchovávanie frakcií a izolovaných čistých látok

Získané frakcie pochádzajúce z chromatografických stĺpcov a izolované čisté látky boli umiestnené v exikátore nad silikagelom, kde sme po dobu minimálne 24 hodín získali suché produkty. V tejto podobe boli uchovávané v chladničke v teplotnom rozmedzí 2 – 8 °C.

4.2.2. Chromatografia

4.2.2.1. Detekcia alkaloidov

- **detekcia pomocou tenkovrstvej chromatografie (TLC):** TLC detekcia spočívala v zistení výskytu alkaloidov v samotných frakciách pochádzajúcich zo stĺpcovej chromatografie alebo čistoty izolovaných alkaloidov. K tomu bola použita detekcia v oblasti UV svetla (samotné dosky boli pozorované pod UV lampou pri vlnovej dĺžke 254 nm a 366 nm). Sledovala sa prítomnosť jednotlivých ohraničených škvŕn, ktoré boli následne označené a postriekané Dragendorffovým činidlom, ktorý slúžil ako detekčné činidlo.
- **detekcia alkaloidov z roztoku:** k príprave alkaloidných koncentrátov získaných opätovným vytrepávaním z vodnej fázy do organického rozpúšťadla bolo použité Mayerové činidlo, ktoré slúžilo k priebežnému monitorovaniu prítomnosti alkaloidov práve vo fáze vodnej.

4.2.2.2. Príprava sklenených dosiek pre preparatívnu TLC

Preparatívne TLC vrstvy boli pripravené naliatím suspenzie pozostávajúcej zo 6,5 g silikagelu Kieselgel 60 GF₂₅₄ (Merck, CZ) a približne 20 ml destilovanej vody na sklenené dosky (15×15 cm) vopred očistené a odmastené etanolom a chloroformom. Po rovnomernom rozprestrení po celej ploche dosky sa nechali sušiť po dobu 24 hodín.

4.2.2.3. Stĺpcová chromatografia

Stĺpcová chromatografia prebiehala stupňovitou elúciou. Chromatografický stĺpec bol pripravený naplnením suspenzie silikagelu v mobilnej fáze do kolóny.

4.2.2.4. Tenkovrstevná chromatografia

TLC prebiehala nanosením rovnomernej vrstvy sorbentu na sklenenú dosku alebo boli využité komerčne dostupné TLC chromatogramy. Dosky boli vyvíjané v sklenených komorách vopred nasýtených parami mobilnej fázy, ktorému predchádzalo nanosenie vzorkov na štart chromatogramu. Po dostatočnom vyvinutí chromatogramu boli škvŕny pozorované pod UV

lampou najčastejšie pri vlnovej dĺžke 254 nm. Škrvny analyzovaných látok sa pod UV svetlom sfarbili do zelena a preto bolo na mieste ich označiť ceruzkou. Vyvinutý chromatogram bol následne detekovaný postrekom pomocou Dragendorffového činidla. Nakoniec sme takto detekované zóny alkaloidov mohli vyizolovať.

4.2.3. Štruktúrna analýza

4.2.3.1. HRMS analýza

HRMS analýza prebiehala v systéme UHPLC Acquity triedy UPLC I (Waters, Millford, USA) spojeného s hmotnostným spektrometrom s vysokým rozlíšením (HRMS). K meraniu spektier slúžil Synapt G2Si (Waters, Manchester, UK). Chromatografia prebiehala na kolóne Acquity UPLC BEH C18 (2,1×50 mm, 1,7 μm) za použitia gradientovej elúcie s acetonitrilom a 0,1% kyseliny mravej pri prietoku 0,4 ml/min. Ionizácia elektrosprejom prebiehala v pozitívnom móde. Spektrá ESI boli zaznamenávané v rozmedzí 200 – 1200 m/z. Za štandard bol vybraný leucín-eukefalín a ku kalibrácii sa použil mravenčan sodný.

4.2.3.2. ESI/MS analýza

Za účelom získania Mr hodnôt bola ukutočnená analýza pomocou ionizácie elektrosprejom v kladnom móde na spektrometri LC/MS Thermo Finnigan LCQDuo. Alkaloidy pre ESI/MS analýzu boli nariadené na koncentráciu 0,2 mg/ml v methanole pre príslušnú MS analýzu. K analýze bola použitá metóda priameho nástreku.

4.2.3.3. NMR analýza

NMR spektrá boli namerané prístrojom spektrofotometer Varian VNMR S500 doc. PharmDr. Jiří Kunešom, Ph. D s frekvenciou 499,9 MHz pre ^1H a 125,7 MHz pre ^{13}C jadrá. Spektrá ^1H boli namerané v inverznej 5 mm ID PFG sonde a využitím štandardných pulzných frekvencií a ^{13}C v 5 mm SW širokopásmovej sonde. Experiment prebiehal pri teplote 25 °C v prostredí deuteriochloroformu. Hodnoty chemických posunov boli vyjadrené v jednotkách ppm.

4.2.3.4. Optická otáčavosť

Optická otáčavosť bola meraná v 10 cm kyvetách na príslušnom polarimetri P3000 (A. Krüss Optronic) pri 25 °C v prostredí chloroformu.

4.3. Izolácia alkaloidov

4.3.1. Rastlinný materiál

Jemne rezaná vňať *Vinca minor* L. (Apocyanaceae) komerčne dodaná od firmy Megafyt s.r.o, Vrané nad Vltavou, ktorej zber prebehol v roku 2013 (položka číslo 15607, šarže 11062013, laboratórny protokol I0195/13, kvalita V).

4.3.2. Príprava sumárneho extraktu a stĺpcová chromatografia chromoformového výtrepku CHCl₃-A

Predmetom mojej diplomovej práce bola izolácia alkaloidov z frakcie VM 323 – 327 o celkovej hmotnosti 12,93 g, ktorá bola získaná stĺpcovou chromatografiou alkaloidného extraktu *Vinca minor* L. Prípravu a prečistenie sumárneho alkaloidného extraktu, jeho následnú stĺpcovú chromatografiu a ich výsledky poskytli katedre farmaceutickej botaniky pán prof. RNDr. Ľubomír Opletal a pán Ing. Miroslav Ločárek.

4.3.3. Chromatografická separácia spojených frakcií VM 323 – 337

Prečistený alkaloidný koncentrát o hmotnosti 4,72 g bol podrobený separácií pomocou stĺpcovej chromatografie, a to obvyklým spôsobom. Kolóna bola naplnená stacionárnou fázou (silikagel Fluka, 473 g, zrnitosť 0,063 – 0,2 mm, deaktivovaný prídavkom 10 % vody). Príprava rozteru prebiehala rozpustením 4,72 g alkaloidného extraktu v chloroforme a následným zmiešaním s 10 g adsorbentu SiO₂ (pomer 2:1). Separácia alkaloidov prebiehala skokovitou elúciou za použitia mobilnej sústavy CHCl₃ + EtOH v rôznych pomeroch (Tab. 8). Mŕtvy objem kolóny bol 740 ml. Eluát bol odoberaný po 250 ml s rýchlosťou prietoku 500 ml/hod. Celkovo sa nám podarilo získať 81 podfrakcií, ktoré boli pomocou kontrolnej TLC (SiO₂ 60 F254, dráha 8,5 cm, CH_x + Et₂NH + IPA (85:10:5), komora nasýtená, vyvíjanie 1×, detekcia Dragendorffovým činidlom) rozdelené do 7 súhrných podfrakcií (Obr. 17).

Tab. 8 Stĺpcová chromatografia spojených frakcií VM 323 – 327¹

Číslo podfrakcie	Rozmedzie podfrakcie	Mobilná sústava	Hmotnosť podfrakcie (mg)
1	7 – 8	CHCl ₃ + EtOH (97,5:2,5)	7,3
2	11 – 14	CHCl ₃ + EtOH (97,5:2,5)	359
3	15 – 36	CHCl ₃ + EtOH (97,5:2,5) CHCl ₃ + EtOH (95:5)	684
4	37 – 47	CHCl ₃ + EtOH (95:5)	1196
5	48 – 53	CHCl ₃ + EtOH (95:5)	2079
6	54 – 59	CHCl ₃ + EtOH (95:5)	71
7	60 – 81	CHCl ₃ + EtOH (95:5) CHCl ₃ + EtOH (9:1)	142

¹ pozn. farebne označené tie, ktoré boli následne spracúvané



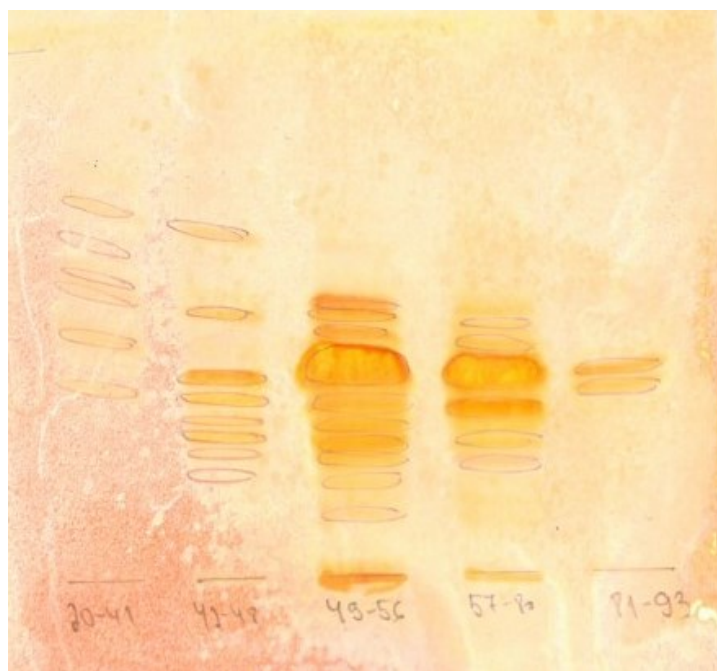
Obr. 17 Kontrolná TLC spojených podfrakcií zo sumárnej alkaloidnej frakcie VM 323 – 327

4.3.4. Izolácia jednotlivých alkaloidov

Predmetom ďalšieho smerovania experimentálnej práce bola izolácia alkaloidov z pridelenej spojenej frakcie 48 – 81 z kolóny. Vzhľadom k zisteniu, že predošlé delenie na kolóne neprebehlo podľa našich predstáv, bola táto spojená frakcia opäť separovaná pomocou stĺpcovej chromatografie na silikagelovom stĺpci (silikagel Fluka, 150 g, zrnitosť 0,063 – 0,2 mm, deaktivovaný prídavkom 10 % vody. Separácia alkaloidov prebiehala skokovitou elúciou za použitia mobilnej sústavy $\text{CHCl}_3 + \text{EtOH}$ v rôznych pomeroch. (Tab. 9) Celkovo bolo získaných 5 podfrakcií, ktoré boli následne monitorované na kontrolnej TLC (SiO_2 60 F254 Merck, $\text{CH}_x + \text{CH}_3\text{COCH}_3 + \text{NH}_3$ (30:20:0,1), komora nasýtená, vyvíjanie 2×, detekcia Dragendorffovým činidlom) (Obr. 18) V nasledujúcich kapitolách je uvedená izolácia jednotlivých alkaloidov z vybraných podfrakcií.

