

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA FARMACEUTICKÉ BOTANIKY

DIPLOMOVÁ PRÁCE

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

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

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

CHARLES UNIVERSITY
FACULTY OF FARMACY
DEPARTMENT OF PHARMACEUTICAL BOTANY

DIPLOMA THESIS

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

Supervisor: PharmDr. Jakub Chlebek, Ph.D.

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

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych zde chtěla poděkovat zejména svému školiteli PharmDr. Jakubovi Chlebkovi, Ph.D., za podmětné rady, které mi věnoval k této práci, obětovaný čas a také za jeho odborné vedení mé diplomové práce. Taktéž bych zde chtěla poděkovat Mgr. Elišce Kohelové za výpomoc, vstřícnost a obětavost během práce v laboratoři. Následně bych chtěla poděkovat PharmDr. Daniele Hůlcové, Ph.D., za změření cholinesterasové inhibice sloučenin, RNDr. Radimu Havelkovi, Ph.D. za změření cytotoxicity a také Mgr. Janě Maříkové, Ph.D., za interpretaci NMR spekter. V neposlední řadě děkuji také Katedře farmaceutické botaniky, že jsem zde mohla vypracovat diplomovou práci.

Zároveň děkuji celé mé rodině za její podporu.

PROHLÁŠENÍ

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

V Hradci Králové, květen 2021

Veronika Hojgrová

Obsah

| | |
|--|----|
| PŘEHLED OBRÁZKŮ | 7 |
| PŘEHLED TABULEK..... | 8 |
| SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK | 9 |
| 1 ÚVOD | 10 |
| 2 CÍL PRÁCE..... | 12 |
| 3 TEORETICKÁ ČÁST | 13 |
| 3.1 Alzheimerova choroba | 13 |
| 3.1.1 Epidemiologie | 13 |
| 3.1.2 Klinický obraz | 13 |
| 3.1.3 Patogeneze | 14 |
| 3.1.4 Diagnóza | 18 |
| 3.1.5 Léčba Alzheimerovy choroby..... | 18 |
| 3.2 Nádorová onemocnění..... | 25 |
| 3.2.1 Přírodní látky..... | 25 |
| 3.3 <i>Vinca minor</i> L. – barvínek menší | 30 |
| 3.3.1 Taxonomické zařazení | 30 |
| 3.3.2 Botanická charakteristika | 30 |
| 3.3.3 Další druhy v rodu <i>Vinca</i> L. | 32 |
| 3.3.4 Obsahové látky <i>Vinca minor</i> L..... | 34 |
| 4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST | 40 |
| 4.1 Přístroje a materiál..... | 40 |
| 4.1.1 Rozpouštědla a chemikálie | 40 |
| 4.1.2 Pomocný materiál..... | 40 |
| 4.1.3 Detekační činidla..... | 40 |
| 4.1.4 Vytvářející soustavy pro tenkovrstvou chromatografii | 41 |
| 4.1.5 Chromatografické adsorbenty..... | 41 |
| 4.1.6 Přístroje..... | 41 |
| 4.2. Metody – obecné postupy | 42 |
| 4.2.1 Příprava a čištění rozpouštědel | 42 |
| 4.2.2 Odpařování rozpouštědel | 42 |
| 4.2.3 Sušení a skladování | 42 |
| 4.2.4 Tenkovrstvá chromatografie | 42 |
| 4.2.5 Detekce alkaloidů | 43 |
| 4.2.6 EI-MS analýza..... | 43 |

| | |
|---|----|
| 4.2.7 LC-MS analýza | 43 |
| 4.2.8 NMR analýza | 44 |
| 4.2.9 Optická otáčivost | 44 |
| 4.3 Izolace alkaloidů | 45 |
| 4.3.1 Postup izolace alkaloidů z vybrané frakce VM 215–258 | 45 |
| 4.3.2 Izolace alkaloidů z dílčích podfrakcí..... | 45 |
| 4.4 Testování biologické aktivity izolovaných alkaloidů | 48 |
| 4.4.1 Stanovení cholinesterasové inhibiční aktivity | 48 |
| 4.4.2 Stanovení inhibiční aktivity prolyloligopeptidasy | 51 |
| 4.4.3 Stanovení cytotoxicity..... | 52 |
| 5 VÝSLEDKY | 54 |
| 5.1. Strukturní analýza | 54 |
| 5.1.1. VH-1 (nová sloučenina)..... | 54 |
| 5.1.2 VH-2: (–)-Raukubainin..... | 55 |
| 5.2 Biologická aktivita | 56 |
| 5.2.1 Inhibice lidských cholinesteras a prolyloligopeptidasy..... | 56 |
| 5.3 Cytotoxicita | 56 |
| 6 DISKUZE | 57 |
| 7 ABSTRAKT | 59 |
| 8 ABSTRACT | 60 |
| 9 LITERATURA..... | 61 |

PŘEHLED OBRÁZKŮ

| | |
|--|----|
| Obrázek 1: vzorec rivastigminu | 19 |
| Obrázek 2: vzorec galantaminu | 20 |
| Obrázek 3: vzorec donepezilu | 20 |
| Obrázek 4: vzorec huperzinu A..... | 21 |
| Obrázek 5: vzorec memantinu | 22 |
| Obrázek 6: vzorec vinpocetinu | 22 |
| Obrázek 7: procentuální zastoupení látek přírodního původu u vybraných onemocnění..... | 26 |
| Obrázek 8: vzorec vinblastinu | 27 |
| Obrázek 9: vzorec vinkristinu | 27 |
| Obrázek 10: vzorec vindesinu..... | 28 |
| Obrázek 11: vzorec vinfluninu | 28 |
| Obrázek 12: vzorec vinorelbinu..... | 29 |
| Obrázek 13: <i>Vinca minor</i> L..... | 30 |
| Obrázek 14: <i>Vinca minor</i> L. – rostlina..... | 31 |
| Obrázek 15: <i>Vinca minor</i> L. – květ..... | 31 |
| Obrázek 16: <i>Vinca minor</i> L. – list | 31 |
| Obrázek 17: <i>Vinca minor</i> L. – porost | 31 |
| Obrázek 18: <i>Vinca difformis</i> Pourr | 33 |
| Obrázek 19: <i>Vinca erecta</i> Regel & Schmalh. | 33 |
| Obrázek 20: <i>Vinca herbacea</i> Waldst. & Kit..... | 34 |
| Obrázek 21: <i>Vinca ispartensis</i> Koyuncu & Eksi | 34 |
| Obrázek 22: <i>Vinca major</i> L..... | 34 |
| Obrázek 23: <i>Vinca soneri</i> Koyuncu | 34 |
| Obrázek 24: vzorec vinorinu..... | 35 |
| Obrázek 25: vzorec pikrininu | 36 |
| Obrázek 26: vzorec 10-methoxydesacetylakuammilinu | 36 |
| Obrázek 27: vzorec desacetylakuammilinu..... | 36 |
| Obrázek 28: vzorec vinkaminu | 37 |
| Obrázek 29: vzorec (±)-eburnamoninu | 37 |
| Obrázek 30: vzorec vincininu..... | 37 |
| Obrázek 31: vzorec (±)-vinkatinu..... | 37 |
| Obrázek 32: vzorec vineru | 37 |
| Obrázek 33: vzorec majdinu | 37 |
| Obrázek 34: vzorec vinkoridinu | 38 |
| Obrázek 35: vzorec vinkorinu | 38 |
| Obrázek 36: vzorec vinkaminu (striktaminu) | 38 |
| Obrázek 37: vzorec vinkarubinu | 38 |
| Obrázek 38: vzorec vinkaminu | 39 |
| Obrázek 39: kontrolní TLC frakce VM 34-41/1 | 46 |
| Obrázek 40: kontrolní TLC frakce VM 34-41/2 | 46 |
| Obrázek 41: TLC frakce VM-87-113..... | 47 |
| Obrázek 42: vzorec VH-1 | 54 |
| Obrázek 43: vzorec VH-2 raukubainin | 55 |

PŘEHLED TABULEK

| | |
|---|----|
| Tabulka 1: zařazení <i>Vinca minor</i> L. taxonomicky | 30 |
| Tabulka 2: vybrané alkaloidy <i>Vinca minor</i> L. | 35 |
| Tabulka 3: biologická aktivita dalších alkaloidů..... | 39 |
| Tabulka 4: výsledky inhibice testovaných látek | 56 |

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

| | |
|---------------|--|
| AD | Alzheimer´s disease, Alzheimerova choroba |
| ADINACO | Alzheimer´s Disease and Natural Compounds |
| ACh | acetylcholin |
| AChE | acetylcholinesterasa |
| aMCI | amnestická mírná kognitivní porucha |
| Apo-E | apolipoprotein E |
| APP | amyloidní prekurzorový protein |
| ATP | adenosintrifosfát |
| A β | β -amyloidní protein |
| BuChE | butyrylcholinesterasa |
| CDK-5 | cyklin-dependentní kinasa 5 |
| CNS | centrální nervová soustava |
| GSK-3 β | glykogensyntasa-kinasa 3 β |
| IACHe | inhibitory acetylcholinesteras |
| MAPT | mikrotubulární τ -protein |
| MRI | magnetic resonance imaging, magnetická rezonance |
| MMSE | krátká škála mentálního stavu |
| NINCDS-ADRA | National Institute of Neurological and Communicative Disorders – Alzheimer´s Disease and Related Dementias Association |
| NMDA | <i>N</i> -methyl-D-aspartátový receptor |
| POP | prolyloligopeptidasa |
| TLC | chromatografie na tenké vrstvě |

1 ÚVOD

Během 20. století došlo u průmyslově rozvinutých zemí díky pokroku medicíny a farmaceutického průmyslu k poklesu závažných průběhů akutních a infekčních onemocnění a bohužel, k zřetelnému nárůstu takzvaných civilizačních chorob.¹ Tento termín označení je spojován s výrazným rozvojem nejrůznějších technologií, potravinářství a průmyslem.² Významnou roli pro vznik civilizačních onemocnění hraje životní prostředí, životní styl lidí, přičemž rozhodující vliv mají sociální faktory. Mezi civilizační nemoci se řadí ateroskleróza, alergie, astma, cévní mozková příhoda, diabetes mellitus, infarkt myokardu, hypertenze, obezita, revmatoidní artritida, osteoporóza, žlučové a ledvinové kameny, migréna, předčasné stárnutí, deprese, Alzheimerova choroba (AD) a také nádorová onemocnění.¹ Vědecká skupina ADINACO, která působí pod záštitou katedry farmaceutické botaniky, se zabývá dlouhodobě výzkumem sekundárních metabolitů izolovaných z rostlin a hub, jež mohou mít potencionální využití při léčbě AD a proti nádorovému bujení.³

Lidstvo postupně stárne. Jedná se o celosvětový trend, který se týká taktéž České republiky. Jak lidská populace stárne, tím častěji se u ní objevují hlavně zdravotní, sociální a narůstá ekonomická zátěž státu.⁴ Mezi nejčastější a nejobávanější nemoci, které se vyskytují u lidí ve vyšším věku, patří demence. Základní rozpoznávací znaky této nemoci jsou snížená až omezená schopnost vykonávat činnosti, člověk přestává chápat okolní dění a stává se závislý na neustálé ošetrovatelské péči. Uvádí se, že lidská populace trpí demencí více jak z 6 % nad 65 let, s přibývajícím věkem procento vzrůstá exponenciálně nad 80 let je to více jak 50 %. Studie uvádí, že víc jak polovina všech demencí je způsobena AD.⁵

AD je ireverzibilní a neurodegenerativní onemocnění s vysokou progresí zasahující do života pacienta a následně do celé jeho rodiny. Typickým rysem této nemoci je jeho nenápadný začátek, kterého si spíše povšimne pacientovo blízké okolí než pacient sám. Onemocnění končí letálně, jedná se o čtvrtou až pátou nejčastější příčinu smrti v lidské populaci.⁶ Pacienti umírají nejčastěji v důsledku neurodegenerace na bronchopneumonii, na úrazy a další příčiny, na které by jinak člověk bez AD reálně nezemřel. Celkově selhává neurohumorální řízení homeostázy, adaptabilita organismu a dochází k imunitní odpovědi.⁷

Spektrum používaných léčiv, které jsou v současné době schváleny na léčbu AD, je velmi omezené. Prozatím nemáme žádnou kauzální léčbu, pouze léky, která pomáhají

oddálit těžká stádia tohoto onemocnění.⁸ První skupinou léčiv, která zmírňují progresi a symptomy patří inhibitory acetylcholinesterasy (AChE) a butyrylcholinesterasy (BuChE). Do této skupiny řadíme rivastigmin, působící na oba enzymy, dalšími látkami jsou galantamin a donepezil působící selektivně na AChE. Druhá skupina zahrnuje antagonisty *N*-methyl-D-aspartátových receptorů (NMDA) a zahrnuje pouze jednu látku (memantin), který působí jako nekompetitivní antagonistu při nadměrné receptorové aktivaci.⁹

Nádorová onemocnění jsou dalším celosvětovým významným problémem, která mají každý rok na svědomí úmrtí milionů lidí po celém světě. V současné době jim patří druhá příčka v nejčastějších případech smrti v lidské populaci. Předpokládá se, že v příštích několika letech překonají srdeční onemocnění, která jsou nejčastějším příčinou úmrtí.¹⁰ Alkaloidy rostlinného původu, mezi které řadíme i *Vinca* alkaloidy, jsou nedílnou součástí léčby u maligních onemocnění.¹¹ Z *Vinca* alkaloidů se terapeuticky nejčastěji využívají u nádorových onemocnění vinkristin a vinblastin.¹²

Tato diplomová práce je zaměřena na izolaci alkaloidů z *Vinca minor* L. (barvínku menšího) a testování jejich biologické aktivity vzhledem k AD a nádorovým onemocněním.

2 CÍL PRÁCE

Cílem mojí diplomové práce bylo:

- vypracování odborné rešerše,
- izolace jednoho či více alkaloidů v čisté formě z vybrané frakce získané na chromatografickém sloupci ze sumárního alkaloidního extraktu z *Vinca minor* L. (Apocynaceae),
- podílet se na identifikaci obsahových látek pomocí spektrálních a spektrometrických metod (MS, NMR, změření optické otáčivosti),
- podílet se na přípravě vzorků pro biologické testy *in vitro* – inhibice lidských cholinesteras, prolyloligopeptidasy a cytotoxicita,
- vyhodnocení všech dat a sepsání diplomové práce.

3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Alzheimerova choroba

Jde o velmi progresivní neurodegenerativní onemocnění, u něhož dochází k degeneraci a destrukci neuronů, zejména cholinergního systému. Typickým nálezem u nemocných lidí je výskyt extracelulárních senilních plaků a intracelulárních depozit neurofibrilárních klubek.¹³ Onemocnění bylo popsáno německým neuropatologem Aloisem Alzheimerem na setkání společnosti jihoněmeckých psychiatrů v Tübingenu 3. listopadu 1906, o rok poté, již nesla tato nemoc jeho jméno.¹⁴ Rozlišují se dvě formy AD. První méně častá je familiární forma, která činí 5–10 % všech případů tohoto onemocnění. Familiární forma se rozděluje na dvě části, s časným začátkem do 60 let roku života a s pozdním začátkem nad 60 let. Druhou formou je forma sporadická (90–95 %), která se vyskytuje bez rodinného prokazatelného výskytu.¹⁵ Jedny z příčin sporadické formy AD jsou vysoký věk pacienta, nadměrný příjem kalorií, nasycené tuky ve stravě, hypertriglyceridemie, metabolický syndrom, hypertenze a diabetes mellitus typu 2.¹⁶

3.1.1 Epidemiologie

Počet lidí ve světě s demencí neustále narůstá. Odhaduje se, že v roce 2020 bylo postiženo demencí v České republice okolo 183 tisíc pacientů. Jedná se pouze o odhad, neboť zdaleka ne všichni lidé trpící touto demencí, měli nemoc diagnostikovanou. Mezinárodní organizace uvádí, že i nejvyspělejší státy světa nejsou schopny přesně diagnostikovat pacienty, a proto stále zůstává přibližně polovina nediagnostikovaných pacientů. Rozvojové státy světa jsou schopny podchytit méně než 10 % pacientů ze všech, kteří trpí demencí. Obecně lze říct, že v České republice více jak dvě třetiny lidí trpící demencí, jsou ženského pohlaví.¹⁷

Současný celosvětový odhad lidí trpící AD je okolo 35 milionů, do roku 2050 se počítá, že takto onemocněno může být až 115 milionů lidí.¹⁸

3.1.2 Klinický obraz

Pro správnou léčbu demence a její odlišení od dalších poruch je nezbytné, aby se pacienti včas diagnostikovali.¹⁹ Onemocnění začíná pozvolna, někdy se nesprávně zaměňuje jako projevy stárnutí. Díky tomu, že pacienti zapomínají, co například právě chtěli udělat, zapomínají na

osobní věci či schůzky. Nejprve je postižena krátkodobá epizodická paměť, týkající se prožitých událostí z osobního života. Postupnou progresí onemocnění dochází k poruše sémantické paměti – vědomostí a pojmů. ⁷

AD se projevuje kognitivními a nekognitivními poruchami. Kognitivní poruchy se objevují spíše na začátku onemocnění a ovlivňují paměť pacienta. Řadí se sem například poruchy vizuospeciálních funkcí, afázie, apraxie a agnozie. Nekognitivní poruchy se označují také jako behaviorální poruchy. Tyto poruchy mohou způsobit nemilé potíže pacientovi, jeho ošetřovateli nebo lidem v jeho blízkém okolí. Mezi ně řadíme například toulání, agresivitu, vokalizaci, poruchy stravování, halucinace a bludy. ²⁰