Tab. 9 Výsledky stĺpcovej chromatografie spojenej frakcie 48 – 81

Podfrakcia	Mobilná sústava	Hmotnosť (mg)
20 – 41	$\text{CHCl}_3 + \text{EtOH}$ (95:5)	94,5
42 – 48	$\text{CHCl}_3 + \text{EtOH}$ (95:5)	411,5
49 – 56	$\text{CHCl}_3 + \text{EtOH}$ (95:5)	476,8
57 – 80	$\text{CHCl}_3 + \text{EtOH}$ (95:5)	368,1
81 – 93	$\text{CHCl}_3 + \text{EtOH}$ (95:5)	84,4



Obr. 18 Kontrolná TLC súhrného delenia podfrakcií frakcie 48 – 93 z kolóny

4.3.4.1. Spracovanie podfrakcie č. 81 – 93

Podfrakcia o celkovej hmotnosti 84,4 mg bola pomocou preparatívnej TLC rozdelená na 6 analytických doskách o rozmeroch 10×20 cm (adsorbent SiO₂ F254 , dráha 18 cm, počet vyvíjaní 3×) a mobilnou sústavou CH_x + CH₃COCH₃ + NH₃ (60:40:0,1) do 5 zón s nasledujúcimi retenčnými faktormi 0,70; 0,61; 0,55; 0,45 a 0,35. Po prevedení jednotlivých zón do vopred označených a vytáraných baniek a vyvakuovaní v exikátore, boli získané jednotlivé hmotnosti (81 – 93/1 = 7,1 mg, 81 – 93/2 = 5,9 mg, 81 – 93/3 = 5,4 mg, 81 – 93/4 = 14,4 mg a 81 – 93/5 = 16,7 mg).

K ďalšiemu postupu bola upriamená pozornosť na izoláciu látok zo zón 81 – 93/3 a 81 – 93/4. Vzorka 81 – 93/3 bola rozpustená v približne 20 ml 2% HCl. K rozpustenej zlúčenine bolo pridaných približne do 1/3 jej objemu 20 ml éteru. Po vytrepávaní bola vodná fáza (spodná vrstva) zalkalizovaná prídavkom 10% Na₂CO₃ (pH 9 – 10) a následne vytrepávaná 30 ml éteru. Na základe skúšky s Mayerovým činidlom sme zistili, že vo vodnej fáze boli aj naďalej prítomné alkaloidy. Éterové výtrepky boli spojené a po pridaní Na₂SO₄ následnej filtrácií a odparení na vakuovej odparke sa nám podarilo získať alkaloidový výtrepok, ktorý bol podrobený ďalšiemu spracovaniu. Rovnaký postup bol použitý aj pri vzorke 81 – 93/4.

Zo vzorky 81 – 93/4 bola preparatívnou TLC na 2 analytických doskách o rozmeroch 10×20 cm (adsorbent SiO₂ F254 , dráha 18 cm, počet vyvíjaní 3×) a mobilnou sústavou CH_x + EtOAc + MeOH + Et₂NH (45:45:5:5) vyizolovaná o celkovej hmotnosti 6,3 mg zlúčenina SP-2 (R_f 0,59).

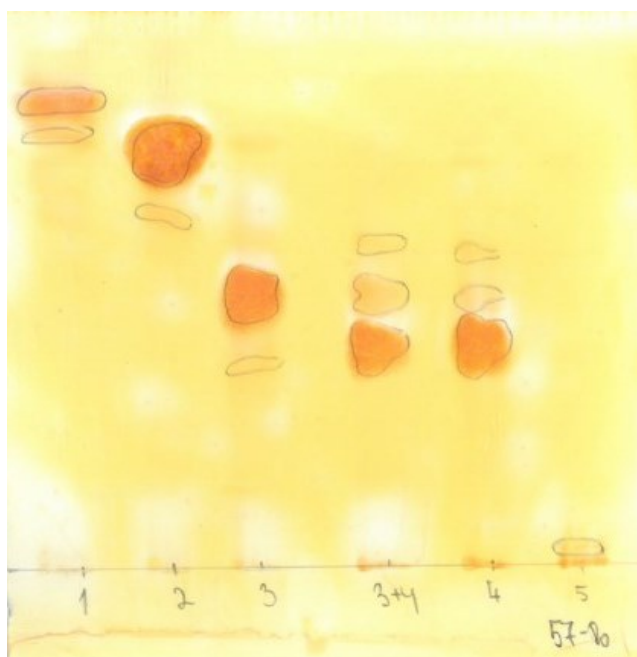
Zlúčenina SP-1 o výslednej hmotnosti 2,6 mg bola vyizolovaná za použitia 2 analytických dosiek o rozmeroch 10×20 cm (adsorbent SiO₂ F254 , dráha 18 cm, počet vyvíjaní 3×, mobilná sústava CH_x + CH₃COCH₃ + NH₃ v pomere 60:40:0,1).

4.3.4.2. Spracovanie podfrakcie č. 57 – 80

Podfrakcia o celkovej hmotnosti 368 mg bola nanosená v tenkej vrstve na 24 dosiek (adsorbent SiO₂ F254, rozmery 10×20 cm , dráha 18 cm, počet vyvíjaní 2×), ktoré boli vyvíjané v mobilnej sústave zloženej z CH_x + CH₃COCH₃ + NH₃ (30:60:1) (Obr. 19). Celkovo bolo získaných 5 hlavných zón s nasledujúcimi retenčnými faktormi 0,78; 0,58; 0,33; 0,19 a 0,04. Elúcia jednotlivých zón z adsorbentu bola uskutočnená malým prídavkom kremeliny a zmesou CHCl₃ + EtOH v pomere 1:1. Po prevedení jednotlivých zón do vopred označených a vytáraných

baniek a vyvakuovaní v exikátore, boli získané jednotlivé hmotnosti (57 – 80/1 = 9,9 mg, 57 – 80/2 = 190,5 mg, 57 – 80/3 = 22,8 mg, 57 – 80/4 = 18,5 mg a 57 – 80/5 = 8,2 mg).

Experimentálna práca bola ďalej zameraná na izoláciu látok zo zóny 57 – 80/3. Z 57 – 80/3 (22,8 mg) bola preparatívnou TLC na 3 analytických doskách o rozmeroch 10×20 cm (adsorbent SiO₂ F254 , dráha 18 cm, počet vyvíjaní 4×) a mobilnou sústavou CH_x + CH₃COCH₃ + NH₃ (50:50:1) vyizolovaná zlúčenina SP-3 (10,2 mg).



Obr. 19 Kontrolná TLC podfrakcií frakcie 57 – 80

4.4. Stanovenie cholinesterázovej inhibičnej aktivity Ellmanovou metódou

4.4.1. Príprava erytrocytárnej AChE a BuChE z plazmy

Enzýmy boli získané z čerstvo odobratej krvi (odobratej od zdravých dobrovoľníkov), ku ktorej boli pridané 2 ml 3,4% citrátu sodného (protizrážanlivé činidlo). Následne bola krv rovnomerne rozdelená do skúmaviek. Plazma ako zdroj BuChE bola odstránená z celej krvi centrifugáciou pri 4000 ot./min po dobu 10 minút a teplote 4 °C. Do doby stanovenia aktivity BuChE bola uchovávaná v chladničke pri teplote 4 °C. Z usadených erytrocytov boli odsaté zbytky plazmy. Erytrocyty boli následne prenesené do 50 ml skúmavky kde boli trikrát premyté 5 mM fosfátovým tlmivým roztokom o pH 7,4 (obsahujúcom chlorid sodný) a to opäť metódou centrifugácie. K takto premytým erytrocytom bol pridaný 5 mM fosfátový tlmivý roztok o pH

7,4 v pomere 1:9 (erytrocyty: tlmivý roztok). Táto úprava viedla po dobu 10 minút k spontánnej hemolýze a po jej ukončení sa stanovila výsledna aktivita vzniknutého hemolyzátu, ktorý bol do doby stanovenia uchovávaný pri teplote -22 °C.

4.4.2. Stanovenie cholinesterázovej inhibičnej aktivity

Meranie inhibičných aktivít bolo realizované prof. RNDr. Lubomírom Opletalom, CSc. na katedre farmaceutickej botaniky a to podľa nasledujúceho postupu. Všetky izolované alkaloidy boli podrobené testovaniu voči cholinesterázovej inhibičnej aktivite pomocou modifikovanej Ellmanovej spektrofotometrickej metódy s použitím DTNB.[170] K stanoveniu inhibičnej aktivity enzýmov bolo do jamiek umiestených na mikrotitračnej doštičke napipetovaných 8,3 µl plazmy (zdroj BuChE) alebo hemolyzátu (zdroj AChE). Následne sa pridalo 283 µl 5 mM DNTB a 8,3 µl roztoku meranej látky v DMSO so zostupnou koncentráciou 40 mM, 10 mM, 4 mM, 1 mM a 0,4 mM. V množstve 8,3 µl bol ako porovnávací roztok použitý DMSO. Takto vzniknutá zmes bola dostatočne premiešaná a následne inkubovaná po dobu 5 minút a pri teplote 37 °C. Po ukončení inkubácie bolo k jednotlivým vzorkám pridaných 33,3 µl roztoku substrátu (10 mM acetyltiocholín jodidu alebo 10 mM butyryltiocholín jodidu).

Táto metóda bola založená na hydrolýze esteru tiocholínu cholinesterázou za vzniku príslušnej kyseliny a tiocholínu. Tiolová skupina tiocholínu reagovala s DTNB za vzniku žltého sfarbenia, ktorého absorbancia bola zmeraná pri príslušnej vlnovej dĺžke. Každé meranie bolo opakované šesťkrát pre každú koncentráciu stanovovanej látky vrátane DMSO ako slepeho roztoku. Absorbancia bola meraná pri vlnovej dĺžke 436 nm pre AChE a 412 nm pre BuChE počas 1 minúty pri 37 °C za použitia spektrofotometra (Synergy™ HT Multi - Detection Microplate Reader). Výsledná inhibícia v percentách bola vypočítaná podľa nasledujúceho vzorca: $\% I = 100 - (\Delta A_{BI} / \Delta A_{Sa}) \times 100$, kde ΔA_{BI} vyjadruje nárast absorbancie slepej vzorky a ΔA_{Sa} nárast absorbancie meranej vzorky za 1 minútu. Hodnota inhibičnej aktivity testovaných zlúčenín bola vypočítaná zo získaných hodnôt v programe GraphPad Prism.

Výsledky boli vyjadrené ako hodnoty IC_{50} a k pozitívnej kontrole boli použité nasledujúce látky; galantamín a fyzostigmín, ktoré zároveň slúžili aj ako štandardy (Tab. 10).

4.5. Stanovenie inhibičnej aktivity alkaloidov voči POP

U zlúčenín izolovaných v dostatočnom množstve t.j. SP-2 a SP-3 prebiehlo stanovenie inhibičnej aktivity voči POP. Z-Pro-prolinal (syntetická zlúčenina) a bajkalín boli použité ako pozitívne štandardy. Príprava prolyloligopeptidázy spočívala v jej rozpustení v 0,01 M fosfátovom tlmivom roztoku (obsahujúci 137 mM NaCl a 2,7 mM KCl) s pH 7,4.

K testovaniu bola použitá štandardná polystyrénová mikrotitračná doštička s plochým a čistým dnom. Špecifická aktivita enzýmu vykazovala hodnotu 0,2 U/ml. Zásobné roztoky testovaných zlúčenín boli pripravené rozpustením v 10 mM DMSO. Z rezervného roztoku s deionizovanou vodou sa následne pripravili jednotlivé riedenia. Slepý roztok obsahoval DMSO v rovnakej koncentrácii. Skúšobné roztoky boli pripravené zmiešaním 170 μ l pufru, 5 μ l testovanej látky a 5 μ l roztoku POP. Takto vzniknutá zmes bola po dobu 5 minút a pri teplote 37 °C inkubovaná a následne k nej bolo pridaných 20 μ l substrátu POP, ktorý predstavoval Z-Gly-pro-*p*-nitroanilid získaný rozpustením v 50% 1,4-dioxane (5 mM). Zmes opäť podstúpila inkubáciu a to za podmienok pri zachovanej teplote a dlhšej časovej dobe. Prítomnosť farebného produktu *p*-nitroanilidu bol priamo úmerný aktivite POP a podrobený spektrofotometrickému meraniu pri vlnovej dĺžke 405 nm. Inhibičná účinnosť testovaných zlúčenín bola vyjadrená ako hodnota IC₅₀ a výsledky boli spracované pomocou programu GraphPad Prism a Microsoft Excel.

4.6. Stanovenie inhibičnej aktivity alkaloidov voči GSK-3 β

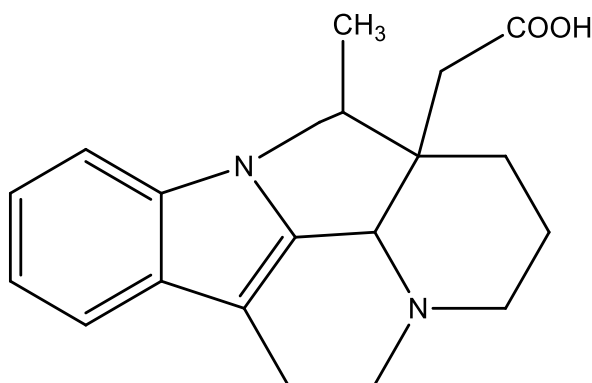
K stanoveniu aktivity a inhibície GSK-3 β bola použitá luminiscenčná metóda podľa Baki et al.[171] využívajúca súpravu reagensí Kinase-Glo. Reakcia prebiehala na 96-jamkových doštičkách a každá z nich obsahovala 10 μ l testovanej látky (rozpustenej v DMSO) v koncentrácii 1mM a vopred zriedenej v tlmivom roztoku o pH 7,5 (obsahujúcom 50 mM HEPES, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 15 mM octanu horečnatého tetrahydrátu, 10 μ l ATP, 10 μ l 100 mM GSM (substrát pre GSK-3 β) a 10 μ l GSK-3 β). K pozitívnej či negatívnej kontrole bolo namiesto testovanej látky použito 10 μ l tlmivého roztoku alebo roztoku SB-415286 (pozitívny štandard). Finálna koncentrácia DMSO v reakčnej zmesi neprekročila viac než 5 %. Zmes sa ponechala inkubovať po dobu 30 minút pri teplote 37 °C. Luminiscencia bola zaznamenaná po 10 minútach od zastavenia enzymatickej reakcie. Výsledná aktivita bola úmerná rozdielu v celkovej a spotrebovanej ATP. Inhibičné aktivity boli vypočítané na základe maximálnej aktivity (meranej pri neprítomnosti inhibítora) a maximálnej inhibícii (v prítomnosti referenčnej zlúčeniny). Testované zlúčeniny boli skriningovo testované pri finálnej koncentrácii 50 μ M. [172]

5. Výsledky

5.1. Štruktúrna analýza

5.1.1. SP-1 (zlúčenina 81 – 93/3) - nová zlúčenina

Sumárny vzorec: C₁₉H₂₂N₂O₂



Obr. 20 Štruktúra alkaloidu SP-1

Nahnedlá, amorfná látka.

5.1.1.1. NMR analýza

¹H NMR (500MHz, CD₃OD) δ: 8.28-8.25 (1H, m, H7), 7.48-7.44 (1H, m, H10), 7.30-7.26 (2H, m, H9, H8), 4.67-4.64 (1H, m, H11), 4.53 (1H, q, *J*=6.4Hz, H6), 3.33-3.31 (2H, m, H2), 3.13 (1H, d, *J*=16.8Hz, H12), 2.99-2.90 (1H, m, H1), 2.66-2.53 (2H, m, H3), 2.49 (1H, td, *J*=11.9Hz, *J*=3.5Hz, H1), 2.40 (1H, d, *J*=16.8Hz, H12), 1.76-1.57 (2H, m, H5, H4), 1.47-1.38 (1H, m, H4), 1.20 (3H, d, *J*=6.4Hz, 6-CH₃), 1.09-1.01 (1H, td, *J*=13.8, *J*=4.2Hz, H5).

¹³C NMR (125MHz, CDCl₃) δ: 168.1 (C13), 134.3 (C6b), 131.9 (10c), 130.2 (10a), 124.3 (C8), 123.8 (C9), 118.0 (C10), 116.3 (C7), 112.6 (10b), 66.2 (C6), 53.1 (C11), 50.6 (C2), 44.0 (C3), 42.8 (C5a), 38.2 (C12), 27.2 (C5), 20.5 (C4), 17.3 (C1), 16.5 (6-CH₃).

5.1.1.2. ESI/MS analýza

MS-ESI: *m/z* (%) [M+H]⁺ 311(100).

MS/MS *m/z* 311(3), 293(100), 267(53), 210(87).

5.1.1.3. HRMS analýza

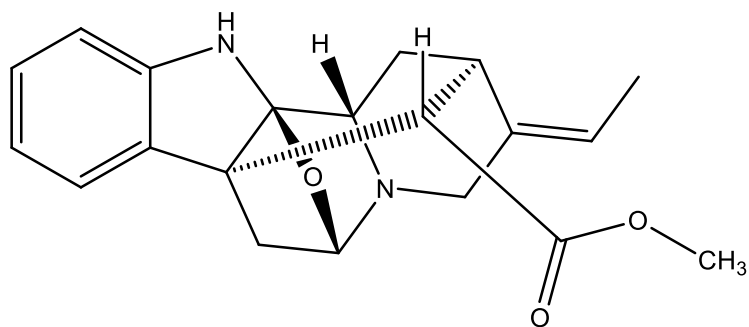
HRMS *m/z* (%) [M+H]⁺ 311,1760.

5.1.1.4. Optická otáčavosť

$[\alpha]^{25}_{\text{D}} = -31,3^{\circ}$ (c 0,064; CHCl_3)

5.1.2. SP-2 (-)-pikrinin (zlúčenina 81 – 93/4)

Sumárny vzorec: $\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_3$



Obr. 21 Štruktúra (-)-pikrininu

Nahnedlá, amorfná látka.

5.1.2.1. NMR analýza

Identifikácia prebehla porovnaním získaných ^1H a ^{13}C spektier s literatúrou. [173]

5.1.2.2. ESI/MS analýza

MS-ESI: m/z (%) $[\text{M}+\text{H}]^+$ 339(100).

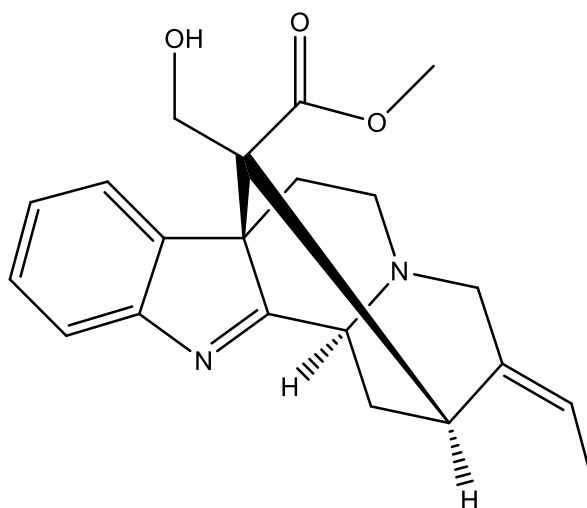
MS/MS m/z 339(2), 321(86), 296(100), 279(91), 270(39), 261(27), 234(24), 216(17), 202(13).

5.1.2.3. Optická otáčavosť

$[\alpha]^{25}_{\text{D}} = -49^{\circ}$ (c 0,169; CHCl_3)

5.1.3. SP-3 deacetylakuammilin (zlúčenina 57 – 80/3)

Sumárny vzorec: $\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_3$



Obr. 22 Štruktúra deacetylakuammilinu

Amorfný biely prášok.

5.1.3.1. NMR analýza

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ : 7.65 (1H, d, $J = 7.6$ Hz), 7.55 (1H, d, $J = 7.6$ Hz), 7.36 (1H, td, $J = 7.6, 1.3$ Hz), 7.20 (1H, td, $J = 7.5, 1.1$ Hz), 5.48 (1H, q, $J = 7.1$ Hz), 4.62 (1H, d, $J = 4.9$ Hz), 4.16 – 4.08 (1H, m), 3.86 (3H, s), 3.70 (1H, $J = 14.3$ Hz, $J = 5.9$ Hz), 3.67 (1H, s), 3.16 (1H, d, $J = 17.1$ Hz), 2.99 (1H, d, $J = 12.3$ Hz), 2.90 (1H, d, $J = 12.3$ Hz), 2.71 – 2.56 (2H, m), 2.46 (1H, ddd, $J = 14.6$ Hz, $J = 5.0$ Hz, $J = 2.6$ Hz), 2.06 (1H, dd, $J = 15.0$ Hz, $J = 4.0$ Hz), 1.92 (1H, dd, $J = 14.6$ Hz, $J = 2.6$ Hz), 1.64 (3H, dd, $J = 7.1$ Hz, $J = 2.6$ Hz)

$^{13}\text{C NMR}$ (125.7 MHz, CDCl_3) δ : 190.5, 173.6, 155.8, 144.3, 139.6, 128.5, 125.9, 124.6, 121.5, 119.6, 64.2, 60.5, 58.7, 54.6, 53.9, 52.1, 52.0, 37.9, 34.7, 30.5, 13.4.

5.1.3.2. ESI/MS analýza

MS-ESI: m/z (%) $[\text{M}+\text{H}]^+$ 353(100).