Stádium, které předchází AD, se označuje jako amnestická mírná kognitivní porucha (aMCI), jejímž typickým projevem je různý typ poškození paměti, ale zatím se zachovalou soběstačností. Přibližně 15 % lidí s aMCI progreduje do AD za jeden rok. ²¹ AD se rozlišuje na tři stádia a to: lehkou, střední a těžkou demenci. Většinou dochází k plynulému zhoršování bez větších výkyvů. V těžkém stádiu demence je pacient zcela dezorientován, nepoznává svůj byt a ani lidi v jeho blízkém okolí, a dokonce ani sám sebe. Pacient je upoután na lůžko, neudrží moč či stolici. ²² Obvykle od prvních příznaků po smrt uplyne okolo 7 až 10 let. U lidí v mladším věku byla shledána doba přežití okolo 15 a více let. ⁴

3.1.3 Patogeneze

Příčinou, proč vzniká AD, se věda zabývá od 2. poloviny 20. století. Zrodilo se několik teorií tohoto onemocnění – cholinerní, amyloidní a teorie τ -proteinu. Často se začíná vyskytovat teorie, že AD je ve skutečnosti metabolickou chorobou, jejíž příčinou je nezdravý životní styl stravování. Hovoří se jako o diabetu 3. typu se sníženou citlivostí inzulinu v mozku. ¹⁸ V současné době je léčba AD omezena pouze na symptomatické podávání léků, protože doposud není přesně známa podstata patofyziologie AD a i mechanismus neurodegenerace. ²³

Díky magnetické rezonanci (MRI), jsme schopni zjistit patologické změny v mozku, která se vyskytující u AD dřív, než je potvrzena samotná diagnóza pomocí klinických příznaků. Mezi tyto patologické změny patří atrofie hypokampu a entorinální kůry, úbytek cholinerních neuronů v mozkové kůře a také snížený počet cholinerních neuronů v nukleus basalis Meynerti. Dalšími patologickými známkami v mozku jsou tyto dva biomarkery: neurofibrilární

klubíčka (tangles), tvořena z části hyperfosforylovaným τ -proteinem, který se váže k mikrotubulům a extracelulární senilní plaky, tvořené hlavně β -amyloidem ($A\beta$), jež obklopují alterovaná nervová vlákna a reaktivní gliové buňky. ²⁴

3.1.3.1 Cholinergní hypotéza

Pro správnou funkci mozku a plného vědomí je nutné, aby byla zachována funkce cholinergního systému. ²⁵ Cholinergní systém má vliv na vývoj a aktivitu mozkové kůry, podílí se na průtoku krve v mozku, na spánkovém cyklu, učení, paměti a poznávání. ²⁶ Cholinergní systém je jedno z prvních poškozených míst u AD, během něhož dochází ke snížení neuromediátoru acetylcholinu (ACh). ²⁵ Příčinou sníženého úbytku ACh je snížení syntézy enzymu cholinacetyltransferasy, která je v organismu zodpovědná za jeho tvorbu. V synaptické štěrbině je ACh odbouráván enzymem AChE a BuChE. ²⁷ Tyto dva enzymy se liší ve specifitě substrátu, v kinetice a hlavně v aktivitě v různých oblastech mozku. ²⁶ Rozdíly mezi vlastnostmi enzymů AChE a BuChE v mozku vedly k závěru, že v normálním stavu mozku je přirozeně se vyskytující AChE zodpovědná za degradaci ACh, přičemž BuChE má podpůrnou funkci a vyskytuje se v menší míře. Zajímavé je, že během AD BuChE progresivně stoupá, hlavně v oblasti akumulace patologického $A\beta$. ²⁷ Hlavním cílem této hypotézy je inhibice AChE, inhibice BuChE není ještě plně objasněna, i když ji lze považovat za platný přístup k obnovení cholinergní funkce u lidí s AD. ²⁶ Cholinergní deficit přispívá ke kognitivním poruchám ovlivňující pozornost, koncentraci a nemálo i chování u pacientů s AD. ²⁷ Díky této teorii se zavedly do praxe inhibitory acetylcholinesterasy (IACHE). ¹⁸

3.1.3.2 β -Amyloidní hypotéza

Podstatou této hypotézy je, že se v senilních placích nachází $A\beta$ v agregované formě. $A\beta$ vzniká štěpením amyloidového prekurzoru proteinu (APP) β -sekretasou a následně γ -sekretasou. Za fyziologických podmínek se nachází v mozku α -sekretasa, která má schopnost vytvářet z APP solubilní neamyloidní fragmenty, jež vykazují neuroprotektivní funkci. ^{13,25} Mutace na lidském 21. chromozomu způsobuje tvorbu $A\beta$. $A\beta$ se intenzivně secernuje z buněk do extracelulárního prostoru, je přitahován buňkami schopné fagocytózy, jež jsou schopny poškodit samotný neuron. ²⁸ $A\beta$ se vytváří jako důsledek změny konformace $A\beta$ na β -skládaný list. Tato konformace je silně ovlivňována oxidačním stresem a radikálovým poškozením řídicích molekul. ²⁹ $A\beta$ se vyskytuje ve dvou izoformách: první izoforma je $A\beta_{40}$ zastoupena

většinou, druhá izoforma je A β 42. Isoforma A β 42 se agreguje rychleji a je často spojena s familiární AD. Agregovaný A β působí neurotoxicky právě proto, že je schopen tvořit kalciové kanály s neřízeným vstupem vápníku do buňky. Buňka není schopna takové množství vápníku pufrovat a hyne. Díky této teorii jsou zkoumány inhibitory β -sekretas a γ -sekretas, ale prozatím bez úspěchu.^{13,25}

3.1.3.3 Teorie τ -proteinu

Třetí teorií tohoto onemocnění je teorie τ -proteinu. τ -Protein je fosfoprotein, jehož funkcí je spojovat mikrotubuly v axonech. τ -Protein se účastní polymerací, uspořádání a podílí se na stabilitě mikrotubulů. Jednou z dalších důležitých funkcí τ -proteinu je axoniální transport.³⁰ τ -Protein je kódován jediným genem MAPT (mikrotubulární τ -protein), který se nachází na lidském 17. chromozomu. V lidském mozku se rozlišuje celkem šest izoform tohoto proteinu, které se liší v počtu aminokyselin a v přítomných vazbách.³¹ Nastanou-li patologické podmínky, dochází pomocí enzymů glykogensyntasy-kinasy 3 β (GSK-3 β) a cyklin-dependentní kinasy 5 (CDK-5) k hyperfosforylaci τ -proteinu. Následně dojde k shlukování hyperfosforylovaného τ -proteinu do párových heliakálních filament, jež jsou podkladem útvarů zvaných neurofibrilární klubíčka (neurofibrillary tangles).¹⁶ Za patologických podmínek neurofibrilární klubíčka způsobí rozpad cytoskeletu, naruší se transport v axonu a dojde k zániku neuronu a vzniku demence.³²

3.1.3.4 Glutamátergní hypotéza

Glutamát je nejvíc zastoupeným excitačním neurotransmiterem v CNS působící zejména na ligandem řízené inotropní glutamátové receptory (iGluR).³³ Terapie AD se zaměřuje na NMDA receptory, které působí na principu aktivace vstupu vápenatých kationtů do buňky. Tyto kationty mají vliv na synaptický přenos a plasticitu během učení a paměti. V případě patologických podmínek je buňka nadměrně stimulována a probíhá u ní excitotoxicita (dochází k velkému vyplavování glutamátu a jeho omezenému zpětnému vychytávání),³⁴ při kterém jsou buňky poškozeny nebo usmrceny. Při dlouhodobém přílivu vápenatých kationtů do buňky dochází k postupné ztrátě synaptické funkce a konečné smrti neuronových buněk. Klinicky koreluje tento stav s progresivním poklesem paměti a učení, který je typický u pacientů s AD.³⁵ Glutamátergní systém je poškozen v těžkých stádiích AD,

proto se u pacientů se středně těžkou až těžkou formou AD užívá memantin, který působí jako nekompetitivní antagonist inotropního glutamátového receptoru NMDA.³⁴

3.1.3.5 Apolipoprotein E

Apolipoprotein E (Apo-E) je protein, tvořený z 299 aminokyselin.³⁶ Apolipoproteiny slouží v organismu jako informační molekuly, které jsou schopny zajistit vazbu na dané specifické vazební místo. Gen, který kóduje Apo-E má tři alely – $\epsilon 2$, $\epsilon 3$, $\epsilon 4$. Tyto alely kódují celkem tři izoformy proteinu Apo-E2, Apo-E3, Apo-E4. Největší riziko pro vznik AD má izoforma Apo-E $\epsilon 4$, která způsobuje zvýšenou akumulaci A β , má vliv na neurotoxicitu a na oxidativní stres.³⁷ Lidé, kteří trpí familiární nebo i sporadickou formou AD mají větší frekvenci výskytu alely Apo-E $\epsilon 4$.³⁶ Z výsledků studií vyplývá, že Apo-E $\epsilon 4$ nemá vliv na množství vytvořeného A β , ale je jednou z příčin polymerizace A β , jenž má vliv na pokles kognitivních funkcí.³⁷

3.1.3.6 Oxidační stres a volné radikály

Nejčastější volné radikály, které vznikají v lidském organismu (superoxidový, hydroxylový a peroxonitry) a dále látky, které ochotně přecházejí v tělu na radikály (peroxid vodíku, oxid dusný) jsou nedílnou složkou aerobních procesů v organismu. Radikály vznikají v mitochondriích jako vedlejší produkty dýchacího řetězce a ATP (adenosintrifosfát), při kterém dochází k přeměně kyslíku na vodu za uvolnění energie. Je-li narušena fyziologická rovnováha mezi oxidanty a antioxidanty ve prospěch oxidantů, mluvíme o stavu zvaném oxidační stres. Oxidační stres je schopen vážně poškodit všechny typy makromolekul v organismu, a tak poškodit fyziologické chování buněk. Patologické procesy, které se vyskytují u AD, jsou provázány oxidačním stresem. Tyto procesy dokládají různá radikálová poškození makromolekul, jež vedou u pacientů s AD k neurodegeneraci. Prozatím není jasné, jestli je oxidační stres jednou z primárních příčin AD nebo jako sekundární příčina na patologické změny v mozku.²⁹

3.1.3.7 Genetická podmíněnost

U některých pacientů s časnou familiární formou AD jsou mutace zjišťovány na 21. chromozomu, na kterém se vyskytuje gen pro APP a zároveň se zde nachází trisomie, která je důsledkem chybného rozestupu chromozomu v průběhu meiózy, zvaná jako Downův syndrom. Odhaduje se, že přibližně všichni jedinci s Downovým syndromem, kteří jsou starší 35 let, mají změny v mozku charakterizující AD. Dále u některých pacientů s familiárním

výskytem jsou zjišťovány mutace na 14. a 1. chromozomu pro kódování tzv. presenilinů. Na 14. chromozomu je kódován presenilin 1, zatímco na 1. chromozomu je zakódován presenilin 2. Pojmem preseniliny se označují transmembránové proteiny, které za patologických podmínek interferují s APP a podílejí se tak na vzniku A β . Dále se zkoumají i geneticky podmíněné rizikové faktory u AD (např. na 19. chromozomu jsou zakódovány izoformy pro Apo-E).^{36,38}

3.1.3.8 Diabetes mellitus

U pacientů, kteří trpí onemocněním diabetes mellitus a zároveň AD, dochází k narušení glukosového metabolismu, není nám znám dokonale mechanismus, jak k tomu dochází. Jako jedna z možností se jeví narušení inzulínové cesty v mozku. Inzulín v mozku ovlivňuje metabolismus A β a zvyšuje proteinovou fosforylaci. Tyto procesy napomáhají rozvoji demence. Nové výzkumy v oblasti diabetu a AD mohou přispět k nalezení nových biologických markerů, které hrají významnou roli v AD.³⁹

3.1.4 Diagnóza

Pro správnou diagnostiku AD je nezbytné, aby se potvrdila demence. K tomu nám slouží psychiatrická vyšetření, objektivní anamnéza a škálovací metody typu MMSE (krátká škála mentálního stavu), kreslení hodin apod.³⁸

K diagnostice AD se používají hlavně NINCDS-ADRDA kritéria. Tato kritéria nám rozdělí diagnózu AD na pravděpodobnou, možnou, nepravděpodobnou a jistou. Z mozkomíšního moku se zjišťují abnormální biomarkery (A β 42, τ -protein a fosfo- τ -protein). Pomocí MRI se stanovují temporální struktury a temporální rohy postranních komor, pomocí pozitronové emisní tomografie se identifikují depozita A β a další. Jistou diagnózu AD lze určit pouze pomocí mozkové biopsie (*post mortem* ji stanovuje patolog dle platných kritérií).⁴⁰

3.1.5 Léčba Alzheimerovy choroby

Léčba AD se rozděluje na léčbu farmakologickou (farmakoterapii) a nefarmakologickou. Farmakoterapii AD lze ještě rozdělit na léčbu kognitivních a léčbu nekognitivních funkcí. V léčbě kognitivních funkcí AD se používají dvě skupiny léčiv založených na důkazech („evidence-based medicine“) a to inhibitory mozkových cholinesteras a parciální antagonisté

NMDA ionotropních receptorů excitačních aminokyselin. Léčba nekognitivních funkcí se ovlivňuje podáním antipsychotik, antidepresiv, popřípadě anxiolytik.

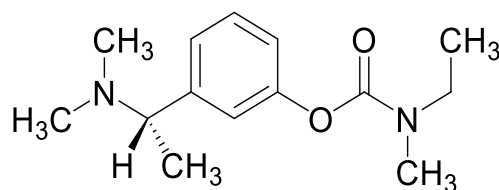
Mezi léčebná opatření jednoznačně patří nefarmakologická léčba. Jedná se o duševní aktivitu a kognitivní trénink pacienta. Dále sem můžeme zařadit muzikoterapii, arteterapii, léčbu tancem, léčbu pomocí zvířat nebo čtení. Nezbytná je i podpora sociálních vazeb pacientů.⁴¹

3.1.5.1 Inhibitory cholinesteras

Řadí se mezi neúspěšnější léčiva pro lehkou a středně těžkou formu AD. Zároveň patří i mezi léčiva první volby u nově diagnostikovaných pacientů. Vychází se z podstaty cholinergní hypotézy pro vznik AD, kde nedostatek ACh odpovídá míře poškození kognitivních funkcí. IACHe se ukázaly jako neúspěšnější způsob, jak bojovat se ztrátou ACh, neboť zabraňují hydrolýze ACh v synaptické štěrbině. Jejich přínos byl potvrzen v několika klinických studiích. IACHe působí na poruchy pozornosti, koncentrace či rozpoznávání sensorických vjemů.⁴² Dobrá účinnost byla klinicky ověřena u rivastigminu, galantaminu a donepezilu.²⁷

RIVASTIGMIN

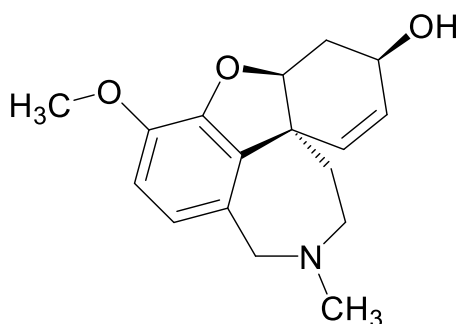
Rivastigmin je derivát karbamátu, který působí jako inhibitor mozkových AChE a BuChE.^{18,25} Zároveň ho lze užít, jako jediný z této skupiny léčiv, i na léčbu demence u Parkinsonovy choroby. Sloučenina má naprosté minimum lékových interakcí, což je přínosné u polymorbidních pacientů, kteří užívají například antikoagulační léčbu. Mezi nejčastěji vyskytující se nežádoucí účinky patří gastrointestinální potíže (nauzea, bolesti břicha, průjem a zvracení), které se nejčastěji vyskytují během titrování dávky. Nově můžeme tyto nežádoucí účinky minimalizovat užitím transdermálních náplastí.^{22,25}



Obrázek 1: vzorec rivastigminu

GALANTAMIN

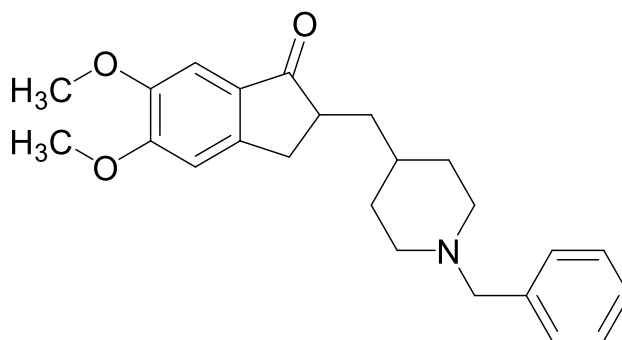
Galantamin patří mezi reverzibilní IACHe a zároveň alostericky moduluje nikotinové receptory.²² Původně byl tento alkaloid izolován z *Galanthus woronowii* Losinks. Struktura je tvořena benzofurobenzazepinovým skeletem. Velmi dobře se perorálně vstřebává, avšak v organismu tvoří depo v tukové tkáni.¹⁸ Jeho užívání je kontraindikováno u lidí s těžkou jaterní a ledvinovou nedostatečností. Dalšími nežádoucími účinky jsou gastrointestinální potíže (zvracení, průjem, nauzea) a bradykardie.²²



Obrázek 2: vzorec galantaminu

DONEPEZIL

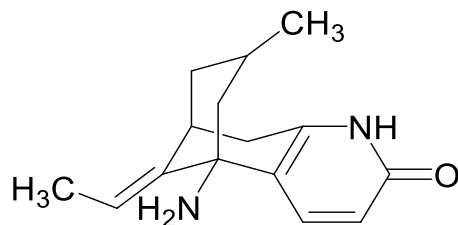
Dalším léčivem této skupiny je donepezil, který představuje piperidinový derivát se selektivním inhibičním účinkem vůči AChE. Dále bylo u něj zjištěno, že zabraňuje ukládání Aβ plaků v CNS, vykazuje neuroprotektivní a antioxidační účinky. Léčivo má dobrou biologickou dostupnost, dlouhý poločas účinku (až 70 hodin) a zpravidla je dobře tolerován s minimem nežádoucích účinků.^{18,25}



Obrázek 3: vzorec donepezilu

HUPERZIN A

Tato látka, byla prvně izolována z plavuně *Huperzia serrata* (Thunb. ex Murray) Trevisan v roce 1986.⁴³ Jedná se o lykodinový alkaloid, který je silným reverzibilním IChE a zároveň působí jako antagonist NMDA receptorů.⁴⁴ Huperzin A má delší působení než rivastigmin či donepezil, rychleji prochází přes hematoencefalickou bariéru a lépe se vstřebává po perorálním podání.⁴³ V Číně je alkaloid lékem volby u lidí s poruchou paměti.⁴⁴ Huperzin A je spojován se zlepšením kognitivního, klinického, funkčního a behaviorálního stavu u pacientů s AD bez významných nežádoucích účinků. K většímu posouzení jeho účinku však budou zapotřebí velké randomizované studie u pacientů s AD.²⁶ Huperzin A není schválen jako lék pro léčbu AD v České republice, ani v Evropě či v USA. U nás jej ale můžeme najít v určitých doplňcích stravy.⁴⁴



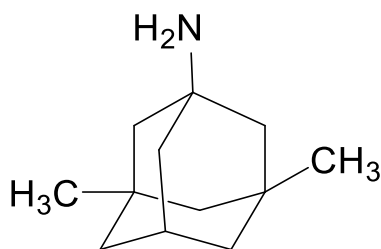
Obrázek 4: vzorec huperzinu A

3.1.5.2 Inhibitory NMDA receptorů

Jedno z dalších míst, které lze terapeuticky ovlivnit, vychází z pozorování chronické hyperaktivace NMDA receptorů při zvýšené koncentraci extracelulárního glutamátu. Hyperaktivita způsobuje zvýšený vtok vápenatých iontů do neuronů a jeho excitotoxicitu vedoucí až k apoptóze postižených neuronů.⁴²

MEMANTIN

Nekompetitivní antagonist NMDA receptorů užívaný pacienty se středně těžkou až těžkou formou AD. Má dlouhý biologický poločas 60 až 100 hodin a jeho dávky je třeba postupně titrovat.⁴² Nežádoucí účinky jsou velmi vzácné (závratě, bolest hlavy, halucinace). Klinickými studiemi bylo zjištěno, že při užívání memantinu se udržují kognitivní funkce pacienta a zároveň se zpomaluje progres AD.²²



Obrázek 5: vzorec memantinu

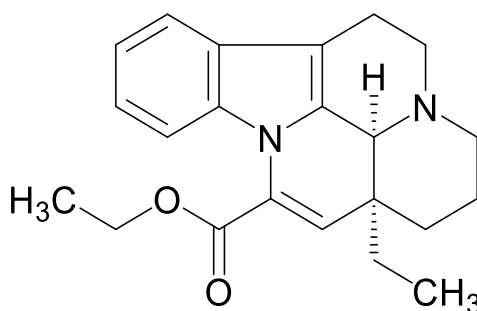
3.1.5.3 Nootropika

Nootropika jsou látky upravující kvantitativní a kvalitativní poruchy vědomí. Mechanismus účinku nootropik spočívá, že zlepšují metabolismus neuronů a fluiditu jejich membrán, zároveň zvyšují utilizaci kyslíku a glukosu, a hlavně zvyšují rezistenci buněk proti hypoxii a ischemii. Další jejich schopnosti spočívají ve zlepšení reologických vlastností krve, snížení její viskozity a potlačují arteriální spazmy.³⁸

Mezi klasická nootropika zařazujeme piracetam a pyritinol, jenž jsou schopna zlepšit regionální utilizaci kyslíku a glukosu. Pyritinol navíc zvyšuje plasticitu erytrocytů a má protizánětlivé účinky. K nejstarším nootropním léčivům patří dihydroergotoxin. Jeho funkcí v mozku je distribuce kyslíku a snížení permeability cév. Mezi další osvědčená léčiva sem řadíme nicergolin, vinpocetin nebo *Ginkgo biloba* L. Nootropika zlepšují poruchy paměti a učení, avšak nemáme žádné klinické studie, které by prokázaly jejich dostatečný efekt.⁴⁵

VINPOCETIN

Vinpocetin je semisyntetický derivát alkaloidu vinkaminu, který se izoluje z *Vinca minor* L. Vinpocetin přechází přes hematoencefalickou bariéru do mozku, vykazuje vlastnosti vazodilatační, antioxidační, neuroprotektivní a zlepšuje mikrocirkulaci v mozku.⁴⁶ V České republice je registrován tento přípravek pod názvem Cavinton®. Užíván je jako symptomatická léčba různých cerebrovaskulárních poruch.⁴⁷



Obrázek 6: vzorec vinpocetinu

GINKGO BILOBA L.

Léčivé přípravky, obsahující standardizovaný extrakt EGb 761 z jinanu dvoulaločnatého, patří mezi podpůrný prostředek léčby demence, včetně AD. Působí příznivě na krevní tok v cévách a kapilárách, vychytává volné radikály a má antitrombotický efekt.⁴⁸ U nás je standardizovaný extrakt EGb 761 obsažen v léčivých přípravcích Tanakan® nebo Tebokan®.⁴⁹

3.1.5.4 Další možné potencionální zásahy léčby

Mezi nově zkoumané terapeutické přístupy u AD patří látky ovlivňující amyloidní kaskádu. Předpokládáme, že primárním mechanismem pro vznik demence je ukládání neuritických plaků, jež se tvoří při špatném štěpení APP enzymy β -sekretasou a γ -sekretasou.⁴⁴

INHIBITORY SEKRETAS

Zkoušely se látky na úrovni inhibitorů β -sekretas a γ -sekretas. U inhibitorů β -sekretas nebyl shledán dostatečný účinek, který by zlepšoval kognitivní funkce nebo kvalitu života u lidí s AD a zároveň kvůli obavám o možné nežádoucí účinky byl vývoj farmaceutickými firmami zastaven. Inhibitory γ -sekretas prokazovaly závažné nežádoucí účinky na úrovni imunitního systému. Testovaly se i modulátory γ -sekretas, které by ovlivňovaly pouze tu část enzymu, jenž zodpovídá za chybné štěpení APP. Jednalo se o tarenflurbil, ale nebyl u něj prokázán účinek na paměť, ani na kvalitu života pacienta.⁴⁴

PLAZMAFERÉZA

Použitím této metody dochází ke snížení sérové koncentrace $A\beta$ v krvi a také nepřímo se snižuje koncentrace v likvoru. Z prvních dostupných studií vyplývá, že tato metoda prokazuje zlepšení kognitivních funkcí, ale většímu rozšíření brání procedurální náročnost léčby.⁵⁰

IMUNIZACE

Podstata pasivní imunizace spočívá ve zvýšení hladiny IgG protilátek, brání vzniku $A\beta$ a napomáhající jeho vylučování z mozku.⁵¹ Ve III. fázi klinického testování jsou čtyři monoklonální protilátky (solanezumab, crenezumab, gantenerumab, aducanumab). Tato terapie má svoje úskalí, musí se opakovaně podávat protilátky v infuzích, musí se určit přesný cíl pro antigeny, riziko imunitní reakce po aplikaci a je zde stále hrozba nežádoucích účinků při dlouhodobé léčbě.²³

Apo-Eε4

V III. fázi klinického testování je proléčivo ALZ-801 nesoucí účinnou látku tamiprosat. Látka má šanci u lidí s nosičstvím Apo-Eε4. Tamiprosat působí jako inhibitor polymerizace Aβ. Jednalo by se o perorální formu (ALZ-801), která by se užívala 2x denně. Látku pomáhá vyvíjet v USA i český neurolog MUDr. Martin Tolar Ph.D. ^{52,53}

INHIBITORY PROLYLOLIGOPEPTIDASY

Dalším možným zásahem v léčbě AD je prolyloligopeptidasa (POP). POP je cytosolová serinová peptidasa, jež je schopna štěpit malé, peptidům podobné hormony, neuroaktivní peptidy a další buněčné faktory s relativně malou molekulovou hmotností na karboxylovém zbytku prolinu. POP se mimo jiné podílí na mnoha fyziologických procesech, ale hraje i svoji roli při některých psychiatrických poruchách. ⁵⁴ Studiemi bylo zjištěno, že vysoké úrovně POP se vyskytují u pacientů, kteří jsou postiženi onemocněním AD. Přesný mechanismus účinku, jak POP působí na paměť a učení nám není znám a je stále předmětem zkoumání. Při využití v léčbě inhibitorů POP může dojít ke zvýšení kognitivních funkcí u pacienta tím, že se zabrání metabolismu endogenních neuropeptidů. Zjistilo se, že POP hraje i svoji roli při štěpení APP – použití inhibitorů POP by mohlo vést ke snížení depozit Aβ. Je zřejmé, že inhibitory POP se jeví jako slibný terapeutický cíl AD. ⁵⁵

INHIBITORY GSK-3β

Glykogensyntasa-kinasa 3 (GSK-3) je aktivní serin-threoninová kinasa, která se zapojuje do mnoha regulací buněčných biologických cest. Jedná se o klíčový regulátor syntézy glykogenu a metabolismu glukosy. GSK-3 se nachází ve dvou izoformách (GSK-3α a GSK-3β), přičemž GSK-3β je hojně zastoupena v CNS. ⁵⁶ GSK-3β má vysokou afinitu k substrátům zejména APP, preseliny, τ-proteiny a jiné. Podle nepřeborného množství substrátů, na které GSK-3 působí, se jeví tato kinasa jako hlavní regulátor fyziologických procesů v lidském těle. Zdá se, že GSK-3 může ovlivňovat i jiné nemoci než jen AD, například nádorová onemocnění, onemocnění ledvin a mnoho dalších. V současné době je to jeden z nejméně studovaných enzymů pro svůj velký terapeutický potenciál. U pacientů s AD, GSK-3β přispívá k neurodegeneraci přímou podporou hyperfosforylace τ-proteinu, napomáhá k produkci Aβ, vykazuje prozánětlivé funkce a prohlubuje deficit ACh. ²⁶

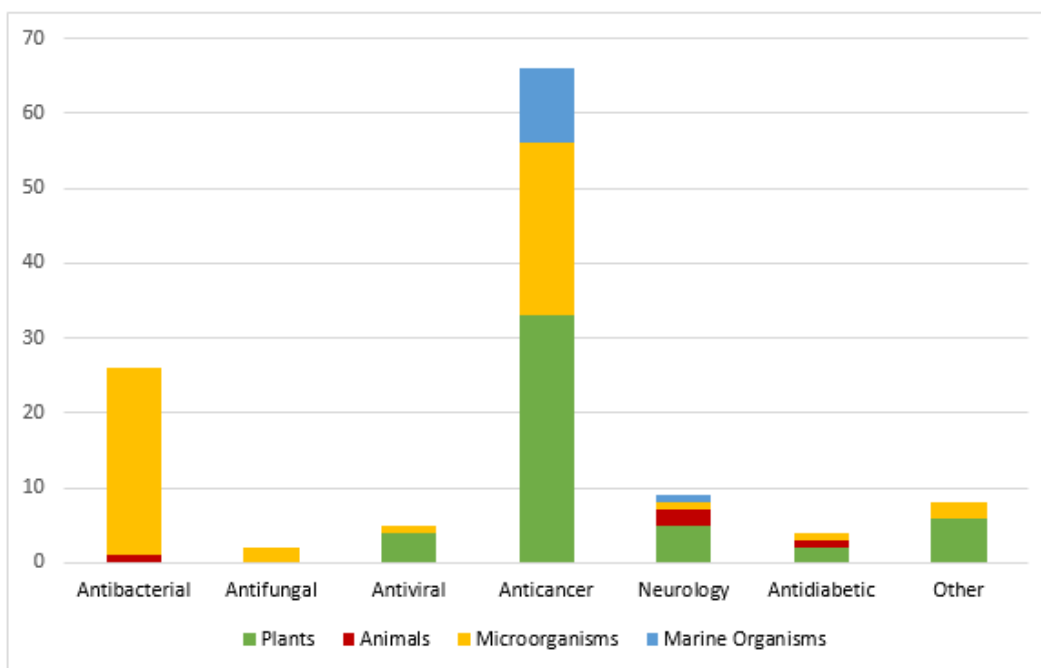
Mezi inhibitory GSK-3 β můžeme zařadit velké množství strukturně různorodých látek, jsou to například thiadiazolidindiony, paullony, maleimidy, indirubiny. Tideglusid je odvozen od thiadiazolidindionu, působící jako nekompetitivní inhibitor GSK-3 β . Látka se dostala až do II. fáze klinického testování, ale kvůli malé velikosti vzorku skupiny nepřinesla tato látka žádné statistické významnosti. Paullony a maleimidy vykazovaly zvýšenou selektivitu vůči inhibitorů GSK-3 β , celkově data k těmto látkám vykazují slibný potenciál pro vývoj nových léčiv. Indirubiny jsou bis-indolové sloučeniny, které lze získat z přírodních zdrojů. Indirubin je užíván jakou součástí čínského léčivého přípravku (Danggui Longhui Wan) pro terapii chronických onemocnění, včetně leukémie. Indirubin působí jako ATP-kompetitivní inhibitor GSK-3 β , jeho deriváty vykazují ještě větší aktivitu vůči GSK-3 β než indirubin samotný (například 6-bromoindirubin-3-oxim).²⁶

3.2 Nádorová onemocnění

Jednou z hlavních příčin úmrtí ve světě jsou nádorová onemocnění. Podle statistik došlo v roce 2012 k 14 milionům nových případů a v následujících letech se zvýší až na 22 milionů. Tyto čísla nám dokládají, že naprosto spolehlivá a účinná léčba nádorových onemocnění nebyla dosud nalezena. Díky této souvislosti představují látky přírodního původu neocenitelný zdroj pro objevování nových antiproliferativních léčiv.⁵⁷

3.2.1 Přírodní látky

Příroda je bohatým zdrojem pro hledání nových léčiv. Odhaduje se, že asi 50 % léčivých přípravků, které se v současné době užívají na různá onemocnění, vychází strukturně z přírodního původu. Podobně jsou na tom i léčiva na onkologická onemocnění.⁵⁸ V současnosti v terapii nádorových onemocnění činí více než z 60 % léčiva přírodního původu, včetně pocházejících z rostlin, mořských organismů a mikroorganismů.⁵⁷



Obrázek 7: procentuální zastoupení látek přírodního původu u vybraných onemocnění ⁵⁸

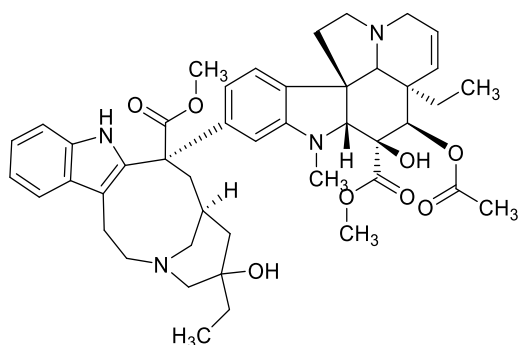
Důležitou skupinou přírodních látek, které se v současné době užívají v terapii maligních onemocnění, jsou *Vinca* alkaloidy. Původně byly izolovány kanadskými vědci Robertem Noblem a Charlesem Thomasem Beerem z *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. v 50. letech minulého století. Byly prvními antimitoticky působícími látkami z rostlinné říše, které byly uvedeny na trh. ⁵⁷

3.2.1.1 *Vinca* alkaloidy

V současné době se v klinické praxi užívají hlavně alkaloidy vinblastin a vinkristin. Terapeuticky se užívají i syntetické deriváty vindesin, vinflunin a vinorelbin. ⁵⁷

VINBLASTIN

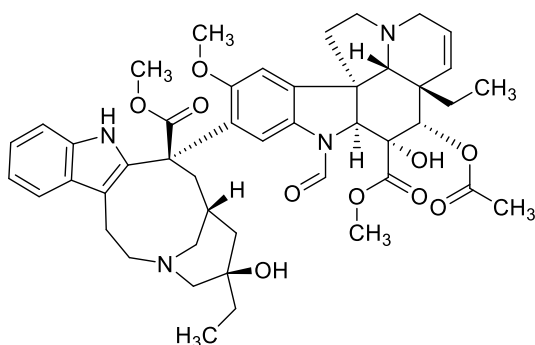
Tento alkaloid našel uplatnění v terapii různých malignit (Hodgkinova choroba, zhoubný lymfom nehodgkinského typu, rekurentní nebo metastazující karcinom prsu, pokročilý testikulární karcinom, histiocytóza Langerhansových buněk zvaná též histiocytóza X). ⁵⁹ Mechanismus účinku alkaloidu spočívá v inhibici polymerace mikrotubulů během M-fáze buněčného dělení. ⁶⁰ Nežádoucí účinky vinblastinu odpovídají výši podané dávky. Mezi časté nežádoucí účinky patří leukopenie, parestezie, ztráta hlubokých šlachových reflexů, nauzea, zvracení a/nebo vypadávání vlasů. ⁵⁹