MS/MS m/z 353(2), 335(36), 291(100), 323(70), 291(100), 266(90), 250(54), 228(14), 202(21), 194(24).

5.1.3.3. Optická otáčavosť

$[\alpha]^{25}_{\text{D}} = +76,1^\circ$ (c 0,39; CHCl_3)

5.2. Inhibičná aktivita izolovaných alkaloidov voči AChE, BChE, POP a GSK-3β

V nasledujúcej tabuľke sú uvedené výsledky inhibičných aktivít *V. minor* alkaloidov voči daným enzýmom.

Tab. 10 Výsledky merania inhibičných aktivít

Zlúčenina	AChE (IC ₅₀ ,μM)	BuChE (IC ₅₀ ,μM)	POP(IC ₅₀ ,μM)	GSK-3β (50 μM, % inhibice)
SP-1	>100	>100	ND ⁴	76,85 ± 0,99
(-)-pikrinin (SP-2)	>100	>100	460 ± 22	66,39 ± 8,37
deacetylakuammilin (SP-3)	>100	>100	445 ± 28	84,17 ± 4,97
galantamín¹	1,710 ± 0,065	42,30 ± 1,30	-	-
fyzostigmín¹	0,063 ± 0,001	0,130 ± 0,004	-	-
bajkalín²	-	-	194 ± 14	-
Z-Pro-prolinal²	-	-	3,269 ± 0,02 x10 ⁻³	-
SB-415286³	-	-	-	70,00 nM (IC ₅₀)

¹ galantamín a fyzostigmín; štandardy pre AChE a BChE, ² bajkalín a Z-Pro-prolinal; štandardy pre POP, ³ SB-415286; štandard pre GSK-3β, ⁴ nedostatočné množstvo k testovaniu aktivity voči POP.

6. DISKUSIA

Cieľom tejto práce bola izolácia obsahových látok vybranými metódami. Na základe štruktúrnej analýzy a porovnania dát s literatúrou boli identifikované nasledujúce látky: SP-1, (–)-pikrinin (SP-2) a deacetylakuammilin (SP-3). U látky SP-1 sa zistilo, že sa jedná o novú doposiaľ neizolovanú zlúčeninu, u ktorej môžeme pozorovať prítomnosť pentacyklickej štruktúry, ktorá je významná pre eburnaminový typ alkaloidov.

(–)-Pikrinin bol prvýkrát extrahovaný v roku 1965, a to z listov stromu *Alstonia scholaris* (L.) R. Br., tiež známeho pod názvom Dita Bark. Táto látka je taktiež obsahovou látkou *Vinca minor* L. a *Vinca herbacea* Waldst. & Kit. z čeľade Apocyanaceae. (–)-Pikrinin zaradzujeme medzi akuamminové deriváty, obsahujúce indolové jadro kombinované do polycyklického skeletu. Zložitosť tejto molekuly má biosyntetický pôvod a významnú biologickú účinnosť. (–)-Pikrinin vykazuje aktivitu v boji proti plazmodiálnym, vírusovým a rakovinovým pôvodcom. Alkaloidová frakcia získaná z listov stromu *Alstonia scholaris* (L.) R. Br ukázala na základe *in vivo* a *in vitro* screeningu významné analgetické a protizápalové účinky. Protizápalový účinok pikrininu spočíva v jeho schopnosti inhibovať enzým 5-lípooxygenázu. Okrem iného bol u neho pozorovaný aj priaznivý vplyv v terapii chronických respiračných ochorení a malárie.[173–175].

Rod *Rhazya* zahŕňa dva druhy, *Rhazya stricta* Decne. a *Rhazya orientalis* (Decne.) A.DC. (č. Apocyanaceae). *Rhazya* je bohatým zdrojom zlúčenín obsahujúcich indol. Tradične sa používa na liečbu rôznych chorôb, ako je horúčka, reumatizmus, zápal, kožné infekcie, bolesti hrdla a žalúdočné poruchy. Nedávna štúdia nadzemných častí rastliny *R. stricta* viedla k vyizolovaniu niekoľkých zlúčenín, a jednou z nich bol práve akuamminový derivát deacetylakuammilin.[176] Deacetylakuammilin bol taktiež izolovaný z listov rastliny *Melodinus acutiflorus* F. Muell. z čeľade Apocyanaceae.[177]

U vyššie spomínaných alkaloidov bola určená ich schopnosť inhibície voči AChE, BuChE, POP a GSK-3 β . Galantamín, fyzostigmín, bajkalín, Z-Pro-prolinal a SB-415286 boli použité ako štandardy k pozitívnej kontrole. Galantamín je vysoko selektívny a silný inhibítor AChE (IC_{50} 710 \pm 0,065 μ M), kdežto inhibícia voči BuChE sa javí ako takmer neúčinná (IC_{50} 42,30 \pm 1,30 μ M). Za silného inhibítora AChE (IC_{50} 0,063 \pm 0,001 μ M) a BuChE (IC_{50} 0,130 \pm 0,004 μ M) považujeme fyzostigmín. Bajkalín (IC_{50} 194 \pm 14 μ M) a Z-Pro-prolinal (IC_{50} 3,269 \pm 0,02 $\times 10^{-3}$ μ M) boli použité ako štandardy voči POP. Poslednou referenčnou látkou vykazujúcou inhibičné vlastnosti voči GSK-3 β bola vysoko selektívna zlúčenina SB-415286 vyvinutá spoločnosťou GlaxoSmithKline (IC_{50} 70,00 nM).

Výsledky merania inhibičných aktivít ukázali, že ani jedna z izolovaných látok nevykazuje významnú inhibičnú aktivitu voči spomínaným enzýmom. (-)-pikrinin je v porovnaní s referenčnými látkami; AChE ($IC_{50} > 100$), BuChE ($IC_{50} > 100$) a POP ($IC_{50} 460 \pm 22$) neaktívny. Ani inhibícia voči GSK-3 β (% inhibícia = $66,39 \pm 8,37$) nebola v porovnaní so štandardom dostačujúca. Porovnaním výsledkov s literatúrou sa ukázalo, že hoci alkaloidný extrakt pri 200 $\mu\text{g/ml}$ vykazuje silnú inhibičnú aktivitu voči AChE (% inhibícia = $78,54 \pm 1,06$) a BuChE (% = $81,39 \pm 2,94$), samotný (-)-pikrinin ju nevykazuje ani len okrajovo.[174]

Podobne aj zlúčeniny SP-1 a deacetylakuammilin (SP-3) nevykazovali inhibičné vlastnosti voči AChE_{SP-1,SP-3} ($IC_{50} > 100$), BuChE_{SP-1,SP-3} ($IC_{50} > 100$), POP_{SP-3} ($IC_{50} 445 \pm 28$) a GSK-3 β _{SP-1} (% inhibícia = $76,85 \pm 0,99$) GSK-3 β _{SP-3} (% inhibícia = $84,17 \pm 4,97$). Látka SP-1 vzhľadom k nedostatočnému izolovanému množstvu nebola podrobená testovaniu voči POP. Z dostupných zdrojov nebolo zrejmé či u izolovaného alkaloidu, v našom prípade deacetylakuammilinu boli uskutočnené testy na inhibičnú aktivitu už spomínaných enzýmov.

7. Zoznam použitej literatúry

1. Dang, L.; Van Damme, E.J.M. Toxic Proteins in Plants. *Phytochemistry* **2015**, *117*, 51–64.
2. Houghton, P.J.; Ren, Y.; Howes, M.-J. Acetylcholinesterase Inhibitors from Plants and Fungi. *Nat. Prod. Rep.* **2006**, *23*, 181.
3. Ryu, G.; Park, S.H.; Kim, E.S.; Choi, B.W.; Ryu, S.Y.; Lee, B.H. Cholinesterase Inhibitory Activity of Two Farnesylacetone Derivatives from the Brown Alga *Sargassum Sagamianum*. *Arch Pharm Res* **2003**, *26*, 796–799.
4. Mukherjee, P.K.; Kumar, V.; Mal, M.; Houghton, P.J. Acetylcholinesterase Inhibitors from Plants. *Phytomedicine* **2007**, *14*, 289–300.
5. Murray, A.P.; Faraoni, M.B.; Castro, M.J.; Alza, N.P.; Cavallaro, V. Natural AChE Inhibitors from Plants and Their Contribution to Alzheimer's Disease Therapy. *Curr Neuropharmacol* **2013**, *11*, 388–413.
6. Bahadori, F.; Topçu, G.; Boğa, M.; Türkekul, A.; Kolak, U.; Kartal, M. Indole Alkaloids from *Vinca Major* and *V. Minor* Growing in Turkey. *Nat Prod Commun* **2012**, *7*, 731–734.
7. Jahodář, L. *Farmakobotanika: Semenné Rostliny*; Karolinum, 2006; ISBN 80-246-1225-9.
8. Farahanikia, B.; Akbarzadeh, T.; Jahangirzadeh, A.; Yassa, N.; Shams Ardekani, M.R.; Mirnezami, T.; Hadjiakhoondi, A.; Khanavi, M. Phytochemical Investigation of *Vinca Minor* Cultivated in Iran. *Iran J Pharm Res* **2011**, *10*, 777–785.
9. Jha, M.K.; Rahman, M.H.; Sheikh, H. Vinpocetine: A Smart Drug and a Smart Nutrient: A Review. *Int. J. Pharm. Sci. Res.* **2012**, *3*, 346–352.
10. ADINACO | Vědecký Portál - Farmaceutická Fakulta UK Available online: <https://portal.faf.cuni.cz/Groups/ADINACO/> (accessed on 12 May 2021).
11. RŮŽIČKA, E. *Diferenciální Diagnostika a Léčba Demencí.*; Galén: Praha, 2003; ISBN 80-7262-205-6.
12. Yang, H.D.; Kim, D.H.; Lee, S.B.; Young, L.D. History of Alzheimer's Disease. *Dement Neurocognitive Disord* **2016**, *15*, 115.
13. Koukolík, F.; Jiráček, R. *Alzheimerova Nemoc a Další Demence.*; Grada Publishing: Praha, 1998; ISBN 80-7169-615-3.
14. Jiráček, R. *Demence*; Maxdorf: Praha, 1999; ISBN 80-85800-44-6.
15. F00-F09 ORGANICKÉ DUŠEVNÍ PORUCHY VČETNĚ SYMPTOMATICKÝCH (F00–F09) Available online: <https://old.uzis.cz/cz/mkn/F00-F09.html> (accessed on 19 April 2020).
16. Zvěřová, M. *Alzheimerova Demence.*; Grada Publishing: Praha, 2017; ISBN 978-80-271-0561-8.