Obrázek 8: vzorec vinblastinu

VINKRISTIN

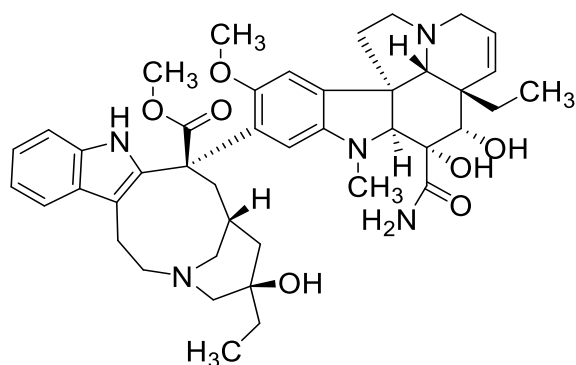
V roce 1961 byl vinkristin poprvé izolován, který se používá k léčbě leukémie, myelomu, rakoviny prsu a rakoviny mozku. Vinkristinu působí na β -podjednotku tubulinového heterodimeru, jež brání polymeraci a inkorporaci do mikrotubulů a tím blokuje dělení se buňky v metafázi. Vinkristin ovlivňuje také β -podjednotky v nervových vláknech, proto může tato látka vyvolat axoniální senzomotorickou neuropatii.^{61,62} Mezi další nežádoucí účinky můžeme zařadit alopecii, trombocytózu, bronchospasmus, ztráta hlubokých šlachových reflexů, nevolnost, zvracení, bolesti břicha a další.⁶³



Obrázek 9: vzorec vinkristinu

VINDESIN

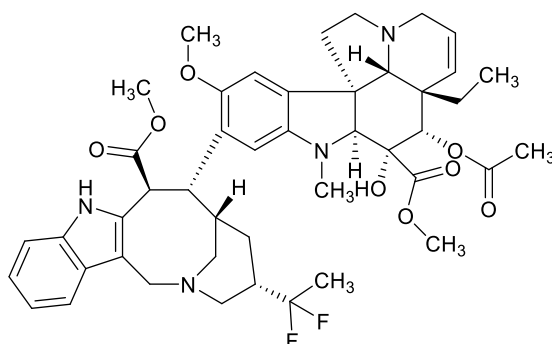
Vindesin je semisyntetický derivát vinblastinu, který lze použít v terapii onemocnění akutní lymfoblastické leukémie u dětí, která je rezistentní vůči jiným antineoplastikům, u maligního melanomu nereagujícího na jinou formu terapie, u pokročilého karcinomu prsu aj.⁶⁴



Obrázek 10: vzorec vindesinu

VINFLUNIN

Derivát vinorelbinu, první fluorovaný derivát *Vinca* alkaloidu. Vinflumin se váže na mikrotubulární proteiny tubulinu a tím ukončuje jejich formuli, vyvolává jejich depolymerizaci, která následně vede k inhibici mitózy. Od roku 2009 se užívá vinflumin jako léčba druhé volby u nemocných s uroteliálním karcinomem močového měchýře, kteří neodpovídají dostatečně silně na podání *cis*-platiny.⁶⁵



Obrázek 11: vzorec vinfluninu

VINORELBIN

Vinorelbin je další semisyntetický derivát *Vinca* alkaloidu, jehož mechanismus působení je podobný jako u předchozích alkaloidů.⁶⁶ Jeho indikace spočívá v léčbě nezhojněného karcinomu plic. Dále se indikuje pacientům s metastázujícím karcinomem prsu, u nichž už selhala nebo není jiná možnost chemoterapie. Mezi nejčastější nežádoucí účinky léčby můžeme zařadit útlum kostní dřeně s neutropenií, gastrointestinální toxicita, alopecie, neurologické potíže a přechodné zvýšení jaterních testů.⁶⁷

3.3 *Vinca minor* L. – barvínek menší



Obrázek 13: *Vinca minor* L. ⁶⁸

3.3.1 Taxonomické zařazení

Tabulka 1: zařazení *Vinca minor* L. taxonomicky ⁶⁹

| | |
|-----------|-----------------------|
| Říše: | Plantae |
| Oddělení: | Magnoliophyta |
| Třída: | Magnoliopsida |
| Podtřída: | Lamiidae |
| Řád: | Gentianales |
| Čeleď: | Apocynaceae |
| Rod: | <i>Vinca</i> L. |
| Druh: | <i>Vinca minor</i> L. |

3.3.2 Botanická charakteristika

Vinca minor L., neboli česky barvínek menší, je vytrvalá, 10 až 20 cm vysoká plazivá rostlina, která se rozrůstá tenkým, plazivým oddenkem až do délky 70 cm. Sterilní lodyha rostliny je

poléhavá, která na bázi dřevnatí. Květonosné lodyhy jsou přímé nebo vystoupavé. Lodyžní listy jsou kožovité, stálezelené, elipsovité, protistojné, svrchní strana listu je tmavě zelená a lesklá, spodní strana listu je světle zelená a matná, se zřetelnou střední žilkou. Květy jsou jednotlivé, oboupohlavné, pravidelné. Kalich rostliny je nálevkovitý, lysý. Koruna je řepicovitá, která na bázi srůstá v trubku, zbarvuje se většinou do modra až fialovo modra, někdy může být i růžová, vzácně lze nalézt i bílou barvu. Plodem je měchýřek. Rostlina se rozmnožuje hlavně vegetativně oddenky. Barvínek menší kvete od března do června.⁶⁹⁻⁷²



Obrázek 14: *Vinca minor* L. – rostlina⁶⁸



Obrázek 15: *Vinca minor* L. – květ⁶⁸



Obrázek 16: *Vinca minor* L. – list⁶⁸



Obrázek 17: *Vinca minor* L. – porost⁶⁸

3.3.2.1 Výskyt

Vinca minor L. je jediným volně rostoucím zástupcem z čeledi Apocynaceae v České republice.⁶⁹ Autochtonní populace barvínků se vyskytuje především na Moravě, další výskyt je ve východních a severních Čechách. Barvínek se vyskytuje hlavně v listnatých lesích (dubohabřiny a bukové lesy), na skalách či v křovinách.⁷¹ Zplaněný se nachází často v místech lidského obydlí, jako půdokryvná rostlina v polostinných či stinných místech zejména

v zahradách, parcích, na hřbitovech, okolo kostelů, hradů, zámků či hradních zřícenin. Jedná se o velmi odolnou rostlinu, která vzhledem svému častému výsevu nepatří mezi ohrožené druhy.⁷² Barvínek menší je původní evropský druh, oblasti jeho růstu jsou od Pyrenejského poloostrova přes celou střední Evropu až k Podněpří. Rostlina je zavlečena i víc na sever a i na jiné kontinenty světa.⁷⁰

3.3.3 Další druhy v rodu *Vinca* L.

Kromě *Vinca minor* L. patří do rodu *Vinca* L. dalších těchto 6 druhů: *Vinca difformis* Pourr., *Vinca erecta* Regel & Schmalh., *Vinca herbacea* Waldst. & Kit., *Vinca ispartensis* Koyuncu & Eksi, *Vinca major* L. a *Vinca soneri* Koyuncu.⁷³

Vinca difformis Pourr. (Obrázek 18)

Je stálezelený polokeř, rostoucí v zemích západního Středomoří a severní Afriky. Listy jsou vejčité, lesklé tmavozelené barvy, 3–6 cm dlouhé. V jarních měsících kvete světle modrými nebo bílými květy. Dorůstá do výšky okolo 30 cm, ale rozrůstá se pomalu do neomezené šíře.⁷⁴

Vinca erecta Regel & Schmalh. (Obrázek 19)

Vytrvalá bylina pocházející z podhorských a horských oblastí Afganistánu, Tádžikistánu, Kyrgyzstánu a Uzbekistánu. Dorůstá do délky 15–50 cm. Od měsíce dubna kvete rostlina ve světle fialových až bílých barvách.⁷⁵

Vinca herbacea Waldst. & Kit. (Obrázek 20)

Vinca herbacea Waldst. & Kit., neboli barvínek bylinný, je rostlina v České republice nevyskytující se, ale v nejteplejších částech Slovenska ji můžeme spatřit ve volné přírodě, je zde chráněná. Další její rozšíření je v oblastech Balkánu, Maďarska, Rakouska, v jižních částech Ruska a Íránu, hlavně na vápencovitých podložích země. V zimních měsících nadzemní část rostliny odumírá celá, avšak kořen zimu přežívá. Nejčastěji kvete od května do června v modrofialových barvách.⁷⁶

Vinca ispartensis Koyuncu & Eksi (Obrázek 21)

Posledním objeveným druhem barvínku je *Vinca ispartensis* Koyuncu & Eksi., pocházející z oblastí Turecka, objeven byl v roce 2015. Roste v nadmořských výškách okolo 1 300 až 1 700 metrů na suchých kamenitých svazích. Postranní výhonky dorůstají do délky 25–50 cm,

na zimu celá nadzemní část rostliny odumírá. Kvete od měsíce dubna do května a její květy mají namodralou barvu. ⁷⁷

Vinca major L. (Obrázek 22)

Vinca major L., neboli barvínek větší, je stálezelený polokeř s dřevnatými stonky, původně pochází ze Středomoří. Nekvetoucí stonky jsou až 2 metry dlouhé, kvetoucí stonky jsou dlouhé okolo 30 cm. Kvete od konce jara až do začátku podzimu, květy mají jasně modrou barvu. ⁷⁴ V České republice se s ním může setkat v zahradách anebo v parcích v teplejších oblastech. ⁷⁸

Vinca soneri Koyuncu (Obrázek 23)

Tento druh byl objeven na suchých kamenných stráních Turecka v nadmořské výšce 1 600 až 1 900 m. Jedná se o vzpřímený polokeř s tmavě zelenými listy, bez postranních výhonků. Květy má modré až bleděmodré barvy. Tento druh patří mezi kriticky ohrožené rostliny, za příčinou je lidská činnost, pastevectví a eroze. ⁷³



Obrázek 18: *Vinca difformis* Pourr. ⁷⁹



Obrázek 19: *Vinca erecta* Regel & Schmalh. ⁸⁰



Obrázek 20: *Vinca herbacea* Waldst. & Kit. ⁸¹



Obrázek 21: *Vinca ispartensis* Koyuncu & Eksi ⁸²



Obrázek 22: *Vinca major* L. ⁷⁸



Obrázek 23: *Vinca soneri* Koyuncu ⁸³

3.3.4 Obsahové látky *Vinca minor* L.

Hlavními obsahovými látkami *Vinca minor* L. jsou indolové alkaloidy. Množství těchto alkaloidů kolísá v rozmezí 0,3 až 1 %. Hlavním alkaloidem je vinkamin, dále sem patří apovinkamin, vinkamon, vinkadiformin a další. ⁸⁴ Vedlejší obsahové látky, které se v rostlině vyskytují, jsou flavonoidní glykosidy, třísloviny, saponiny, pektin a kyselina ursolová. ⁸⁵

3.3.4.1 Alkaloidy

Do současné doby bylo izolováno přibližně více jak 50 alkaloidů z nadzemních částí a kořene *Vinca minor* L. V tabulce 2 uvádím vybrané zástupce izolovaných alkaloidů. ⁸⁶

Tabulka 2: vybrané alkaloidy *Vinca minor* L. ⁸⁶⁻⁹⁴

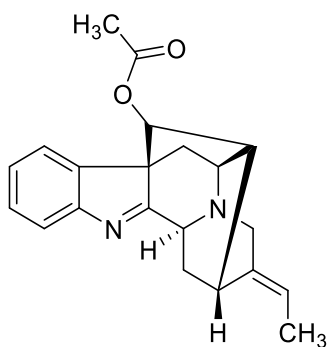
| | | |
|-----------------------------------|------------------------------------|------------------------------|
| (-)-vinkadifformin | 16-methoxyvinkadifformin | vinkadifformin |
| minovincinin | minovincin | 16-methoxyminovincin |
| <i>N</i> -methylvinkadifformin | 16-methoxyminovincinin | 5-oxominovincinin |
| <i>N</i> -methylaspidospermidin | pikrinin | vinkorin |
| vinkanol | quebrachamin | <i>N</i> -methylquebrachamin |
| vineridin | vinkaminorein | vinkaminorin |
| vinkaminoridin | vinkamin | 16-epivinkamin |
| (±)-eburnamonin | (-)-eburnamin | (±)-vinkatin |
| eburnamenin | (+)-isoeburnamin | 11-methoxyeburnamonin |
| 11,12-dimethyl- oxyeburnamonin | 10-methoxydesacetyl- akuammilin | vinkarubin |
| vinkaminin | vinerín | reserpin |
| majdin | vinorin | vinkamidin (striktamin) |

Jeden z prvních alkaloidů, který byl z rostliny izolován, je vinkamin. Mezi alkaloidy *Vinca minor* L. nacházíme monomerní indolové a bis-indolové alkaloidy. ⁸⁷

I. MONOMERNÍ INDOLOVÉ ALKALOIDY

AJMALINOVÝ TYP

Tato skupina alkaloidů vychází svoji strukturální podobou z látky ajmalinu, který byl prvně izolován z kořene *Rauwolfia serpentina* (L.) Benth. ex. Kurz a používá se jako antiarytmikum la třídy (srdeční blokátor draselných kanálů). ⁹⁵ Z tohoto strukturního typu byl z *Vinca minor* L. izolován alkaloid vinorin. ^{87,96}

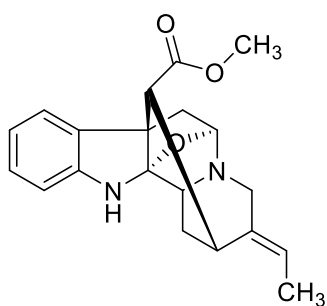


Obrázek 24: vzorec vinorinu

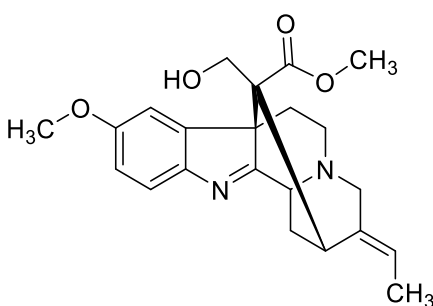
AKUAMMINOVÝ TYP

Akuammin patří do skupiny indolových alkaloidů, původně byl izolován ze semen *Picalima nitida* (Stapf) T. Durand & H. Durand a *Picalima klaineana* Pierre. Z *Vinca major* L byl izolován vinkamajordin, mající stejnou chemickou strukturu a podobné vlastnosti. Díky tomuto poznatku jej můžeme zařadit k *Vinca* alkaloidům.^{97,98}

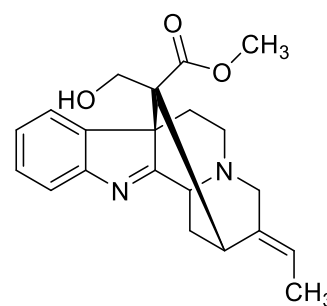
Z akuamminového strukturního typu byly z *Vinca minor* L. izolovány alkaloidy pikrinin, 10-methoxydesacetylakuammilin a desacetylakuammilin.^{87,91}



Obrázek 25: vzorec pikrininu



Obrázek 26: vzorec 10-methoxydesacetylakuammilinu

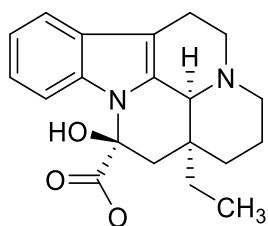


Obrázek 27: vzorec desacetylakuammilinu

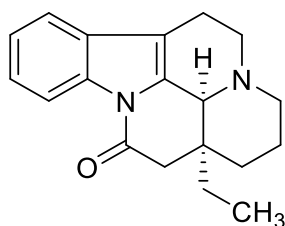
EBURNAMINOVÝ TYP

Indolové alkaloidy, které patří pod tento typ, vychází ze struktury eburnaminu nebo z vinkaminu. Typickým rysem této skupiny je pentacyklické seskupení. Oba alkaloidy byly detekovány v rodě *Vinca*.⁹²

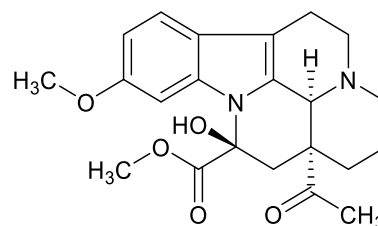
Z eburnaminového strukturního typu byly z *Vinca minor* L. izolovány vinkamin, isovinkamin, 14-epivinkamin, 16-epivinkamin, (-)-eburnamin, (±)-eburnamonin, quebrachamin, *N*-methylquebrachamin, vincin, 20-hydroxyvinkamin, vincinin, *N*-methylspidospermidin, 11-methoxyeburnamonin, 11,12-dimethoxyeburnamonin, vicesin, (+)-isoeburnamin, eburnamenin, minovincin, minovincinin, vinkarein, vinkaminorein, vinkaminorin, vinkaminoridin, vinkanol, vinkamol, 16-methoxyminivincin, 16-methoxyminovincinin, 5-oxominovincinin, (-)-vinkadiformin, 16-methoxyvinkadiformin, vinkadiformin a *N*-methylvinkadiformin.^{86,87,89,92,93}



Obrázek 28: vzorec vinkaminu



Obrázek 29: vzorec (±)-eburnamoninu



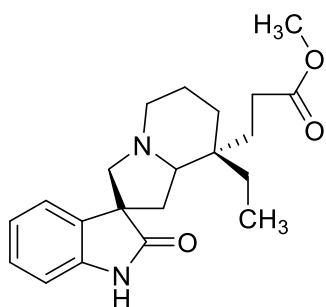
Obrázek 30: vzorec vincininu

OXINDOLOVÝ TYP

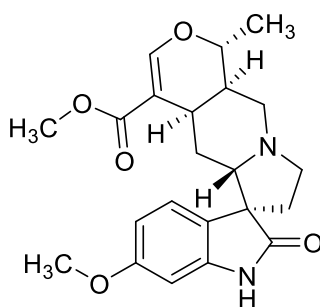
Alkaloidy této skupiny obsahují ve své struktuře oxindolové uskupení. Oxindol se liší od indolu tím, že má navíc na pyrrolidinovém jádře v poloze 2 oxoskupinu.⁹⁹

Z oxindolového strukturního typu byly z *Vinca minor* L. izolovány alkaloidy:

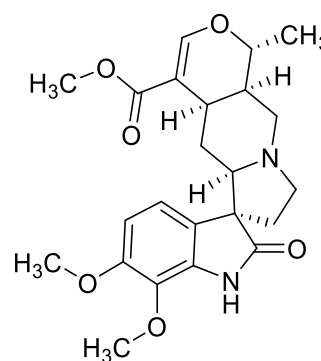
(±)-vinkatin, vinerin, vineridin, majdin^{94,100}



Obrázek 31: vzorec (±)-vinkatinu



Obrázek 32: vzorec vineru



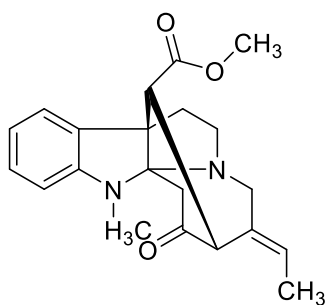
Obrázek 33: vzorec majdinu

SARPAGINOVÝ TYP

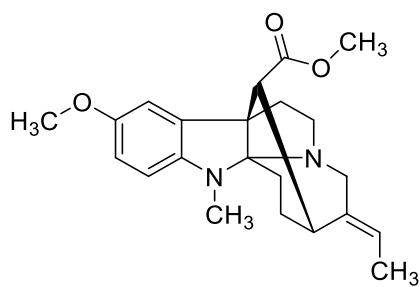
Indolové alkaloidy, které patří pod sarpaginový typ byly izolovány hlavně z čeledi Apocynaceae, přesněji z rostlin rodů *Alstonia* a *Rauwolfia*. Můžeme je ale najít i v čeledi Gelsemiaceae v rodě *Gelsemium*.¹⁰¹ Alkaloidy sarpaginového typu se odvozují od struktury sarpaginu, mají celkem 4 centra chiralit a to na C₃, C₅, C₁₅ a C₁₆. Strukturálně mají sarpaginové alkaloidy blízko k alkaloidům ajmalinového typu.⁹⁵

Ze sarpaginového strukturního typu byly z *Vinca minor* L. izolovány:

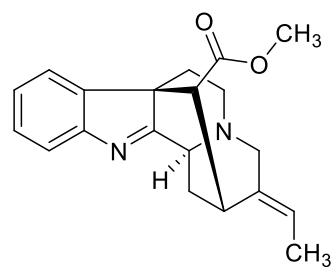
vinkorin, vinkoridin, (–)-1-norvinkorin, reserpin, vinkamidin (striktamin)^{87,89}



Obrázek 34: vzorec vinkoridinu



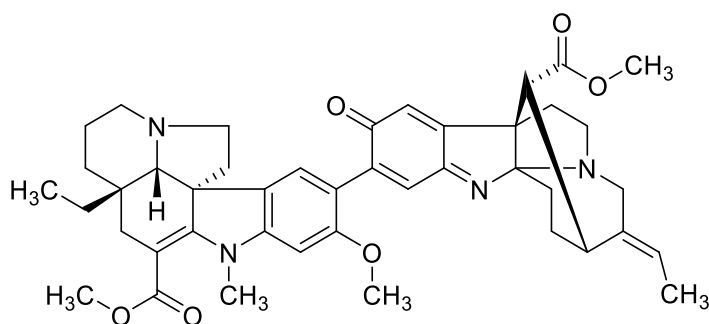
Obrázek 35: vzorec vinkorinu



Obrázek 36: vzorec vinkaminu (stiktaminu)

II. BIS-INDOLOVÝ ALKALOID

Jediný alkaloid s bis-indolovou strukturou, který se uvádí u rostliny *Vinca minor* L., je vinkarubin.⁸⁶

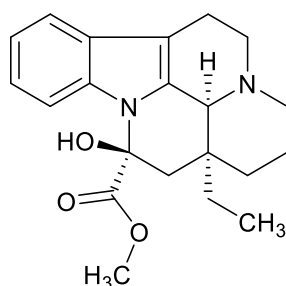


Obrázek 37: vzorec vinkarubinu

3.3.4.3 Biologická aktivita alkaloidů *Vinca minor* L.

VINKAMIN

Vinkamin je hlavní indolový alkaloid *Vinca minor* L.¹⁰² Svoji strukturou patří do skupiny indolových alkaloidů eburnaminového typu.¹⁰³ Vinkamin působí jako periferní vazodilatátor, který zvyšuje regionální průtok krve mozkiem. Prospěšný je při výživě a ochraně buněk nervového systému, používá se jako adjuvans u lidí s cerebrovaskulární nedostatečností, jako geriatrická podpora zlepšující paměť a schopnost myšlení, při traumatech hlavy a je doporučován i po mrtvici. Vinkamin patří mezi nootropika.¹⁰² Vinkamin byl předlohou pro semisyntetický analog vinpocetin.



Obrázek 38: vzorec vinkaminu

Tabulka 3: biologická aktivita dalších alkaloidů

| Název | Biologická aktivita |
|--------------------------|---|
| akuammicin | <i>in vivo</i> účinek u myši – agonista κ -opioidní receptorů ⁹⁸ |
| | stimuluje zvýšený příjem glukosy 3T3-L1 v adipocytech ¹⁰⁴ |
| majdin | <i>in vitro</i> účinek antioxidační, proapoptický, antiradikálový, a chelatační ^{87,105} |
| pikrinin | <i>in vitro</i> má protizánětlivý a analgetický účinek (inhibici COX-1 a COX-2) ¹⁰⁶ |
| | <i>in vitro</i> vykazoval alkaloid inhibiční účinek na 5-lipoxygenasu ¹⁰⁶ |
| vinkadiformin | <i>in vitro</i> antiplasmodiální aktivita ¹⁰⁷ |
| vinkaminorein | silná cytotoxická aktivita vůči leukemickým buňkám P388 ¹⁰⁸ |
| vinkaminorin | silná cytotoxická aktivita vůči leukemickým buňkám P388 ¹⁰⁸ |
| vinkarubin | vykazuje cytotoxickou aktivitu vůči leukemickým buňkám P388 ⁸⁶ |
| vinkanol | <i>in vitro</i> blokáce napěťově řízených Na ⁺ kanálů, neuroprotektivní účinek ¹⁰⁹ |
| vinkamin (striktamin) | <i>in vitro</i> účinek selektivního inhibitoru COX-2 ¹⁰⁶ |
| | významná inhibiční aktivita proti herpes simplex a adenoviru ¹¹⁰ |
| reserpin | antimikrobiální a antivirulentní aktivita proti <i>Staphylococcus aureus</i> , antihypertenzní účinek, antiparazitikum ¹¹¹ |
| | cytotoxická aktivita <i>in vivo</i> a také <i>in vitro</i> ¹¹² |
| eburnamonin | <i>in vitro</i> vykazoval zlepšení cerebrovaskulárních funkcí a zmírňoval poruchy paměti ¹² |

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Přístroje a materiál

4.1.1 Rozpouštědla a chemikálie

- Acetonitril p.a. (ACN), (Penta, Praha)
- Amoniak 25% p.a., vodný roztok (NH₃), (Penta, Praha)
- Cyklohexan p.a. (cHx), (Lach-Ner, Neratovice)
- Ethanol 95% (EtOH), (Penta, Praha)
- Ethyl-acetát p.a. (EtOAc), (Penta, Praha)
- Chloroform p.a. (CHCl₃), (Penta, Praha)
- Kyselina mravenčí 98% p.a. (HCOOH), (Penta, Praha)
- Kyselina trifluoroctová p.a. (TFAA), (Merck Milipore, Praha)
- Methanol p.a. (MeOH), (Penta, Praha)
- Toluén p.a. (To), (Penta, Praha)
- Destilovaná voda (H₂O)

4.1.2 Pomocný materiál

- Křemelina Celite C 535 Cedlite, (Sigma-Aldrich s.r.o., Praha)
- Vata

4.1.3 Detekační činidla

- D1: *Dragendorffovo činidlo* ¹¹³

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

ROZTOK B: v 40 ml vody se nechá rozpustit 16 g jodidu draselného

ZÁSOBNÍ ROZTOK: vznikne, když se smíchají ROZTOKY A a B v poměru 1:1.

DETEKČNÍ ROZTOK: připraví se smísením 5 ml zásobního roztoku a 10 g kyseliny vinné, která se rozpustí v 50 ml vody. Roztoky se nechají v lednici při teplotě 4 °C.

- D2: *jodoplatičité činidlo*

ROZTOK A: 100 mg hexachloroplatičité kyseliny ($\text{H}_2\text{Cl}_6\text{Pt} \cdot x\text{H}_2\text{O}$) se smísí s 1 ml vody.

ROZTOK B: 6 g jodidu draselného se rozpustí ve 100 ml vody.

DETEKAČNÍ ROZTOK: se připraví smísením ROZTOKŮ A a B.

4.1.4 Využívané soustavy pro tenkovrstvou chromatografii

- S 1: To + EtOAc + MeOH (6:2:2)
- S 2: cHx + EtOAc + MeOH + NH_3 (45:45:10:0,2)
- S3: EtOAc + MeOH + H_2O (100:13:10)
- S 4: MeOH + H_2O + TFAA (90:10:0,1)
- S 5: ACN + H_2O + HCOOH (50:50:0,2)

4.1.5 Chromatografické adsorbenty

- Komerční hliníkové TLC desky Silikagel 60 F₂₅₄, (Merck, Praha)
- Komerční hliníkové TLC desky Silikagel 60 RP-18, F_{254S}, (Merck, Praha)

4.1.6 Přístroje

- Polarimetr Automatic P3000, (A. Krüss Optronic, Hamburg, Německo)
- Spektrometr Varian Inova VNMR S500, (Varian, USA)
- Ultrazvuková lázeň Sonorex Super 10P, (Bandelin, Německo)
- Vakuová odparka Laborota 4000, (Heidolph, Německo)
- Waters Autopurification™ HPLC-MS (Milford, USA)
- plynový chromatograf spojený s hmotnostním spektrometrem Agilent 7890A GC 5975 (Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornie, USA)

4.2. Metody – obecné postupy

4.2.1 Příprava a čištění rozpouštědel

Destilací byla přečištěna veškerá komerční rozpouštědla, která byla při této práci použita. Předestilovaná rozpouštědla byla uchovávána v tmavých skleněných stojátkách.

4.2.2 Odpařování rozpouštědel

Získané frakce nebo čisté látky z preparativní TLC byly odpařeny na vakuové odparce za sníženého tlaku na vodní lázni, při teplotě 40 °C. Roztoky alkaloidů ve skleněných penicilinkách byly vysušeny proudem vzduchu na vodní lázni při teplotě 60 °C.

4.2.3 Sušení a skladování

Dosušení frakcí a čistých látek z *Vinca minor* L. proběhlo v exsikátoru za sníženého tlaku, nad perlami silikagelu po dobu 24 hodin. Samotné skladování vzorku před detekcí bylo v lednici, která měla teplotu okolo 2–8 °C.

4.2.4 Tenkovrstvá chromatografie

Chromatografie na tenké vrstvě (TLC) probíhala dle přesně stanovených pravidel. Na komerčních hliníkových deskách o tloušťce 0,2 mm byl nanesen vzorek (1 cm od okraje), jenž byl nejprve rozpuštěn ve směsi CHCl_3 a EtOH (1:1). Vzorek byl nanesen takovým způsobem, aby množství dělené směsi nepřesáhlo 1 mg.cm^{-1} u preparativního TLC na komerčních hliníkových deskách. Na základě toho byl vypočten příslušný počet odpovídajících desek. Chromatografie probíhala v chromatografických komorách, které byly 20 min před použitím nasyceny parami námi zvolené mobilní směsi. Před vložením desek do nasycených komor byly vysušeny proudem horkého vzduchu. V chromatografických komorách byly desky vyvíjeny, dokud nedosáhly jejího čela. Pokud bylo třeba, byly desky vyvíjeny ve stejné soustavě vícekrát nebo byla i možnost záměny za jinou mobilní fázi, ale až když byla odpařena všechna rozpouštědla z desky. Po vyvinutí byly jednotlivé desky vyjmuty z chromatografických komor. Dále byla provedena detekce alkaloidů pod UV lampou při vlnové délce 254 nm nebo 366 nm a zároveň byly označeny jednotlivé zóny preparativní jehlou. Označené zóny se stejným retenčním faktorem (R_f) byly vyškrábány ze všech použitých komerčních desek, byly smíseny s přibližně stejným objemem křemeliny a byly eluovány směsí CHCl_3 + EtOH (1:1) nebo MeOH.

4.2.5 Detekce alkaloidů

Byla provedena detekce pod UV lampou při vlnové délce 254 nm a 366 nm. Následoval postřik Dragendorffovým činidlem (tetrajodobismutitan draselný $K[BiI_4]$) u kontrolních TLC. Reakce tímto činidlem způsobila zbarvení do oranžové, oranžovo-červené a oranžovo-hnědé barvy. Takto jsou detekovány alkaloidy, jež mají ve své struktuře terciální nebo kvartérní dusík. ¹¹⁴

Detekce alkaloidů na komerčních chromatografických deskách RP-C18 byla provedena jodoplatičitým činidlem. Reakce tímto činidla způsobila zbarvení do světle modré až modro-hnědé barvy. ¹¹⁵

Detekce byla vždy možná, až když byla odpařena všechna přebytečná rozpouštědla z desky.

4.2.6 EI-MS analýza

Použitím plynového chromatografu Agilent Technologies 7890A, který obsahoval hmotnostní detektor Agilent Technologies 5975 byla provedena analýza izolovaných alkaloidů. Kolizní energie byla 70 eV při teplotě 230 °C. Pro separaci složek byla zvolena kolona HP-5, 30 m x 0,250 mm x 0,250 μ m. Nosné médium bylo Helium 5.0 (Linde) a průtok nosného plynu činil 0,8 ml/min. Teplotní program byl zvolen následovně ze 100 °C na 180 °C (bylo temperováno rychlostí o 15 °C za 1 min), 1 min udržovací teplota 180 °C, z teploty 180 °C na 300 °C (bylo temperováno rychlostí o 5 °C za 1 min), 40 min udržování při teplotě 300 °C. Zkoušený izolovaný alkaloid byl rozpuštěn v MeOH pro MS o koncentraci 0,2 mg·ml⁻¹, nástřik injektorem byl proveden v split módu v poměru 1:10 a za teploty 280 °C. Data izolovaných alkaloidů byla porovnána s dostupnými spektry v komerční knihovně NIST, dále s odbornou literaturou a taktéž se spektry referenčních látek, které již dříve izolovala vědecká skupina ADINACO.

4.2.7 LC-MS analýza

Vzorky (0,2 – 0,3 mg) pro měření LC-MS byly rozpuštěny v 1 ml MeOH a byly změřeny pomocí Waters Autopurification™ HPLC-MS (Milford, USA). Tento přístroj byl sestaven z Waters Sample Manager 2767 modulu, System fluidics Organizer, dále byl tvořen z binární gradientové pumpy Waters 2545, z detektoru Waters 2998 s diodovým polem a v neposlední

řadě z hmotnostního spektrometru Waters Acquity qDa. Měření probíhalo za laboratorní teploty 25 °C. Pro separaci látek byla zvolena kolona C-18 XSelect® CSH™ OBD™ (100 mm x 4,6 mm i.d., 5 µm) (Milford, USA). Jako mobilní fáze byla zvolena směs 0,1 % HCOOH ve vodě (rozpuštědlo A) a 0,1 % HCOOH a MeOH (rozpuštědlo B). Průtok mobilní fází v přístroji činil 1 ml/min. V následujícím pořadí byl nastaven eluční program (v/v): 0 min 5 % B, 5 min 100 % B, 8,5 min 5 % B a poté bylo necháno 1,5 minuty v počátečních podmínkách pro ekvilibraci. Kritéria hodnot pro ESI-MS byly stanoveny: kapilární napětí – 0,8 kV; teplota próby – 600 °C; kuželové napětí – 15 V. V rozpětí od 200 do 800 m/z byla vynesena LC-MS hmotnostní spektra. Nastavení detektoru pro detekci PDA bylo určeno od hodnot 190 do 700 nm. V pozitivním iontovém režimu byly realizovány ESI-MS analýzy. S rostoucí silou eluce mobilní fáze, byly eluovány látky v pořadí od více polárních sloučenin po méně polární sloučeniny. V průběhu celé chromatografické analýzy zůstala ponechána stejná koncentrace HCOOH (0,1 %).