17. Fišar a kol., Z. *Vybrané Kapitoly z Biologické Psychiatrie*; Grada, 2009; ISBN 978-80-247-2737-0.
18. Holmerová, I.; Jarolímová, E.; Suchá, J. *Péče o Pacienty s Kognitivní Poruchou.*; EV public relations: Praha, 2007; ISBN 978-80-254-0177-5.
19. Jiráček, R. Stará a Nová Diagnostická Kritéria pro Alzheimerovu Chorobu v Podmínkách ČR. *Neurologie pro praxi* **2011**, *12*, 135–137.
20. Vlček, J.; Fialová, D. *Klinická Farmacie I.*; Grada Publishing: Praha, 2010; ISBN 978-80-247-3169-8.
21. Pidrman, V. *Demence*; Psyché: Praha, 2007; ISBN 978-80-247-1490-5.
22. Prince, M.J. World Alzheimer Report 2015: The Global Impact of Dementia Available online: <https://www.alz.co.uk/research/world-report-2015> (accessed on 19 April 2020).
23. Jiráček, R. *Gerontopsychiatrie*; Galén: Praha, 2013; ISBN 978-80-7262-873-5.
24. Dementia Available online: <https://www.who.int/westernpacific/health-topics/dementia> (accessed on 19 April 2020).
25. Blennow, K.; Leon, M.J. de; Zetterberg, H. Alzheimer's Disease. *The Lancet* **2006**, *368*, 387–403.
26. Guerreiro, R.; Hardy, J. Genetics of Alzheimer's Disease. *Neurotherapeutics* **2014**, *11*, 732–737.
27. Scheltens, P.; Blennow, K.; Breteler, M.M.B.; Strooper, B. de; Frisoni, G.B.; Salloway, S.; Flier, W.M.V. der Alzheimer's Disease. *The Lancet* **2016**, *388*, 505–517.
28. Serý, O.; Povová, J.; Míšek, I.; Pešák, L.; Janout, V. Molecular Mechanisms of Neuropathological Changes in Alzheimer's Disease: A Review. *Folia Neuropathol* **2013**, *51*, 1–9.
29. Brunovský, M. Inhibitory Cholinesteráz v Léčbě Alzheimerovy Nemoci. *Neurologie pro praxi* **2007**, *8*, 112–117.
30. Hamley, I.W. The Amyloid Beta Peptide: A Chemist's Perspective. Role in Alzheimer's and Fibrillization. *Chem. Rev.* **2012**, *112*, 5147–5192.
31. Xu, Y.; Wang, D.; Luo, Y.; Li, W.; Shan, Y.; Tan, X.; Zhu, C. Beta Amyloid-Induced Upregulation of Death Receptor 6 Accelerates the Toxic Effect of N-Terminal Fragment of Amyloid Precursor Protein. *Neurobiology of Aging* **2015**, *36*, 157–168.
32. Danysz, W.; Parsons, C.G. Alzheimer's Disease, β -Amyloid, Glutamate, NMDA Receptors and Memantine – Searching for the Connections. *Br J Pharmacol* **2012**, *167*, 324–352.
33. Sadigh-Eteghad, S.; Sabermarouf, B.; Majidi, A.; Talebi, M.; Farhoudi, M.; Mahmoudi, J. Amyloid-Beta: A Crucial Factor in Alzheimer's Disease. *Med Princ Pract* **2015**, *24*, 1–10.

34. Rajasekhar, K.; Chakrabarti, M.; Govindaraju, T. Function and Toxicity of Amyloid Beta and Recent Therapeutic Interventions Targeting Amyloid Beta in Alzheimer's Disease. *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 13434–13450..
35. Pîrșcoveanu, D.F.V.; Pirici, I.; Tudorică, V.; Bălșeanu, T.A.; Albu, V.C.; Bondari, S.; Bumbea, A.M.; Pîrșcoveanu, M. Tau Protein in Neurodegenerative Diseases - a Review. *Rom J Morphol Embryol* **2017**, *58*, 1141–1150.
36. Andreadis, A.; Brown, W.M.; Kosik, K.S. Structure and Novel Exons of the Human Tau Gene. *Biochemistry* **1992**, *31*, 10626–10633.
37. Avila, J.; Jiménez, J.S.; Sayas, C.L.; Bolós, M.; Zabala, J.C.; Rivas, G.; Hernández, F. Tau Structures. *Front. Aging Neurosci.* **2016**, *8*.
38. Buée, L.; Bussièrè, T.; Buée-Scherrer, V.; Delacourte, A.; Hof, P.R. Tau Protein Isoforms, Phosphorylation and Role in Neurodegenerative Disorders. *Brain Res. Brain Res. Rev.* **2000**, *33*, 95–130.
39. Kolarova, M.; García-Sierra, F.; Bartos, A.; Ricny, J.; Ripova, D. Structure and Pathology of Tau Protein in Alzheimer Disease. *Int J Alzheimers Dis* **2012**, *2012*, 731526.
40. Jouanne, M.; Rault, S.; Voisin-Chiret, A.-S. Tau Protein Aggregation in Alzheimer's Disease: An Attractive Target for the Development of Novel Therapeutic Agents. *Eur J Med Chem* **2017**, *139*, 153–167.
41. Sergeant, N.; Delacourte, A.; Buée, L. Tau Protein as a Differential Biomarker of Tauopathies. *Biochim. Biophys. Acta* **2005**, *1739*, 179–197.
42. Sergeant, N.; Bretteville, A.; Hamdane, M.; Caillet-Boudin, M.-L.; Grognet, P.; Bombois, S.; Blum, D.; Delacourte, A.; Pasquier, F.; Vanmechelen, E.; et al. Biochemistry of Tau in Alzheimer's Disease and Related Neurological Disorders. *Expert Rev Proteomics* **2008**, *5*, 207–224.
43. Martin, L.; Latypova, X.; Wilson, C.M.; Magnaudeix, A.; Perrin, M.-L.; Yardin, C.; Terro, F. Tau Protein Kinases: Involvement in Alzheimer's Disease. *Ageing Research Reviews* **2013**, *12*, 289–309.
44. Huang, Y.; Mahley, R.W. Apolipoprotein E: Structure and Function in Lipid Metabolism, Neurobiology, and Alzheimer's Diseases. *Neurobiol. Dis.* **2014**, *72 Pt A*, 3–12.
45. Liu, C.-C.; Liu, C.-C.; Kanekiyo, T.; Xu, H.; Bu, G. Apolipoprotein E and Alzheimer Disease: Risk, Mechanisms and Therapy. *Nat Rev Neurol* **2013**, *9*, 106–118.
46. Huynh, T.-P.V.; Davis, A.A.; Ulrich, J.D.; Holtzman, D.M. Apolipoprotein E and Alzheimer's Disease: The Influence of Apolipoprotein E on Amyloid- β and Other Amyloidogenic Proteins. *J. Lipid Res.* **2017**, *58*, 824–836.

47. Wang, X.; Wang, W.; Li, L.; Perry, G.; Lee, H.; Zhu, X. Oxidative Stress and Mitochondrial Dysfunction in Alzheimer's Disease. *Biochim. Biophys. Acta* **2014**, *1842*, 1240–1247.
48. Chen, Z.; Zhong, C. Oxidative Stress in Alzheimer's Disease. *Neurosci Bull* **2014**, *30*, 271–281.
49. Reichardt, L.F. Neurotrophin-Regulated Signalling Pathways. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* **2006**, *361*, 1545–1564.
50. Skaper, S.D. The Biology of Neurotrophins, Signalling Pathways, and Functional Peptide Mimetics of Neurotrophins and Their Receptors. *CNS Neurol Disord Drug Targets* **2008**, *7*, 46–62.
51. Tuszynski, M.H. Nerve Growth Factor Gene Delivery: Animal Models to Clinical Trials. *Dev Neurobiol* **2007**, *67*, 1204–1215.
52. Teng, K.K.; Hempstead, B.L. Neurotrophins and Their Receptors: Signaling Trios in Complex Biological Systems. *Cell. Mol. Life Sci.* **2004**, *61*, 35–48.
53. Huang, E.J.; Reichardt, L.F. Trk Receptors: Roles in Neuronal Signal Transduction. *Annu. Rev. Biochem.* **2003**, *72*, 609–642.
54. Lee, R.; Kermani, P.; Teng, K.K.; Hempstead, B.L. Regulation of Cell Survival by Secreted Proneurotrophins. *Science* **2001**, *294*, 1945–1948.
55. Mamidipudi, V.; Wooten, M.W. Dual Role for P75(NTR) Signaling in Survival and Cell Death: Can Intracellular Mediators Provide an Explanation? *J. Neurosci. Res.* **2002**, *68*, 373–384.
56. Mufson, E.J.; Ma, S.Y.; Cochran, E.J.; Bennett, D.A.; Beckett, L.A.; Jaffar, S.; Saragovi, H.U.; Kordower, J.H. Loss of Nucleus Basalis Neurons Containing TrkA Immunoreactivity in Individuals with Mild Cognitive Impairment and Early Alzheimer's Disease. *J. Comp. Neurol.* **2000**, *427*, 19–30.
57. Chu, Y.; Cochran, E.J.; Bennett, D.A.; Mufson, E.J.; Kordower, J.H. Down-Regulation of TrkA mRNA within Nucleus Basalis Neurons in Individuals with Mild Cognitive Impairment and Alzheimer's Disease. *J. Comp. Neurol.* **2001**, *437*, 296–307.
58. Counts, S.E.; Mufson, E.J. The Role of Nerve Growth Factor Receptors in Cholinergic Basal Forebrain Degeneration in Prodromal Alzheimer Disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **2005**, *64*, 263–272.
59. Allen, S.J.; Watson, J.J.; Shoemark, D.K.; Barua, N.U.; Patel, N.K. GDNF, NGF and BDNF as Therapeutic Options for Neurodegeneration. *Pharmacol. Ther.* **2013**, *138*, 155–175.
60. Calsolaro, V.; Edison, P. Neuroinflammation in Alzheimer's Disease: Current Evidence and Future Directions. *Alzheimers Dement* **2016**, *12*, 719–732.