4.2.8 NMR analýza

K identifikaci alkaloidů byla také použita NMR. Pro analýzu byl zvolen spektrometr VNMR S 500 pracující s frekvencí 499,87 MHz pro jádra ¹H a 125,70 MHz pro jádra ¹³C. Měření probíhala při teplotě 25 °C za použití rozpuštědla CDCl₃ (deuterovaného chloroformu). Hodnoty δ pars per milion (ppm) byly použity pro vyjádření chemických posunů látek a byly vztaženy k tetramethylsilanu (TMS) jako vnitřnímu standardu. Hodnoty chemického posunu CDCl₃ byly pro atomy ¹H δ = 7,26 ppm a pro ¹³C δ = 77,0 ppm. Data, která byla získaná měřením, byla uváděna ve výsledcích v tomto pořadí: chemický posun (δ), integrovaná intenzita ¹H NMR spekter, multiplicita (s je singlet, d je dublet, t je triplet, q je kvartet, dd je dublet dubletů, m je multiplet) a interakční konstanta J (Hz).

4.2.9 Optická otáčivost

Měření optické otáčivosti izolovaných alkaloidů probíhalo na polarimetru Automatic P3000 za laboratorní teploty 25 °C. Před měřením byly roztoky rozpuštěny v chloroformu. Specifická otáčivost látek byly propočtena podle vzorce:

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

α = naměřená optická otáčivost [°]; t = teplota při měření [°C]; D = D-čára sodíkové výbojky o λ = 589,3 nm; c = koncentrace změřeného alkaloidu [g/l]; l = délka kyvety [dm].

4.3 Izolace alkaloidů

4.3.1 Postup izolace alkaloidů z vybrané frakce VM 215–258

Diplomová práce navazuje na předchozí práce zaměřené na izolaci alkaloidů z *Vinca minor* L., mj. i na diplomovou práci Mgr. Alžběty Vašíčkové zabývající se frakcí VM 215–258, která byla separována flash chromatografií. Cílem mojí práce byla separace alkaloidů z vybraných podfrakcí VM 34–41, VM 86 a VM 87–113.

4.3.2 Izolace alkaloidů z dílčích podfrakcí

4.3.2.1 VM 34–41 (151,5 mg)

Frakce byla dělena pomocí preparativní TLC. Frakce byla rozpuštěna v minimálním množství $\text{CHCl}_3 + \text{EtOH}$ (1:1) a dále byla nanesena celkem na 8 hliníkových komerčních TLC desek se silikagelem. Následně byly vloženy do chromatografické komory nasycené parami mobilní fáze. Jako vyvíjející soustava byla zvolena směs S 1, počet vyvíjení 2x. Tímto způsobem byly získány 4 alkaloidní zóny (VM 34–41/1, VM 34–41/2, VM 34–41/3, a VM 34–41/4). Jednotlivé zóny (podfrakce) byly označeny, vyškrabaly a poté s příměsí křemeliny byly eluovány směsí $\text{CHCl}_3 + \text{EtOH}$ (1:1).

ZÓNA VM 34–41/1 (12 mg)

První alkaloidní zóna byla nanesena na 1 komerční TLC hliníkovou desku se silikagelem 60 F₂₅₄. Podfrakce byla přečištěna ve vyvíjející směsi S 2. Pro zřetelné oddělení stačilo nechat vyvinout desku pouze 1x. Přečištěním podfrakce byl získán alkaloid VH-1 o hmotnosti 5 mg. Kontrolní TLC je na obrázku (obrázek 39), po postřiku Dragendorffovým činidlem.



Obrázek 39: kontrolní TLC frakce VM 34-41/1

ZÓNA VM 34-41/2 (36 mg)

Tato podfrakce byla podrobena preparativní TLC na 3 komerčních chromatografických hliníkových deskách se silikagelem 60 F₂₅₄. Jako vyvíjející soustava byla zvolena vyvíjející směs S 3 a TLC desky byly vyvinuty 1x. Z této podfrakce byly získány po odpaření rozpouštědel celkem dvě další alkaloidní zóny 34-41/2A a 34-41/2B. U izolované zóny VM 34-41/2A byl detekován alkaloid s molekulovou hmotností 334. Jednalo se o 5 mg směsi, jež obsahovala kromě zmíněného alkaloidu i značné množství lipofilních nečistot, alkaloid se nepodařilo identifikovat pomocí NMR analýzy. Po provedení GC/MS analýzy nebyla bohužel v knihovně nalezena shoda. V případě zóny VM 34-41/2B, byl nalezen čistý alkaloid, který na základě GC/MS a NMR byl označen jako VH-2 (m = 11 mg). Kontrolní TLC je na obrázku.



Obrázek 40: kontrolní TLC frakce VM 34-41/2

ZÓNA VM 34–41/3

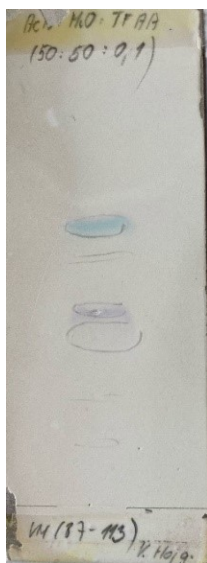
Hmotnost této podfrakce činila 25,9 mg. Vzorek byl nanesen na 2 komerční TLC desky se silikagelem 60 F₂₅₄ a jako mobilní fáze byla použita S 3. Desky byly vyvíjeny celkem 1x v této soustavě. Po vyvinutí, vyškrabání a eluování byla získána látka VH-2 o hmotnosti 9 mg.

ZÓNA VM 34–41/4

Tato zóna obsahovala směs asi 9 látek, které byly zastoupeny přibližně ve stejném poměru. Tato frakce nebyla dále zpracovávána.

4.3.2.2 Frakce VM 86 a VM 87–113

Na základě shodného alkaloidního profilu bylo rozhodnuto, že budou tyto dvě frakce VM 86 a VM 87–113 spojeny a budeme s nimi pracovat jako se spojenou frakcí. Při hledání vhodné mobilní fáze pro separaci alkaloidů na vrstvě silikagelu jsme došli k závěru, že se jedná o směs velmi polárních látek a rozhodli jsme pro použití separace na komerčních reverzních deskách silikagel 60 RP-C18 F254S. Vzorek byl nanesen celkem na 15 komerčních TLC deskách. Jako mobilní fáze byla zvolena směs S 4 a počet vyvíjení byl 2x. Oddělilo se nám celkem 5-zón, z nichž pouze 3 zóny po detekci jodoplatickým činidlem byly alkaloidní (VM 86–113/1, VM 86–113/2, VM 86–113/3). Zóny byly vyznačeny, vyškrabány a pak s přídavkem křemelinou byly eluovány směsí EtOH + CHCl₃ (1:1). Následně byla rozpouštědla odstraněna odpařením za sníženého tlaku. Kontrolní TLC na obrázku.



Obrázek 41: TLC frakce VM-87-113

ZÓNA VM 86–113/1

Celá tato podfrakce měla hmotnost 64 mg. Pro dočištění byla zvolena směs S 5 jako mobilní fáze a desky byly vyvíjeny 3x. Tímto způsobem bylo získáno celkem 40 mg látky. Čistota byla ověřena prostřednictvím HPLC/MS. Analýzou bylo zjištěno, že se jedná o směs tří látek, z nichž jedna tvoří většinu této směsi. Látka se nám na dostupných stacionárních fázích pro preparativní TLC bohužel nepodařila dočistit.

ZÓNA VM 86–113/2 a VM 86–113/3

Tyto podfrakce nebyly dále zpracovány – obsahovaly směsi látek o malé hmotnosti (10 mg a 9 mg).

4.4 Testování biologické aktivity izolovaných alkaloidů

4.4.1 Stanovení cholinesterasové inhibiční aktivity

4.4.1.1. Chemikálie

- acetylthiocholin jodid, (10mM roztok), (Sigma-Aldrich s.r.o., Praha)
- butyrylthiocholin jodid, (10mM roztok), (Sigma-Aldrich s.r.o., Praha)
- dimethylsulfoxid pro biologické testy $\geq 99,7\%$ p.a. (DMSO), (Sigma-Aldrich s.r.o., Praha)
- galanthamin hydrobromid $> 98\%$ (Changsha Organic Herb Inc., Čína)
- fysostigmin, (Sigma-Aldrich s.r.o., Praha)
- 5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina $\geq 98\%$ (5mM roztok), (Sigma-Aldrich s.r.o., Praha)

4.4.1.2 Pufry

- fosfátový pufr, (5mM), pH 7,4
- fosfátový pufr, (5mM), pH 7,4 s obsahem chloridu sodného (150mM)
- fosfátový pufr, (100mM), pH 7,4

4.4.1.3. Přístroje a software

- Centrifuga Boeco U-32 R, (Boeco, Německo) s rotorem Hettich 1611, (Hettich, Německo)
- GraphPad Prism verze 6.07, (GraphPad Software Inc., Kalifornie, USA)
- Jednokanálový Reader Synergy™ HT Multi-Detection Microplate Reader, (BioTek, USA)

4.4.1.4 Biologický materiál

Pro testování biologické aktivity izolovaných alkaloidů byl zdrojem AChE hemolyzát lidských erytrocytů. Zdrojem BuChE byla použita lidská plazma. ⁵⁵

4.4.1.5 Úprava hemolyzátu a plazmy

Z čerstvě odebrané plné krve byly získány lidské cholinesterasy (AChE a BuChE) od zdravého dárce. Po následném odběru byla ihned přidána antikoagulační přísada citronan sodný v poměru 1:9 (odpovídá 2 ml 3,4% citronanu na 18 ml krve, *in vitro* protisrážlivé činidlo). Tato krev byla rozdělena po 5 ml do přichystaných zkumavek. Z plné krve byla centrifugací oddělena plazma jako zdroj BuChE při rychlosti 4000 ot/min, teplotě 4 °C a po dobu 10 min. Plazma nad usazenými erytrocyty byla odsáta a následně byla uložena do lednice při teplotě 4 °C, do doby provedení stanovení aktivity BuChE.

Sediment erytrocytů byl zředěn 5mM fosfátovým pufrům o pH 7,4 s obsahem 150 mM chloridu sodného (na 13 ml). Celkem 3x byl erytrocytární sediment tímto pufrům promyt pomocí centrifugace a dokonale se odstranil tento pufr ze sedimentu. K erytrocytům bylo poté dodáno 5mM fosfátového pufru pH 7,4 (bez NaCl) v poměru (1:9, erytrocyty a fosfátový pufr), tato směs byla homogenizována a byla přesunuta do Erlenmayerovy baňky. Na magnetické míchačce za neustálého míchání (300 rpm) byly ponechány erytrocyty k spontánní hemolýze po dobu 10 min. Po skončení procesu byla bezprostředně u suspenze stanovena absorbance AChE v hemolyzátu a i BuChE v plazmě a podle potřeby byla upravena hodnota absorbance příslušným množstvím 5 mM fosfátového pufru pH 7,4. Získaný hemolyzát i plazma, byly uchovávány při teplotě -22°C do doby použití.

4.4.1.6 Vlastní stanovení cholinesterasové inhibiční aktivity (hodnoty IC₅₀)

Pomocí Ellmanovy spektrofotometrické metody s použitím 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoové kyseliny (DTNB) byla stanovena inhibiční aktivita izolovaných alkaloidů vůči AChE a BuChE. ⁵⁵

Tato metoda je založena na principu hydrolýzy esterů thiocholinu cholinesterasou za vzniku produktu thiocholinu a příslušné kyseliny. Thiolová funkční skupina thiocholinu reaguje spolu s DTNB za vzniku žlutě zbarveného produktu (dojde ke vzniku 5-sulfanyl-2-nitrobenzoové kyseliny). Spektrofotometricky bylo toto zbarvení sledováno, jako nárůst absorbance za 1 min při vlnových délkách $\lambda = 436$ nm pro AChE a $\lambda = 412$ nm pro BChE.

Aktivita stanovení enzymů byla provedena tak, že do 96jamkové mikrotitrační destičky bylo napipetováno 8,3 μ l plazmy (zdroj BuChE) nebo hemolyzátu (zdroj AChE). Dále bylo přidáno 283 μ l 5 mM DTNB a 8,3 μ l DMSO. Připravená směs byla ponechána 1 minutu na mikrotřepačce, aby byla důkladně promíchána a poté byla inkubována 5 minut při teplotě 37 °C. Samotná reakce byla zahájena dodáním 33,3 μ l roztoku 10 mM substrátu acetylcholin jodidu či 10 mM butyrylcholin jodidu. Na spektrofotometru Synergy™ HT Multi-Detection Microplate Readeru byla zjištěna změna absorbance (ΔA) při vlnové délce $\lambda = 436$ nm pro AChE a $\lambda = 412$ nm pro BuChE.

Stanovení inhibiční aktivity izolovaných látek probíhalo stejně, do 96jamkové destičky bylo napipetováno 8,3 μ l plazmy (zdroj BuChE) nebo hemolyzátu (zdroj AChE). Následně bylo přidáno 283 μ l 5 mM DTNB a 8,3 μ l zředěného vzorku v DMSO (40 mM, 10 mM, 4 mM, 1 mM, 0,4 mM a 0 mM) nebo slepého vzorku (DMSO). Směs byla stejnou časovou dobu promíchávána i inkubována. Pro zahájení reakce bylo přidáno 33,3 μ l roztoku 10mM acetylthiocholin jodidu či 10mM butyrylthiocholin jodidu, hodnoty naměřené z nárůstu absorbance byly po 2 min odečteny. Toto měření bylo opakováno 6x pro každou koncentraci enzymového preparátu. Pomocí programu GraphPad Prism byly vypočteny hodnoty IC_{50} pro pokles aktivity AChE a BuChE nelineární regresí, zároveň byly porovnány s hodnotami IC_{50} referenčních látek.

Procenta inhibice byla vypočítána podle následujícího vzorce:

$$\% I = 100 - \left(\frac{\Delta ABL}{\Delta ASA} \right) \times 100$$

% I – procenta inhibice, ΔABL – vzrůst absorbance u slepého vzorku za 1 min, ΔASA – vzrůst absorbance u měřeného vzorku za 1 min

4.4.2 Stanovení inhibiční aktivity prolyloligopeptidasy

4.4.2.1 Chemikálie

- bajkalin (Sigma-Aldrich s.r.o., Praha)
- dimethylsulfoxid pro biologické testy p.a. (DMSO, 10mM), (Sigma-Aldrich s.r.o., Praha)
- rekombinantní prolyloligopeptidasa, (Sigma-Aldrich s.r.o., Praha)
- Z-Gly-Pro-*p*-nitroanilidu, (10mM roztok), (Sigma-Aldrich s.r.o., Praha)
- Z-Pro-prolinal, (Sigma-Aldrich s.r.o., Praha)
- 1,4-dioxan, (5mM), (Lach-Ner, Neratovice)

4.4.2.2 Pufry

- fosfátový pufr, (10mM), pH 7,4 (složení: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl)

4.4.2.3 Přístroje a software

- ELISA Multi-mode Synergy 2 (BioTek Instruments, Inc., Winooski, Vermont, USA)
- GraphPad Prism verze 6.07 (GraphPad Software Inc., Kalifornie, USA)

4.4.2.4 Stanovení inhibiční aktivity látek vůči prolyloligopeptidase

Ve fyziologickém pufrovém roztoku (PBS) byl rozpuštěn enzym POP, se specifickou aktivitou 0,2 U/ml. K testování inhibiční aktivity byla zvolena polystyrenová 96jamková mikrotitrační destička s plochým čirým dnem. Testované látky zásobních roztoků byly připraveny rozpuštěním v 10 mM DMSO. Naředěním zásobních roztoků vodou, vznikly roztoky určené na testování (10^{-3} , 10^{-7} M). Slepé vzorky měly stejnou koncentraci jako DMSO, ale bez testovací látky. Jako substrát pro POP byl zvolen (Z-Gly-Pro-*p*-nitroanilid), který vznikl rozpuštěním v 50% 1,4-dioxanu (5 mM). Do každé mikrotitrační destičky bylo přidáno 170 μ l PBS, 5 μ l testované sloučeniny a 5 μ l roztoku POP. Následně byla destička inkubována po dobu 5 min při teplotě 37 °C. Po skončení bylo do každé jamky přidáno 20 μ l substrátu a směs byla znovu inkubována po dobu 30 min za teploty 37 °C. Množství vytvořených barevných produktů *p*-nitroanilinu bylo přímo úměrné aktivitě POP. Spektrofotometricky při vlnové délce $\lambda = 405$ nm byly změřeny roztoky za pomoci detektoru ELISA. Inhibiční aktivita IC_{50} testovaných látek byla vypočtena prostřednictvím programu GraphPad Prism a jednotlivé hodnoty byly porovnány s hodnotami IC_{50} referenčních látek. ⁵⁵

4.4.3 Stanovení cytotoxicity

4.4.3.1 Chemikálie

- Dimethylsulfoxid pro molekulární biologii, (DMSO), (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)
- WST-1 = 4-[3-(4-jodofenyl)-2-(4-nitrofenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzen disulfonát ¹¹⁶ (Roche, Mannheim, Německo)
- Doxorubicin (Sigma-Aldrich s.r.o., Praha)

4.4.3.2 Přístroje a software

- spektrometr Tecan Infinite M200 (Tecan Group, Männedorf, Švýcarsko)
- GraphPad Prism verze 5 (GraphPad Software, La Jolla, Kalifornie, USA)

4.4.3.3 Buněčné linie

Studie cytotoxicity *in vitro* probíhaly na nádorových a nenádorové buněčné linii. Nádorové buněčné linie byly použity A549 (adenokarcinom plic), A2780 (karcinom vaječníku), MOLT-4 (akutní lymfoblastická leukémie), Jurkat (akutní leukémie T-lymfocytů), HT-29 (kolorektální adenokarcinom), PANC-1 (epiteliální karcinom pankretu), HeLa (adenokarcinom děložního čípku), MCF-7 (adenokarcinom prsu), SAOS-2 (osteosarkom). Nenádorová kontrolní linie buněk byla MRC-5 (zdravé plicní fibroblasty). Inkubace všech buněčných linií probíhala podle pokynů metod kultivace. ¹¹⁷

4.4.3.4 Příprava a zpracování

Testované alkaloidy a doxorubicin (užití pro pozitivní kontrolu) byly před použitím rozpuštěny v DMSO. Vznikly takto zásobní roztoky o koncentraci (10–50 mM). Před prací byly zásobní roztoky zředěny vhodným kultivačním médiem na požadovanou koncentraci (na 10 μ M pro testovanou látku, 1 μ M pro doxorubicin). Finální koncentrace DMSO v eseji byla < 0,1 %, aby bylo zabráněno toxickým účinkům na buňky. ¹¹⁷

4.4.3.5 Stanovení cytotoxicity izolovaných látek

Stanovení cytotoxicity izolovaných alkaloidních látek probíhalo ve spolupráci s Lékařskou fakultou Univerzity Karlovy v Hradci Králové na Ústavu lékařské biochemie. Samotné stanovení cytotoxického účinku provedl RNDr. Radim Havelek, Ph.D.

K stanovení cytotoxické aktivity bylo použito činidlo WST-1, jenž má charakter tetrazoliové soli. Činidlo WST-1 je založeno na principu spektrofotometrické kvantifikace buněčné proliferace, růstu a životaschopnosti buněk. Podstatou fotometrické detekce byla redukce tetrazoliové soli na barevný produkt formazan.¹¹⁷ Čím byl větší počet životaschopných buněk, tím to mělo za následek víc aktivních mitochondriálních dehydrogenas, což mělo velký vliv na množství vzniklého barevného produktu formazanu.¹¹⁸ Pro testování byla použita 96jamková destička, na kterou bylo napipetováno (1000 buněk na 1 jamku) spolu se 100 μ l kultivačního média a tyto buňky byly inkubovány po dobu 24 hodin, při teplotě 37 °C a vlhkosti vzduchu 5 % CO₂. Po uplynutí doby bylo na buňky nanášeno buď 100 μ l zředěných testovaných alkaloidů nebo doxorubicin. Po 48 hodinách od nanášení bylo přidáno činidlo WST-1. Po 3 hodinách od přidání činidla byla změřena absorbance ve spektrometru při vlnové délce 440 nm. Životaschopnost testovaných buněk byla porovnávána spolu s nenádorovými buňkami, které byly ošetřeny pouze 0,1 % DMSO.¹¹⁷

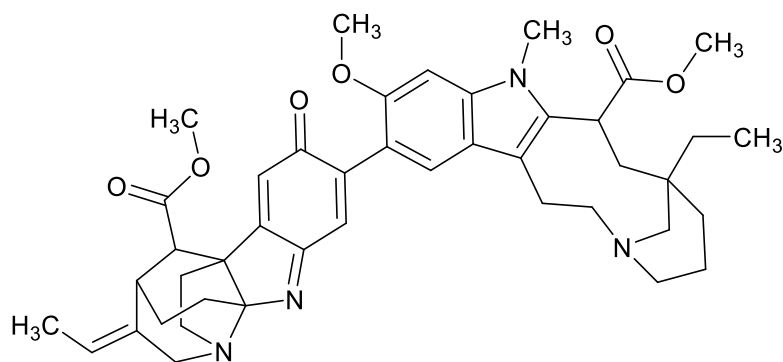
5 VÝSLEDKY

5.1. Strukturní analýza

5.1.1. VH-1 (nová sloučenina)

Sumární vzorec: C₄₃H₅₂N₄O₆

Molekulová hmotnost: 720, 91



Obrázek 42: vzorec VH-1

5.1.1.1 LC-MS

ESI-MS m/z [M+H]⁺ 721,4.

5.1.1.2 NMR analýza

Alkaloid je nový, dosud nebyl izolován. Z důvodu publikování v impaktovaném časopise nejsou ¹H a ¹³C spektra uváděna.

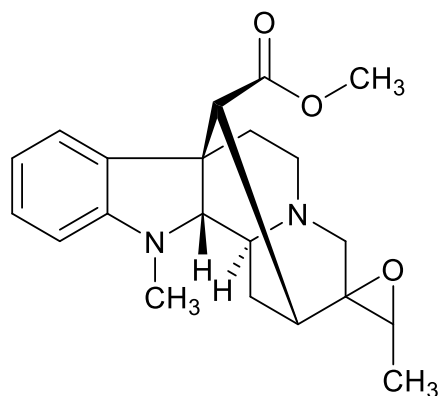
5.1.1.3 Optická otáčivost

$[\alpha]_D^{25} = -325^\circ$ (c 0,1 CHCl₃)

5.1.2 VH-2: (-)-Raukubainin

Sumární vzorec: C₂₁H₂₆N₂O₃

Molekulová hmotnost: 354, 45



Obrázek 43: vzorec VH-2 raukubainin

5.1.2.1 EI-MS

EI-MS m/z (%) M⁺: 354(62), 210(75), 202(54), 182(20), 167(21), 166(205), 158(94), 157(100), 144(88), 125(41).

5.1.2.2 NMR analýza

Alkaloid byl identifikován na základě porovnání ¹H a ¹³C NMR spekter s odbornou literaturou. ¹¹⁹

5.1.2.3 Optická otáčivost

$[\alpha]_D^{25} = -21^\circ$ (c 0,1; CHCl₃)

5.2 Biologická aktivita

5.2.1 Inhibice lidských cholinesteras a prolyloligopeptidasy

U těchto dvou izolovaných látek (VH-1, VH-2) byla testována a stanovena biologická aktivita.

Výsledky inhibice AChE, BuChE a POP uvádí tabulka 4.

Tabulka 4: výsledky inhibice testovaných látek

| Testovaná sloučenina | IC ₅₀ (μM) | | |
|------------------------|---------------------------|----------------------------|----------|
| | AChE | BuChE | POP |
| VH-1 (nová sloučenina) | >100 | >100 | M |
| VH-2 (-)-raukubainin | >100 | 94 ± 7 | >1000 |
| Huperzin A* | 33 ± 1 × 10 ⁻³ | >100 | - |
| Fysostigmin* | 63 ± 1 × 10 ⁻³ | 130 ± 4 × 10 ⁻³ | - |
| Baikalin* | - | - | 194 ± 14 |

* referenční látka; M = měří se.

5.3 Cytotoxicita

Výsledky měření cytotoxické aktivity nebyly v době odevzdání této diplomové práci ještě známy (vyhodnocení cytotoxické aktivity VH-1 a (-)-raukubaininu ještě probíhá).

6 DISKUZE

Náplní mé diplomové práce byla izolace jednoho nebo více čistých alkaloidů z frakce 215–258 a přesně z podfrakcí VM 34–41, VM 86 a VM 87–113, získané z rostliny *Vinca minor* L.

Za použití preparativní TLC se podařilo izolovat dvě látky z podfrakce VM 34–41, které byly dle výsledků z MS, NMR a optické otáčivosti identifikovány jako látky VH-1 a VH-2: (–)-raukubainin. (–)-Raukubainin, který spadá do skupiny alkaloidů sarpaginového typu, se již v roce 1981 podařilo izolovat z *Rauwolfia salicifolia* Griseb, přesněji z listů této rostliny.¹¹⁹ Druhý izolovaný alkaloid je nový, dosud nepopsaný s bis-indolovou chemickou strukturou a má jasně červenou barvu. Látka byla zatím pojmenována jako vinkaferugin.

U získaných izolovaných alkaloidů byla testována inhibiční aktivita vůči AChE, BuChE, POP a cílem této práce bylo i posoudit jejich cytotoxickou aktivitu vůči vybraným nádorovým liniím. Jako referenční látky pro testování cholinesterasové inhibice byly zvoleny huperzin A a fysostigmin. Huperzin A je látka, která působí selektivně vůči AChE ($IC_{50} = 33 \pm 1 \times 10^{-3} \mu M$), ale proti BuChE je neaktivní ($IC_{50} > 1000 \mu M$). Fysostigmin vykazuje duální inhibiční aktivitu vůči AChE ($IC_{50} = 63 \pm 1 \times 10^{-3} \mu M$) a BuChE ($IC_{50} = 130 \pm 4 \times 10^{-3} \mu M$). Nová sloučenina (VH-1) neinhibovala AChE, ani BuChE ($IC_{50} > 100 \mu M$), tudíž z hlediska inhibice cholinesteras se alkaloid jeví jako neperspektivní pro další studium. Podobně se jeví jako neperspektivní pro další studium i VH-2: (–)-raukubainin, protože jeho inhibiční aktivita AChE je zanedbatelná ($IC_{50} > 100 \mu M$). Vůči BuChE (–)-raukubainin vykazoval mírnou aktivitu ($IC_{50} = 94 \pm 7 \mu M$). Cholinergní hypotéza se bohužel zatím orientuje jen na AChE. Inhibice BuChE není plně objasněna u nemoci AD, avšak lze počítat s tím, že se léčba zaměří i víc na BuChE, neboť BuChE se podílí na zvyšování akumulace A β .²⁷ U obou alkaloidů se následně testovala i jejich schopnost inhibovat POP. Jako referenční sloučenina byla použita látka bajkalin ($IC_{50} = 194 \pm 14 \mu M$). (–)-Raukubainin byl vůči POP neaktivní ($IC_{50} > 1000 \mu M$). Inhibiční aktivita alkaloidu VH-1 vůči POP nebyla zatím změřena. Screening cytotoxické aktivity izolovaných alkaloidů ještě probíhá a v době odevzdání této diplomové práce nebyly výsledky známy. Nicméně existuje určitá predikce, že alkaloid VH-1 by mohl vykazovat cytotoxickou aktivitu, neboť ze strukturního hlediska je to bis-indolový alkaloid, a tudíž by mohl vykazovat významnější cytotoxickou aktivitu podobně jako vinkristin a vinblastin, které byly izolovány z *Catharanthus roseus* (L.) G. Don.¹²⁰ Vinkarubin, zatím jediný bis-indolový alkaloid izolovaný

z *Vinca minor* L., taktéž vykazuje známky cytotoxické aktivity.⁸⁶ V neposlední řadě také u alkaloidy reserpinu, jenž spadá svoji chemickou strukturou do skupiny alkaloidů sarpaginového typu, byla nalezena cytotoxická aktivita *in vitro* a také *in vivo*.¹¹² O cytotoxické aktivitě (–)-raukubaininu nebyla dosud publikována žádná práce.

Z podfrakcí VM 86 a VM 87–113 se nepodařilo izolovat alkaloidy v čisté formě, tyto podfrakce byly uloženy pro další zpracování na preparativní HPLC. Jelikož alkaloidy z těchto podfrakcí jsou polárnější sloučeniny, bylo by vhodné je separovat na C18 koloně, případně na pentafluorfenylové koloně. Od použití preparativní HPLC lze očekávat získání čistých látek, neboť obecně HPLC vykazuje mnohem lepší separační účinnost (dosahuje se mnohem většího počtu teoretických pater) než při použití TLC.¹²¹

7 ABSTRAKT

V. Hojgrová: Alkaloidy *Vinca minor* L. a jejich biologická aktivita VIII. Diplomová práce, Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra farmaceutické botaniky. Počet stran 69.

Tato diplomová práce se zabývá izolací alkaloidů z *Vinca minor* L. z čeledi Apocynaceae. Separace alkaloidů z vybrané frakce (VM 215–258), respektive z jejich podfrakcí (VM 34–41, VM 86, VM 87–113) probíhala pomocí preparativní TLC. Podařilo se izolovat dva čisté alkaloidy z podfrakce (VH 34–41). První alkaloid VH-1, který nebyl doposud izolován a druhý alkaloid VH-2: (–)-raukubainin. Alkaloidy byly identifikovány na základě EI-MS, LC-MS, NMR a optické otáčivosti a byly porovnány s daty v odborné literatuře. Izolované alkaloidy byly testovány na inhibiční aktivitu vůči acetylcholinesterase (AChE), butyrylcholinesterase (BuChE) a prolyloligopeptidase (POP) a na cytotoxicitu. Obě látky nevykazovaly po změření významnou cholinesterasovou inhibiční aktivitu IC_{50} vůči AChE, vůči BuChE vykazoval mírnou aktivitu pouze (–)-raukubainin ($IC_{50} = 94 \pm 7 \mu\text{M}$), VH-1 byl shledán jako neaktivní ($IC_{50} > 100 \mu\text{M}$). Inhibiční aktivita vůči POP byla testována zatím pouze u (–)-raukubaininu; byl shledán neaktivním ($IC_{50} > 1000 \mu\text{M}$). Výsledky cytotoxické aktivity alkaloidů (–)-raukubaininu a VH-1 v době odevzdávání této diplomové práce nebyly známy (vyhodnocování jejich cytotoxické aktivity ještě nebylo dokončeno).

Klíčová slova: *Vinca minor*, Apocynaceae, indolové alkaloidy, Alzheimerova choroba, acetylcholinesterasa, butyrylcholinesterasa, prolyloligopeptidasa, cytotoxicita

8 ABSTRACT

V. Hojgrová: Alkaloids of *Vinca minor* L. and their biological activity VIII. Diploma thesis, Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Department of Pharmaceutical Botany. Number of pages 69.

This diploma thesis deals with the isolation of alkaloids from *Vinca minor* L. from the family Apocynaceae. Separation of alkaloids from the selected fraction (VM 215–258) or from their subfractions (VM 34–41, VM 86, VM 87–113) was performed by preparative TLC. Two pure alkaloids were isolated from the subfraction (VH 34–41). The first VH-1 alkaloid not yet isolated and the second VH 2 alkaloid: (–)-raucubainin. Alkaloids were identified by EI-MS, LC-MS, NMR and optical rotation and were compared with data in the literature. Isolated alkaloids were tested for acetylcholinesterase (AChE), butyrylcholinesterase (BuChE) and prolyl oligopeptidase (POP) inhibitory activity and for cytotoxicity. Both substances did not show significant cholinesterase inhibitory activity IC_{50} against AChE after measurement, only (–)-raucubainin showed a slight activity against BuChE ($IC_{50} = 94 \pm 7 \mu\text{M}$), VH-1 was found to be inactive ($IC_{50} > 100 \mu\text{M}$). POP inhibitory activity has so far only been tested for (–)-raucubainin; was found to be inactive ($IC_{50} > 1000 \mu\text{M}$). The results of the cytotoxic activity of the alkaloids (–)-raucubainin and VH-1 at the time of submission of this diploma thesis were not known (evaluation of their cytotoxic activity has not yet been completed).

Key words: *Vinca minor*, Apocynaceae, indole alkaloids, Alzheimer's disease, acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase, prolyl oligopeptidase, cytotoxicity

9 LITERATURA

- (1) Dolina, J. Civilizace a Nemoci; Praha: Futura, 2009.
- (2) Civilizační choroby <http://www.lich.cz/uvod/> (staženo 21. dubna 2021).
- (3) ADINACO | Vědecký portál - Farmaceutická fakulta UK <https://portal.faf.cuni.cz/Groups/ADINACO/> (staženo 19. ledna 2021).
- (4) Jiráček, R.; Holmerová, I.; Borzová, C.; kolektiv. Demence a jiné poruchy paměti: komunikace a každodenní péče; Grada Publishing a.s.: Praha, 2009.
- (5) Franková, V. Demence u Alzheimerovy Choroby. Psychiatr. praxi 2017, 1, 30.
- (6) Zvěřová, M. Alzheimerova Demence; Grada: Praha, 2017.
- (7) Jiráček, R. Diagnostika a Terapie Alzheimerovy Choroby. Neurol. praxi 2008, 4, 240.
- (8) Sheardová, K.; Líněk, V.; Ressler, P. Doporučené postupy pro terapii Alzheimerovy nemoci a ostatních demencí. Psychiatr. pro Praxi 2009, 10, 216.
- (9) Martínková, J. Farmakologie pro Studenty Zdravotnických Oborů; Grada Publishing a.s.: Praha, 2007.
- (10) Qing, Z.-X.; Huang, J.-L.; Yang, X.-Y.; Liu, J.-H.; Cao, H.-L.; Xiang, F.; Cheng, P.; Zeng, J.-G. Anticancer and Reversing Multidrug Resistance Activities of Natural Isoquinoline Alkaloids and Their Structure-Activity Relationship. Current medicinal chemistry 2018, 25, 5088.
- (11) Taher, M.; Billah, M. M.; Ahammed, M. Vinca Alkaloid- the Second Most Used Alkaloid for Cancer Treatment- A Review. 2017.
- (12) Fandy, T. E.; Abdallah, I.; Khayat, M.; Colby, D. A.; Hassan, H. E. In Vitro Characterization of Transport and Metabolism of the Alkaloids: Vincamine, Vinpocetine and Eburnamonine. Cancer Chemother Pharmacol 2016, 77, 259.
- (13) Cibičková, L.; Palička, V. Alzheimerova Choroba, Cholesterol a Apolipoprotein E—Nové Souvislosti. Klin. Biochem. Metab 2005, 13, 127.
- (14) Alois Alzheimer: příběh jedné nemoci <https://vesmir.cz/cz/casopis/archiv-casopisu/2007/cislo-4/alois-alzheimer-pribeh-jedne-nemoci.html> (staženo 25. ledna 2021).
- (15) Koudelková, M. Diagnostika Alzheimerovy Demence Prostřednictvím Proteinů Tau, Fosfo-Tau a Beta-Amyloidu v Mozkomíšním Moku. Labor Aktuell 2010, 14, 8.