61. Fakhoury, M. Microglia and Astrocytes in Alzheimer's Disease: Implications for Therapy. *Curr Neuropharmacol* **2018**, *16*, 508–518.
62. Jiráček, R.; Holmerová, I.; Borzová, C. *Demence a Jiné Poruchy Paměti*; Grada Publishing: Praha, 2009; ISBN 978-80-247-2454-6.
63. Jiráček, R. Diagnostika a Terapie Alzheimerovy Choroby. *Neurologie pro praxi* **2008**, *9*, 240–244.
64. Jiráček, R. Farmakoterapie Alzheimerovy Choroby. *Remedia* **2009**.
65. Žigová, E. Kombinovaná Liečba Alzheimerovej Choroby. *Solen* **2013**, 33–36.
66. Haam, J.; Yakel, J.L. Cholinergic Modulation of the Hippocampal Region and Memory Function. *J. Neurochem.* **2017**, *142 Suppl 2*, 111–121.
67. Ferreira-Vieira, T.H.; Guimaraes, I.M.; Silva, F.R.; Ribeiro, F.M. Alzheimer's Disease: Targeting the Cholinergic System. *Curr Neuropharmacol* **2016**, *14*, 101–115.
68. Abrams, P.; Andersson, K.-E.; Buccafusco, J.J.; Chapple, C.; de Groat, W.C.; Fryer, A.D.; Kay, G.; Laties, A.; Nathanson, N.M.; Pasricha, P.J.; et al. Muscarinic Receptors: Their Distribution and Function in Body Systems, and the Implications for Treating Overactive Bladder. *Br. J. Pharmacol.* **2006**, *148*, 565–578.
69. Patočka, J.; Kuca, K.; Jun, D. Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase--Important Enzymes of Human Body. *Acta Medica (Hradec Kralove)* **2004**, *47*, 215–228.
70. Colović, M.B.; Krstić, D.Z.; Lazarević-Pašti, T.D.; Bondžić, A.M.; Vasić, V.M. Acetylcholinesterase Inhibitors: Pharmacology and Toxicology. *Curr Neuropharmacol* **2013**, *11*, 315–335.
71. Massoulié, J.; Sussman, J.; Bon, S.; Silman, I. Chapter 15: Structure and functions of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase. In *Progress in Brain Research*; Elsevier, 1993; Vol. 98, pp. 139–146 ISBN 978-0-444-89717-6.
72. Bajda, M.; Więckowska, A.; Hebda, M.; Guzior, N.; Sotriřer, C.A.; Malawska, B. Structure-Based Search for New Inhibitors of Cholinesterases. *Int J Mol Sci* **2013**, *14*, 5608–5632.
73. Itzhaki, R.F.; Lathe, R.; Balin, B.J.; Ball, M.J.; Bearer, E.L.; Braak, H.; Bullido, M.J.; Carter, C.; Clerici, M.; Cosby, S.L.; et al. Microbes and Alzheimer's Disease. *J. Alzheimers Dis.* **2016**, *51*, 979–984.
74. Darvesh, S.; Hopkins, D.A.; Geula, C. Neurobiology of Butyrylcholinesterase. *Nat. Rev. Neurosci.* **2003**, *4*, 131–138.
75. Pohanka, M. Butyrylcholinesterase as a Biochemical Marker. *Bratisl Lek Listy* **2013**, *114*, 726–734.

76. Ha, Z.Y.; Mathew, S.; Yeong, K.Y. Butyrylcholinesterase: A Multifaceted Pharmacological Target and Tool. *Curr. Protein Pept. Sci.* **2020**, *21*, 99–109.
77. Sáez-Valero, J.; Small, D.H. Altered Glycosylation of Cerebrospinal Fluid Butyrylcholinesterase in Alzheimer's Disease. *Brain Res.* **2001**, *889*, 247–250.
78. Geula, C.; Darvesh, S. Butyrylcholinesterase, Cholinergic Neurotransmission and the Pathology of Alzheimer's Disease. *Drugs Today* **2004**, *40*, 711–721.
79. Gura, T. Hope in Alzheimer's Fight Emerges from Unexpected Places. *Nat. Med.* **2008**, *14*, 894.
80. DeKosky, S.T.; Ikonovic, M.D.; Styren, S.D.; Beckett, L.; Wisniewski, S.; Bennett, D.A.; Cochran, E.J.; Kordower, J.H.; Mufson, E.J. Upregulation of Choline Acetyltransferase Activity in Hippocampus and Frontal Cortex of Elderly Subjects with Mild Cognitive Impairment. *Ann. Neurol.* **2002**, *51*, 145–155.
81. Schrattenholz, A.; Pereira, E.F.; Roth, U.; Weber, K.H.; Albuquerque, E.X.; Maelicke, A. Agonist Responses of Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptors Are Potentiated by a Novel Class of Allosterically Acting Ligands. *Mol. Pharmacol.* **1996**, *49*, 1–6.
82. Maelicke, A.; Samochocki, M.; Jostock, R.; Fehrenbacher, A.; Ludwig, J.; Albuquerque, E.X.; Zerlin, M. Allosteric Sensitization of Nicotinic Receptors by Galantamine, a New Treatment Strategy for Alzheimer's Disease. *Biol. Psychiatry* **2001**, *49*, 279–288.
83. Barik, J.; Dajas-Bailador, F.; Wonnacott, S. Cellular Responses to Nicotinic Receptor Activation Are Decreased after Prolonged Exposure to Galantamine in Human Neuroblastoma Cells. *Br. J. Pharmacol.* **2005**, *145*, 1084–1092.
84. Orhan, G.; Orhan, I.; Subutay-Oztekin, N.; Ak, F.; Sener, B. Contemporary Anticholinesterase Pharmaceuticals of Natural Origin and Their Synthetic Analogues for the Treatment of Alzheimer's Disease. *Recent Pat CNS Drug Discov* **2009**, *4*, 43–51.
85. Cacabelos, R. Donepezil in Alzheimer's Disease: From Conventional Trials to Pharmacogenetics. *Neuropsychiatr Dis Treat* **2007**, *3*, 303–333.
86. Mehta, M.; Adem, A.; Sabbagh, M. New Acetylcholinesterase Inhibitors for Alzheimer's Disease. *Int J Alzheimers Dis* **2012**, *2012*.
87. Kandiah, N.; Pai, M.-C.; Senanarong, V.; Looi, I.; Ampil, E.; Park, K.W.; Karanam, A.K.; Christopher, S. Rivastigmine: The Advantages of Dual Inhibition of Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase and Its Role in Subcortical Vascular Dementia and Parkinson's Disease Dementia. *Clin Interv Aging* **2017**, *12*, 697–707.
88. Keglevich, P.; Szántay, C.; Hazai, L. The Chemistry of Galanthamine. Classical Synthetic Methods and Comprehensive Study on Its Analogues. *MRLC* **2016**, *16*, 1450–1461.

89. Galantamine. In *LiverTox: Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury*; National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases: Bethesda (MD), 2012.
90. Dušek, K.; Večeřová-Procházková, A. *Diagnostika a Terapie Duševních Porúch*; Grada Publishing: Praha, 2015; ISBN 978-80-247-4826-9.
91. Jiráček, R. Terapie Alzheimerovy Choroby a Příbuzných Neurodegenerativních Demencií. *Neurologie pro praxi* **2010**, *10*, 384–389.
92. Sheardová, K.; Hort, V.; Rusina, R.; Bartoš, A.; Líněk, V.; Rössner, P.; Rektorová, I. Doporučené Postupy pro Terapii Alzheimerovy Nemoci a Ostatních Demencií. *Psychiatrie pro praxi* **2009**, *10*, 216–219.
93. Sun, Z.-K.; Yang, H.-Q.; Chen, S.-D. Traditional Chinese Medicine: A Promising Candidate for the Treatment of Alzheimer's Disease. *Transl Neurodegener* **2013**, *2*, 6.
94. Gul, A.; Bakht, J.; Mehmood, F. Huperzine-A Response to Cognitive Impairment and Task Switching Deficits in Patients with Alzheimer's Disease. *J Chin Med Assoc* **2018**.
95. Yang, M.; You, W.; Wu, S.; Fan, Z.; Xu, B.; Zhu, M.; Li, X.; Xiao, Y. Global Transcriptome Analysis of *Huperzia Serrata* and Identification of Critical Genes Involved in the Biosynthesis of Huperzine A. *BMC Genomics* **2017**, *18*, 245.
96. Wu, T.-Y.; Chen, C.-P.; Chen, C.-P.; Jinn, T.-R. Traditional Chinese Medicines and Alzheimer's Disease. *Taiwan J Obstet Gynecol* **2011**, *50*, 131–135.
97. Wang, R.; Yan, H.; Tang, X. Progress in Studies of Huperzine A, a Natural Cholinesterase Inhibitor from Chinese Herbal Medicine¹. *Acta Pharmacologica Sinica* **2006**, *27*, 1–26.
98. Howes, M.-J.R.; Fang, R.; Houghton, P.J. Effect of Chinese Herbal Medicine on Alzheimer's Disease. *Int. Rev. Neurobiol.* **2017**, *135*, 29–56.
99. Shi, C.; Liu, J.; Wu, F.; Yew, D.T. Ginkgo Biloba Extract in Alzheimer's Disease: From Action Mechanisms to Medical Practice. *Int J Mol Sci* **2010**, *11*, 107–123.
100. Vranová, V. Fytofarmakologie Standardizovaného Extraktu z Listů Ginkgo Biloba EGb 761. *Neurologie pro praxi* **2018**, *19*, 19–21.
101. Jiráček, R. Extractum Ginkgo Biloba EGb761 a Jeho Využití v Psychiatrii. *Neurologie pro praxi* **2018**, *19*, 15–18.
102. Jang, J.-H.; Son, Y.; Kang, S.S.; Bae, C.-S.; Kim, J.-C.; Kim, S.-H.; Shin, T.; Moon, C. Neuropharmacological Potential of *Gastrodia Elata* Blume and Its Components. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* **2015**, *2015*, 1–14.
103. Liu, Y.; Gao, J.; Peng, M.; Meng, H.; Ma, H.; Cai, P.; Xu, Y.; Zhao, Q.; Si, G. A Review on Central Nervous System Effects of Gastrodin. *Front Pharmacol* **2018**, *9*.

104. Jiang, Y.; Gao, H.; Turdu, G. Traditional Chinese Medicinal Herbs as Potential AChE Inhibitors for Anti-Alzheimer's Disease: A Review. *Bioorg. Chem.* **2017**, *75*, 50–61.
105. Mandal, M.; Jaiswal, P.; Mishra, A. Role of Curcumin and Its Nanoformulations in Neurotherapeutics: A Comprehensive Review. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* **2020**, e22478.
106. Cai, Z.; Wang, C.; Yang, W. Role of Berberine in Alzheimer's Disease. *Neuropsychiatric Disease and Treatment* **2016**, *12*, 2509.
107. Ji, H.-F.; Shen, L. Berberine: A Potential Multipotent Natural Product to Combat Alzheimer's Disease. *Molecules* **2011**, *16*, 6732–6740.
108. Anand, R.; Gill, K.D.; Mahdi, A.A. Therapeutics of Alzheimer's Disease: Past, Present and Future. *Neuropharmacology* **2014**, *76 Pt A*, 27–50.
109. Kozin, S.A.; Barykin, E.P.; Mitkevich, V.A.; Makarov, A.A. Anti-Amyloid Therapy of Alzheimer's Disease: Current State and Prospects. *Biochemistry Mosc.* **2018**, *83*, 1057–1067.
110. Ricciarelli, R.; Fedele, E. The Amyloid Cascade Hypothesis in Alzheimer's Disease: It's Time to Change Our Mind. *Curr Neuropharmacol* **2017**, *15*, 926–935.
111. Inhibitory Gamma-Sekretázy v Terapii Alzheimerovej Choroby | ProLékaře.Cz Available online: <https://www.prolekare.cz/casopisy/ceska-slovenska-farmacie/2012-3-10/inhibitory-gamma-sekretazy-v-terapii-alzheimerovej-choroby-38551> (accessed on 20 April 2020).
112. Doody, R.S.; Raman, R.; Farlow, M.; Iwatsubo, T.; Vellas, B.; Joffe, S.; Kieburtz, K.; He, F.; Sun, X.; Thomas, R.G.; et al. A Phase 3 Trial of Semagacestat for Treatment of Alzheimer's Disease. *New England Journal of Medicine* **2013**, *369*, 341–350.
113. Wisniewski, T.; Goni, F. Immunotherapy for Alzheimer's Disease. *Biochem Pharmacol* **2014**, *88*, 499–507.
114. Babkova, K.; Korabecny, J.; Soukup, O.; Nepovimova, E.; Jun, D.; Kuca, K. Prolyl Oligopeptidase and Its Role in the Organism: Attention to the Most Promising and Clinically Relevant Inhibitors. *Future Med Chem* **2017**, *9*, 1015–1038.
115. Cahlíková, L.; Hulová, L.; Hrabínová, M.; Chlebek, J.; Hošťálková, A.; Adamcová, M.; Šafratová, M.; Jun, D.; Opletal, L.; Ločárek, M.; et al. Isoquinoline Alkaloids as Prolyl Oligopeptidase Inhibitors. *Fitoterapia* **2015**, *103*, 192–196.
116. Morain, P.; Robin, J.L.; De Nanteuil, G.; Jochemsen, R.; Heidet, V.; Guez, D. Pharmacodynamic and Pharmacokinetic Profile of S 17092, a New Orally Active Prolyl Endopeptidase Inhibitor, in Elderly Healthy Volunteers. A Phase I Study. *Br J Clin Pharmacol* **2000**, *50*, 350–359.

117. del Ser, T.; Steinwachs, K.C.; Gertz, H.J.; Andrés, M.V.; Gómez-Carrillo, B.; Medina, M.; Vericat, J.A.; Redondo, P.; Fleet, D.; León, T. Treatment of Alzheimer's Disease with the GSK-3 Inhibitor Tideglusib: A Pilot Study. *J. Alzheimers Dis.* **2013**, *33*, 205–215.
118. VINCA MINOR L. – Barvíněk Menší / Zimozeleň Menšia | BOTANY.Cz.
119. Rapini, A. Taxonomy “under Construction”: Advances in the Systematics of Apocynaceae, with Emphasis on the Brazilian Asclepiadoideae. *Rodriguésia* **2012**, *63*, 075–088.
120. Koyuncu, M. A New Species of Vinca (Apocynaceae) from Eastern Anatolia, Turkey Available online: [https://www.semanticscholar.org/paper/A-new-species-of-Vinca-\(Apocynaceae\)-from-eastern-Koyuncu/57e6f2d59c694a95480df39c2605c698382aa6e3](https://www.semanticscholar.org/paper/A-new-species-of-Vinca-(Apocynaceae)-from-eastern-Koyuncu/57e6f2d59c694a95480df39c2605c698382aa6e3) (accessed on 20 April 2020).
121. Koyuncu, M.; Ekşi, G.; Özkan, A.M.G. Vinca Ispartensis (Apocynaceae), a New Species from Turkey.; 2015.
122. De Luca, V.; Salim, V.; Levac, D.; Atsumi, S.M.; Yu, F. Discovery and Functional Analysis of Monoterpenoid Indole Alkaloid Pathways in Plants. *Meth. Enzymol.* **2012**, *515*, 207–229.
123. O'Connor, S.E.; Maresh, J.J. Chemistry and Biology of Monoterpene Indole Alkaloid Biosynthesis. *Nat Prod Rep* **2006**, *23*, 532–547.
124. Cheng, G.-G.; Zhao, Y.-L.; Zhang, Y.; Lunga, P.-K.; Hu, D.-B.; Li, Y.; Gu, J.; Song, C.-W.; Sun, W.-B.; Liu, Y.-P.; et al. Indole Alkaloids from Cultivated Vinca Major. *Tetrahedron* **2014**, *70*, 8723–8729.
125. Herbář Wendys - Vinca Minor - Barvíněk Menší Available online: <https://botanika.wendys.cz/index.php/14-herbar-rostlin/7-vinca-minor-barvinek-mensi,%2020.4.2019> (accessed on 20 April 2020).
126. Baloun, J.; Jahodář, L.; Leifertová, I.; Štípek, S. *Rostliny Způsobující Otravy a Alergie*; Avicenum: Praha, 1989;
127. Vinca Minor - Barvíněk Menší | Apocynaceae - Toješťovitě | Natura Bohemica Available online: <http://www.naturabohemica.cz/vinca-minor/> (accessed on 20 April 2020).
128. Kelley, B.J.; Knopman, D.S. Alternative Medicine and Alzheimer's Disease. *Neurologist* **2008**, *14*, 299–306.
129. Spilková, J. *Farmakognozie*; Karolinum: Praha, 2016; ISBN 978-80-246-3264-3.
130. Blaschek, W.; Hilgenfeldt, U.; Holzgrabe, U.; Reichling, J.; Ruth, P.; Schultz, V. *Hager ROM 2011: Hagers Enzyklopädie Der Arzneistoffe Und Drogen*; Springer Medizin Verlag: Heidelberg, 2011.

131. Rahman, M.T.; Tiruveedhula, V.V.N.P.B.; Cook, J.M. Synthesis of Bisindole Alkaloids from the Apocynaceae Which Contain a Macroline or Sarpagine Unit: A Review. *Molecules* **2016**, *21*.
132. Sottomayor, M.; Barceló, A.R. The Vinca Alkaloids: From Biosynthesis and Accumulation in Plant Cells, to Uptake, Activity and Metabolism in Animal Cells. In *Studies in Natural Products Chemistry*; Atta-ur-Rahman, Ed.; Studies in Natural Products Chemistry; Elsevier, 2006; Vol. 33, pp. 813–857.
133. Wei, X.; Khan, A.; Song, D.; Dai, Z.; Liu, Y.-P.; Yu, H.-F.; Wang, B.; Zhu, P.-F.; Ding, C.-F.; Zhao, X.-D.; et al. Three New Pyridine Alkaloids from Vinca Major Cultivated in Pakistan. *Nat Prod Bioprospect* **2017**, *7*, 323–327.
134. Namjoshi, O.A.; Cook, J.M. Sarpagine and Related Alkaloids. *Alkaloids Chem Biol* **2016**, *76*, 63–169.
135. Mokřý, J.; Kompiš, I. Vincaminoridine and Vincoridine, Two New Alkaloids from Vinca Minor L. *Naturwissenschaften* **1963**, *50*, 93–94.
136. Proksa, B.; Uhrín, D.; Grossmann, E.; Votický, Z. (-)-1-Norvincorine, a New Alkaloid from *Vinca Minor*. *Planta Med* **1987**, *53*, 120–120.
137. Yasui, Y.; Kinugawa, T.; Takemoto, Y. Synthetic Studies on Vincorine: Access to the 3a,8a-Dialkyl-1,2,3,3a,8,8a-Hexahydropyrrolo[2,3-b]Indole Skeleton. *Chem. Commun.* **2009**, 4275.
138. Tulyaganov, T.; Nigmatullaev, A. Alkaloids of Vinca Minor. *Chemistry of Natural Compounds - CHEM NAT COMPD* **2000**, *36*, 540–540.
139. Farnsworth, N.R.; Sager, R.W.; Bianculli, J.A.; Draus, F.J. Studies on Vinca Major L. (Apocynaceae) I**University of Pittsburgh, School of Pharmacy, Pittsburgh 13, Pa. *Journal of the American Pharmaceutical Association (Scientific ed.)* **1960**, *49*, 589–591.
140. Balsevich, J.; Constabel, F.; Kurz, W. Alkaloids of *Vinca Major* Cv. *Variegata* *. *Planta Med* **1982**, *44*, 91–93.
141. Adizov, S.; Tashkhodjaev, B. Indole Alkaloids from Vinca Erecta Type of Sarpagine and Ajmaline. *Eur. J. Chem.* **2019**, *10*, 409–416.
142. Lounasmaa, M.; Hanhinen, P. The ajmaline group of indole alkaloids. In *The Alkaloids: Chemistry and Biology*; Elsevier, 2001; Vol. 55, pp. 1–87 ISBN 978-0-12-469555-9.
143. Saxton, J.E. *Indoles, Part 4: The Monoterpenoid Indole Alkaloids*; John Wiley & Sons, 2009; ISBN 978-0-470-18844-6.
144. Saxton, J.E. Chapter 7 Alkaloids of Picralima Nitida. In *The Alkaloids: Chemistry and Physiology*; Elsevier, 1965; Vol. 8, pp. 119–157 ISBN 978-0-12-469508-5.

145. Singh, S.; Kanwar, S.S. Antilipase Activity Guided Fractionation of *Vinca Major*. *Journal of King Saud University - Science* **2018**, *30*, 433–439.
146. Levac, D.; Cázares, P.; Yu, F.; De Luca, V. A Picrinine N-Methyltransferase Belongs to a New Family of γ -Tocopherol-Like Methyltransferases Found in Medicinal Plants That Make Biologically Active Monoterpenoid Indole Alkaloids¹[OPEN]. *Plant Physiol* **2016**, *170*, 1935–1944.
147. Hamdiani, S.; Al-As'ari, M.; Satriani, A.R.; Hadi, S. Alkaloids from Pulau (Alstonia Scholaris (L.) R. Br.) Leaves of Lombok Island on the Basis of GC-MS Analysis.; Bali, Indonesia, 2018; p. 020091.
148. Döpke, W. Chapter 2 The Eburnamine-Vincamine Alkaloids. In *The Alkaloids: Chemistry and Physiology*; Elsevier, 1981; Vol. 20, pp. 297–332 ISBN 978-0-12-469520-7.
149. Smeyers, Y.G.; Smeyers, N.J.; Randez, J.J.; Hernandez-Laguna, A.; Galvez-Ruano, E. A Structural and Pharmacological Study of Alkaloids of *Vinca Minor*. *Mol Eng* **1991**, *1*, 153–160.
150. Abouzeid, S.; Beutling, U.; Surup, F.; Abdel Bar, F.M.; Amer, M.M.; Badria, F.A.; Yahyazadeh, M.; Brönstrup, M.; Selmar, D. Treatment of *Vinca Minor* Leaves with Methyl Jasmonate Extensively Alters the Pattern and Composition of Indole Alkaloids. *J. Nat. Prod.* **2017**, *80*, 2905–2909.
151. Döpke, W.; Meisel, H. [16-methoxyvincadifformin, a new alkaloid from *Vinca minor*]. *Pharmazie* **1968**, *23*, 521–522.
152. Saroya, A.S. *Annotated Bibliography of Phytochemicals*; Scientific Publishers, 2006; ISBN 978-93-87741-49-2.
153. Malikov, V.M.; Yunusov, S.Yu. *Vinca* Alkaloids. *Chem Nat Compd* **1977**, *13*, 497–512.
154. Liu, L.; Chen, Y.-Y.; Qin, X.-J.; Wang, B.; Jin, Q.; Liu, Y.-P.; Luo, X.-D. Antibacterial Monoterpenoid Indole Alkaloids from *Alstonia Scholaris* Cultivated in Temperate Zone. *Fitoterapia* **2015**, *105*, 160–164.
155. Horning, B.D.; MacMillan, D.W.C. Nine-Step Enantioselective Total Synthesis of (–)-Vincorine. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 6442–6445.
156. Ban, Y.; Murakami, Y.; Iwasawa, Y.; Tsuchiya, M.; Takano, N. Indole Alkaloids in Medicine. *Med. Res. Rev.* **1988**, *8*, 231–308.
157. Mustofa, M.; Mallié, M.; Valentin, A.; Lewin, G. In Vitro Antiplasmodial Activity and Cytotoxicity of Vincadifformine and Its Semisynthetic Derivatives. *Indonesian Journal of Biotechnology* **2006**, *11*, 878–883.

158. Menzies, J.R.W.; Paterson, S.J.; Duwiejua, M.; Corbett, A.D. Opioid Activity of Alkaloids Extracted from *Picralima Nitida* (Fam. Apocynaceae). *European Journal of Pharmacology* **1998**, *350*, 101–108.
159. Gülçin, I.; Beydemiç, Ş.; Topal, F.; Gagua, N.; Bakuridze, A.D.; Bayram, R.; Gepdiremen, A. Apoptotic, Antioxidant and Antiradical Effects of Majdine and Isomajdine from *Vinca Herbacea* Waldst. and Kit. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry* **2012**.
160. Soares, P.R.O.; de Oliveira, P.L.; de Oliveira, C.M.A.; Kato, L.; Guillo, L.A. In Vitro Antiproliferative Effects of the Indole Alkaloid Vallesiachotamine on Human Melanoma Cells. *Arch. Pharm. Res.* **2012**, *35*, 565–571.
161. Nemes, A. Eburnamine/Vincamine Alkaloids. In; 2006; pp. 43–76.
162. Guo, D.; Lu, X.; Xu, X.; Gou, H.; Wang, Z.; Cao, Y.; Luo, X. Therapeutic Effect of Vinorine on Sciatic Nerve Injured Rat. *Neurochem Res* **2018**, *43*, 375–386.
163. Vas, A.; Gulyás, B. Eburnamine Derivatives and the Brain. *Med Res Rev* **2005**, *25*, 737–757.
164. Erdo, S.A.; Molnár, P.; Lakics, V.; Bence, J.Z.; Tömösközi, Z. Vincamine and Vincanol Are Potent Blockers of Voltage-Gated Na⁺ Channels. *Eur. J. Pharmacol.* **1996**, *314*, 69–73.
165. Abdel-Salam, O.M.E.; Hamdy, S.M.; Seadawy, S.A.M.; Galal, A.F.; Abouelfadl, D.M.; Atrees, S.S. Effect of Piracetam, Vincamine, Vinpocetine, and Donepezil on Oxidative Stress and Neurodegeneration Induced by Aluminum Chloride in Rats. *Comp Clin Pathol* **2016**, *25*, 305–318.
166. Patyar, S.; Prakash, A.; Modi, M.; Medhi, B. Role of Vinpocetine in Cerebrovascular Diseases. *Pharmacol Rep* **2011**, *63*, 618–628.
167. Státní Ústav pro Kontrolu Léčiv Available online: <http://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?kod=0197105> (accessed on 20 April 2020).
168. Stahl, E. *Thin-Layer Chromatography. A Laboratory Handbook. 2 End Ed.*; Springer-Verlag: Berlin, Heidelberg/New York, 1969.
169. *Československý Lékopis, Vyd. 3., Díl I.*; Avicenum: Praha, 1971;
170. Ellman, G.L.; Courtney, K.D.; Andres, V.; Featherstone, R.M. A New and Rapid Colorimetric Determination of Acetylcholinesterase Activity. *Biochemical Pharmacology* **1961**, *7*, 88–95.

171. Baki, A.; Bielik, A.; Molnár, L.; Szendrei, G.; Keserü, G.M. A High Throughput Luminescent Assay for Glycogen Synthase Kinase-3 β Inhibitors. *ASSAY and Drug Development Technologies* **2007**, *5*, 75–84.
172. Hulcová, D.; Breiterová, K.; Siatka, T.; Klímová, K.; Davani, L.; Šafratová, M.; Hošťálková, A.; De Simone, A.; Andrisano, V.; Cahlíková, L. Amaryllidaceae Alkaloids as Potential Glycogen Synthase Kinase-3 β Inhibitors. *Molecules* **2018**, *23*, 719.
173. Smith, J.M.; Moreno, J.; Boal, B.W.; Garg, N.K. Total Synthesis of the Akuammiline Alkaloid Picrinine. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 4504–4507.
174. Boža, M.; Kolak, U.; Topçu, G.; Bahadori, F.; Kartal, M.; Farnsworth, N.R. Two New Indole Alkaloids from *Vinca Herbacea* L. *Phytochemistry Letters* **2011**, *4*, 399–403
175. Heravi, M.M.; Rohani, S.; Zadsirjan, V.; Zahedi, N. Fischer Indole Synthesis Applied to the Total Synthesis of Natural Products. *RSC Adv.* **2017**, *7*, 52852–52887.
176. Mohammed, A.E.; Abdul-Hameed, Z.H.; Alotaibi, M.O.; Bawakid, N.O.; Sobahi, T.R.; Abdel-Lateff, A.; Alarif, W.M. Chemical Diversity and Bioactivities of Monoterpene Indole Alkaloids (MIAs) from Six Apocynaceae Genera. *Molecules* **2021**, *26*, 488.
177. Hu, W.L.; Hesse, M. The Alkaloids of *Melodinus Acutiflorus*. Rhyzicine N-Oxide. *Planta Med* **1988**, *54*, 235–236.

8. ABSTRAKT

Pavuková, S.: Alkaloidy *Vinca minor* L. a ich biologická aktivita II. Diplomová práca, Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra farmaceutickej botaniky, Hradec Králové 2021.

Vinca minor L. je druh kvitnúceho polokru, pôvodom hlavne zo strednej a južnej Európy, ktorý obsahuje viac než 50 indolových alkaloidov. Pri screeningu potenciálnych rastlinných inhibítorov namierených proti ľudskej AChE a BuChE, preukázal alkaloidný extrakt zo sušených nadzemných častí *Vinca minor* silnú a selektívnu inhibičnú aktivitu namierenú voči BuChE s hodnotou IC_{50} $13,60 \pm 0,83$ $\mu\text{g/ml}$ avšak proti AChE bol neaktívny (hodnota $IC_{50} > 100$ $\mu\text{g/ml}$). Vybraná frakcia VM 323 – 327 (4,72 g) bola rozdelená pomocou stĺpcovej chromatografie na silikagelu stupňovitou elúciou za použitia chloroformu a etanolu a celkovo sa získalo 7 spojených frakcií. Opakovaná preparatívna TLC na silikagelu viedla k izolácii troch zlúčenín; novo vyizolovanej látky SP-1, (–)-pikrininu (SP-2) a deacetylakuammilinu (SP-3). K objasneniu ich štruktúry bola použitá hmotnostná spektrometria (ESI), NMR a optická otáčavosť. Izolované alkaloidy boli podrobené testom inhibičných aktivít voči AChE, BuChE, POP a GSK-3 β , enzýmom zohrávajúcim dôležitú úlohu v patofyziológii AD. Ukázalo sa, že všetky izolované látky boli v porovnaní so štandardmi takmer neúčinné voči spomínaným enzýmom. (–)-pikrinin (SP-2) je v porovnaní s referenčnými látkami; AChE ($IC_{50} > 100$), BuChE ($IC_{50} > 100$) a POP (IC_{50} 460 ± 22) neaktívny. Ani inhibícia voči GSK-3 β (% inhibícia = $66,39 \pm 8,37$) nebola v porovnaní so štandardom dostačujúca. Podobne aj zlúčeniny SP-1 a deacetylakuammilin (SP-3) nevykazovali inhibičné vlastnosti voči AChE_{SP-1,SP-3} ($IC_{50} > 100$), BuChE_{SP-1,SP-3} ($IC_{50} > 100$), POP_{SP-3} (IC_{50} 445 ± 28) a GSK-3 β _{SP-1} (% inhibícia = $76,85 \pm 0,99$) GSK-3 β _{SP-3} (% inhibícia = $84,17 \pm 4,97$). Látka SP-1 vzhľadom k nedostatočnému izolovanému množstvu nebola podrobená testovaniu voči POP.

Táto diplomová práca bola podporovaná grantom SVV 260 548.

Kľúčové slová: *Vinca minor* L., indolové alkaloidy, butyrylcholinesteráza, prolyloligopeptidáza, glykogénsyntáza kináza-3, Alzheimerova choroba

9. ABSTRACT

Pavuková, S.: *Vinca minor* L. alkaloids and their biological activity II. Diploma thesis, Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Department of Pharmaceutical Botany, Hradec Králové 2020.

Vinca minor L. is a species of species of flowering plant, native mainly to central and southern Europe, which contains more than 50 indole alkaloids. During screening of potential plant inhibitors against human acetylcholinesterase (hAChE) and butyrylcholinesterase (hBChE) at our department, an alkaloidal extract from dried aerial parts of *Vinca minor* demonstrated strong and selective hBChE inhibitory activity with an IC_{50} value of $13.60 \pm 0.83 \mu\text{g/mL}$, however, against hAChE was inactive (IC_{50} value $>100 \mu\text{g/mL}$). The fraction VM 323 – 327 (4,72 g) was separated by column chromatography on silica gel again with stepwise elution by using chloroform and ethanol and overall 7 joined fractions were obtained. Subsequently, repeated preparative TLC on silica gel led to isolation of three compounds; the newly isolated substance SP-1, (–)-picrinine (SP-2) and deacetylakuammiline (SP-3). Their structures were elucidated with mass spectrometry (ESI), NMR and optical rotation. Isolated alkaloids were tested on ability to inhibit AChE, BuChE, POP and GSK-3 β , which are enzymes playing an important role in pathophysiology of Alzheimer's disease. It turned out that isolated alkaloids are inactive against mentioned enzymes. (–)-picrinine is inactive compared to reference substances AChE ($IC_{50} > 100$), BuChE ($IC_{50} > 100$) and POP ($IC_{50} 460 \pm 22$). Even inhibition against GSK-3 β (% inhibition = 66.39 ± 8.37) was insufficient compared to the standard. Compounds SP-1 and SP-3 also did not show inhibitory properties against AChE_{SP-1,SP-3} ($IC_{50} > 100$), BuChE_{SP-1,SP-3} ($IC_{50} > 100$), POP_{SP-3} ($IC_{50} 445 \pm 28$) and GSK-3 β _{SP-1} (% inhibition = 76.85 ± 0.99), GSK-3 β _{SP-3} (% inhibition = 84.17 ± 4.97). SP-1 was not tested for POP due to insufficient isolation quantity.

The study was supported by the grant SVV 260 548.

Keywords: *Vinca minor* L., indole alkaloids, butyrylcholinesterase, prolyl oligopeptidase, glycogen synthase kinase-3, Alzheimer's disease