- (16) Zeman, M.; Jiráček, R. Alzheimerova Choroba a Diabetes Mellitus Typu 2. *Neurol. praxi* 2012, 13, 105.
- (17) Mátl, O.; Mátlová, M.; Holmerová, I. Zpráva o Stavu Demence 2016. Česká alzheimerská společnost 2016.
- (18) Doležal, M.; Kučerová, M.; Miletín, M.; Musílek, K.; Opletalová, V.; Zimčík, P. Farmaceutická chemie léčiv působících na centrální nervový systém; Karolinum: Praha, 2013.
- (19) Pidrman, V. Demence - 1. Část: Diagnostika a Diferenciální Diagnostika. *Med. Pro Praxi* 2007, 4, 83.
- (20) Rössner, P. Alzheimerova choroba - diagnostika a léčba. *Neurol. praxi* 2004, 1, 11.
- (21) Laczó, J.; Andel, R.; Vyhnaček, M.; Vlček, K.; Nedelska, Z.; Matoska, V.; Gazova, I.; Mokrisova, I.; Sheardova, K.; Hort, J. APOE and Spatial Navigation in Amnesic MCI: Results from a Computer-Based Test. *Neuropsychology* 2014, 28, 676.
- (22) Vlček, J. *Klinická Farmacie I*; Grada: Praha, 2010.
- (23) Hroudová, J. Výzkum Nových Léčiv u Alzheimerovy Choroby. *Psychiatr. praxi* 2017, 18, 7.
- (24) Ganong, W. F. *Přehled Lékařské Fyziologie: Dvacáté Vydání*; Galén: Praha, 2005.
- (25) Jiráček, R. Farmakoterapie Alzheimerovy Choroby. *Prakt. lékáren.* 2009, 5, 176.
- (26) Silva, T.; Reis, J.; Teixeira, J.; Borges, F. Alzheimer's Disease, Enzyme Targets and Drug Discovery Struggles: From Natural Products to Drug Prototypes. *Ageing Res. Rev.* 2014, 15, 116.
- (27) Brunovský, M. Inhibitory Cholinesteráz v Léčbě Alzheimerovy Nemoci. *Neurol. pro praxi* 2007, 2, 112.
- (28) Nečas, E. *Obecná Patologická Fyziologie*; Karolinum: Praha, 2000.
- (29) Chmátalová, Z.; Skoumalové, A. Oxidační Stres u Alzheimerovy Choroby a Jeho Důsledky. *Klin. Biochem. Metab* 2014, 22, 189.
- (30) Bartoš, A.; Řípková, D. Pokroky v Diagnostice Alzheimerovy Nemoci. *Psychiat. pro Praxi* 2007, 1, 17.
- (31) Iqbal, K.; Liu, F.; Gong, C.-X. Tau and Neurodegenerative Disease: The Story so Far. *Nature reviews. Neurology* 2015, 12, 15.

- (32) Koudelková, M. Praktické Zkušenosti s Laboratorní Diagnostikou Alzheimerovy Nemoci Pomocí Tau Proteinu, Fosfo-Tau Proteinu a Beta Amyloidu v Likvoru. *Neurol. pro praxi* 2009, 10, 290.
- (33) Wang, R.; Reddy, P. H. Role of Glutamate and NMDA Receptors in Alzheimer's Disease. *J. Alzheimer's Dis.* 2017, 57, 1041.
- (34) Jiráček, R. Terapie Alzheimerovy Choroby a Příbuzných Neurodegenerativních Demencí. *Neurol. pro praxi* 2010, 10, 384.
- (35) Zhu, S.; Stein, R. A.; Yoshioka, C.; Lee, C.-H.; Goehring, A.; Mchaourab, H. S.; Gouaux, E. Mechanism of NMDA Receptor Inhibition and Activation. *Cell* 2016, 165, 704.
- (36) Koukolík, F.; Jiráček, R. Alzheimerova Nemoc a Další Demence; Grada: Praha, 1998.
- (37) Cibičková, L.; Palička, V. Existuje Vztah Mezi Statiny a Cholinerním Systémem? *Klin Farmakol Farm* 2006, 20, 38.
- (38) Zvolský, P.; Raboch, J. *Psychiatrie*. 1. Vydání; Galén: Praha, 2001.
- (39) Fenclová, E.; Albrecht, J.; Harsa, P.; Jiráček, R. Rizikové Faktory Alzheimerovy Choroby. *Čes a slov Psychiat* 2020, 116, 59.
- (40) Jiráček, R. Stará a Nová Diagnostická Kritéria pro Alzheimerovu Chorobu v Podmínkách ČR. *Neurol. praxi* 2011, 12, 135.
- (41) Hort, J.; Jiráček, R. Alzheimerova Choroba a Jiné Demence, Aneb, Co v Učebnicích 20. Století Nebylo; MediMedia Information: Praha, 2007.
- (42) Prokopová, I. Farmakoterapie Alzheimerovy Demence a Přidružených Neuropsychiatrických Symptomů – 1. Část. *Psychiatr. praxi* 2018, 19, 7.
- (43) Martin, J.; Kršková, Z.; Dušek, J. Huperzin A a Jiné Přírodní Látky v Léčbě Alzheimerovy Choroby. *Prakt. lékařn.* 2011, 7, 39.
- (44) Vališ, M.; Caisberger, F.; Šimůnek, L.; Linková, H. Farmakoterapie Demencí–Pokroky v Léčbě a Aktuální Doporučení. *Remedia* 2013, 23, 396.
- (45) Dušek, K.; Večeřová-Procházková, A. *Diagnostika a Terapie Duševních Poruch*; Grada: Praha, 2010.
- (46) Zhang, Y.; Li, J.; Yan, C. An Update on Vinpocetine: New Discoveries and Clinical Implications. *European Journal of Pharmacology* 2018, 819, 30.
- (47) Cavinton, 5MG TBL NOB 50, Státní ústav pro kontrolu léčiv <https://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?code=0004063&tab=texts> (staženo 10. března 2021).

- (48) Červenka, F.; Jahodář, L. Rostlinné Metabolity Jako Nootropika a Kognitiva. Čes. slov. Farm. 2006, 55, 219.
- (49) Vranová, V. Fytofarmakologie Standardizovaného Extraktu z Listů Ginkgo Biloba EGb 761. Neurol. praxi 2018, 19, 19.
- (50) Boada, M.; Ortiz, P.; Anaya, F.; Hernández, I. Amyloid-Targeted Therapeutics in Alzheimer's Disease: Use of Human Albumin in Plasma Exchange as a Novel Approach for Abeta Mobilization. Drug News Perspect. 2009, 22, 325.
- (51) Lemere, C. A.; Masliah, E. Can Alzheimer Disease Be Prevented by Amyloid- β Immunotherapy? Nat. Rev. Neurol. 2010, 6, 108.
- (52) Tolar, M.; Abushakra, S.; Sabbagh, M. The Path Forward in Alzheimer's Disease Therapeutics: Reevaluating the Amyloid Cascade Hypothesis. Alzheimer's Dementia 2020, 16, 1553.
- (53) Forum CZ 46 2019 https://issuu.com/ukforum/docs/forum_cz_46_2019_web (staženo 12. března 2021).
- (54) García-Horsman, J. A.; Männistö, P. T.; Venäläinen, J. I. On the Role of Prolyl Oligopeptidase in Health and Disease. Neuropeptides 2007, 41, 1.
- (55) Siatka, T.; Adamcová, M.; Opletal, L.; Cahlíková, L.; Jun, D.; Hrabínová, M.; Kuneš, J.; Chlebek, J. Cholinesterase and Prolyl Oligopeptidase Inhibitory Activities of Alkaloids from Argemone Platyceras (Papaveraceae). Molecules 2017, 22, 1181.
- (56) Lauretti, E.; Dincer, O.; Praticò, D. Glycogen Synthase Kinase-3 Signaling in Alzheimer's Disease. Biochim. Biophys. Acta, Mol. Cell Res. 2020, 1867, 118664.
- (57) Martino, E.; Casamassima, G.; Castiglione, S.; Cellupica, E.; Pantalone, S.; Papagni, F.; Rui, M.; Siciliano, A. M.; Collina, S. Vinca Alkaloids and Analogues as Anti-Cancer Agents: Looking Back, Peering Ahead. Bioorg. Med. Chem. Lett. 2018, 28, 2816.
- (58) Mushtaq, S.; Abbasi, B. H.; Uzair, B.; Abbasi, R. Natural Products as Reservoirs of Novel Therapeutic Agents. EXCLI journal 2018, 17, 420.
- (59) Vinblastin Teva, 1MG/ML INJ SOL 1X10ML, Státní ústav pro kontrolu léčiv <https://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?code=0129597&tab=texts> (staženo 11. dubna 2021).
- (60) Zhang, Z.; Lu, C.; Wang, P.; Li, A.; Zhang, H.; Xu, S. Structural Basis and Mechanism for Vindoline Dimers Interacting with α,β -Tubulin. ACS Omega 2019, 4, 11938.

- (61) Vincristin <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5978> (staženo 12. dubna 2021).
- (62) Pozzi, E.; Fumagalli, G.; Chiorazzi, A.; Canta, A.; Cavaletti, G. Genetic Factors Influencing the Development of Vincristine-Induced Neurotoxicity. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* 2021, 17, 215.
- (63) Vincristine Teva, 1MG/ML INJ SOL 1X1ML, Státní ústav pro kontrolu léčiv <https://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?code=0011420&tab=texts> (staženo 12. dubna 2021).
- (64) Vindesin <https://drugs.ncats.io/drug/RSA8KO39WH> (staženo 12. dubna 2021).
- (65) Katolická, J. Vinflunin. *Remedia* 2013, 23, 167.
- (66) Vinorelbin <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5311497> (staženo 13. dubna 2021).
- (67) Vinorelbine Accord, 10MG/ML INF CNC SOL 1X5ML, Státní ústav pro kontrolu léčiv <https://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?kod=0241434> (staženo 13. dubna 2021).
- (68) Vinca minor L. – barvínek menší <https://apps.faf.cuni.cz/daidalea/PlantSpecies.asp?id=10024> (staženo 28. března 2021).
- (69) Jahodář, L. *Farmakobotanika: Semenné Rostliny*; Karolinum: Praha, 2006.
- (70) Vinca minor L. <https://botany.cz/cs/vinca-minor/> (staženo 30. března 2021).
- (71) Slavík, B.; Štěpánková, J. *Květena České Republiky*; Praha: Academia, 2000.
- (72) Barvínek menší - Vinca minor <http://www.kvetenacr.cz/detail.asp?IDdetail=140> (staženo 12. ledna 2021).
- (73) Koyuncu, M. A New Species of Vinca (Apocynaceae) from Eastern Anatolia, Turkey. *Turk. J. Bot.* 2012, 36, 247.
- (74) Burnie, G. *Botanika: Ilustrovaný Abecední Atlas 10 000 Zahradních Rostlin s Návodem, Jak Je Pěstovat*; Praha: Slovart, 2007.
- (75) Eisenman, S. W.; Zaurov, D. E.; Struwe, L. *Medicinal Plants of Central Asia: Uzbekistan and Kyrgyzstan*; Springer Science & Business Media, 2012.
- (76) Vinca herbaceae Waldst. et Kit. <https://botany.cz/cs/vinca-herbacea/> (staženo 29. března 2021).

- (77) Koyuncu, M.; Ekşi, G.; Gençler Ozkan, A. *Vinca Ispartensis* (Apocynaceae), a New Species from Turkey. *Ann. Bot. Fenn.* 2015, 52, 340.
- (78) *Vinca major* L. <https://botany.cz/cs/vinca-major/> (staženo 29. března 2021).
- (79) *Vinca difformis* Pourret
http://www.plantasyhongos.es/herbarium/htm/Vinca_difformis.htm (staženo 29. března 2021).
- (80) *Vinca erecta* - Изображение особи - Плантариум
<https://www.planтариум.ru/page/image/id/232144.html> (staženo 29. března 2021).
- (81) *Vinca herbacea* Waldst. & Kit.
<http://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:82691-1> (staženo 29. března 2021).
- (82) *Vinca ispartensis* Koyuncu & Ekşi <https://www.turkiyebitkileri.com/en/photo-gallery/apocynaceae-zakkumgiller/vinca-cezayirmenekşesi/vinca-ispartensis/36746-isparta.html> (staženo 29. března 2021).
- (83) *Vinca soneri* Koyuncu <https://www.turkiyebitkileri.com/en/photo-gallery/apocynaceae-zakkumgiller/vinca-cezayirmenekşesi/vinca-soneri/1777-kayseri.html> (staženo 29. března 2021).
- (84) Spilková, J.; Martin, J.; Siatka, T.; Tůmová, L.; Kašparová, M. *Farmakognozie, Karolinum.*; Praha, 2016.
- (85) Korbelař, J.; Endris, Z.; Krejča, J. *Naše Rostliny v Lékařství*; Avicenum: Praha, 1970.
- (86) 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.
- (87) Malikov, V. M.; Yunusov, S. Yu. *Vinca Alkaloids. Chem. Nat. Compd.* 1977, 13, 497.
- (88) Pegnyemb, D. E.; Ghogomu, R. T.; Sondengam, B. L. *Minor Alkaloids from the Seeds of Voacanga Africana. Fitoterapia* 1999, 70, 446.
- (89) Hesse, M. *Indolalkaloide in Tabellen: Ergänzungswerk*; Springer-Verlag: Heidelberg, 1968.
- (90) Proksa, B.; Uhrín, D.; Grossmann, E.; Votick, Z. *Vincarubime, a Novel Bisindole Alkaloid from Vinca Minor L. Tetrahedron Letters* 1986, 27, 5413.
- (91) 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.

- (92) Cordell, G. A. *The Alkaloids: Chemistry and Pharmacology: Volume 42*; Academic Press, 1992.
- (93) 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.
- (94) Döpke, W.; Meisel, H.; Fetilhaber, H.-W. Die Struktur Des Vincatins, Eines Oxindol-Alkaloids Aus Vincaminor L. *Tetrahedron Letters* 1969, 10, 1701.
- (95) Namjoshi, O. A.; Cook, J. M. Sarpagine and Related Alkaloids. *Alkaloids Chem. Biol.* 2016, 76, 63.
- (96) 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.
- (97) Janot, M. M.; Le Men, J.; Aghoramurthy, K.; Robinson, R. The Identity of Vincamajordine and Akuammine. *Experientia* 1955, 11, 343.
- (98) Creed, S. M.; Gutridge, A. M.; Argade, M. D.; Hennessy, M. R.; Friesen, J. B.; Pauli, G. F.; van Rijn, R. M.; Riley, A. P. Isolation and Pharmacological Characterization of Six Opioidergic *Picralima Nitida* Alkaloids. *J. Nat. Prod.* 2021, 84, 71.
- (99) Oxindol <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/321710> (staženo 7. dubna 2021).
- (100) Tulyaganov, T. S.; Nigmatullaev, A. M. Alkaloids of Vinca Minor. *Chem. Nat. Compd.* 2000, 36.
- (101) Zhang, M.; Yang, Z.; Tan, Q.; Jiang, Y.; Yang, J.; Su, X.; Qiao, Z.; Zhou, W.; He, L.; Qiu, H. Asymmetric Total Synthesis of Sarpagine and Koumine Alkaloids. *Angew. Chem., Int. Ed.* 2021.
- (102) Vincamin <https://drugs.ncats.io/drug/996XVD0JHT> (staženo 12. dubna 2021).
- (103) Vincamin <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/15376> (staženo 12. dubna 2021).
- (104) Shittu, H.; Gray, A.; Furman, B.; Young, L. Glucose Uptake Stimulatory Effect of Akuammicine from *Picralima Nitida* (Apocynaceae). *Phytochemistry Letters* 2010, 3, 53.

- (105) Gülçin, I.; Beydemir, Ş.; Topal, F.; Gagua, N.; Bakuridze, A.; Bayram, R.; Gepdiremen, A. Apoptotic, Antioxidant and Antiradical Effects of Majdine and Isomajdine from *Vinca Herbacea* Waldst. and Kit. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 2012, 27, 587.
- (106) Shang, J.-H.; Cai, X.-H.; Feng, T.; Zhao, Y.-L.; Wang, J.-K.; Zhang, L.-Y.; Yan, M.; Luo, X.-D. Pharmacological Evaluation of *Alstonia Scholaris*: Anti-Inflammatory and Analgesic Effects. *J. Ethnopharmacol.* 2010, 129, 174.
- (107) Mustofa, M.; Valentin, A.; Lewin, G. In Vitro Antiplasmodial Activity and Cytotoxicity of Vincadifformine and Its Semisynthetic Derivatives. *Indonesian Journal of Biotechnology* 2006, 11, 878.
- (108) Šturdíková, M.; Fуска, J.; Grossmann, E.; Votický, Z. New Compounds with Cytotoxic and Antitumor Effects. Part 6: Monomeric Indole Alkaloids of *Vinca Minor* L. and Their Effect on P388 Cells. *Die Pharmazie* 1986, 41, 270.
- (109) Erdő, S. L.; Molnár, P.; Lakics, V.; Bence, J. Zs.; Tömösközi, Z. Vincamine and Vincanol Are Potent Blockers of Voltage-Gated Na⁺ Channels. *European Journal of Pharmacology* 1996, 314, 69.
- (110) Zhang, L.; Zhang, C.-J.; Zhang, D.-B.; Wen, J.; Zhao, X.-W.; Li, Y.; Gao, K. An Unusual Indole Alkaloid with Anti-Adenovirus and Anti-HSV Activities from *Alstonia Scholaris*. *Tetrahedron Letters* 2014, 55, 1815.
- (111) Parai, D.; Banerjee, M.; Dey, P.; Mukherjee, S. K. Reserpine Attenuates Biofilm Formation and Virulence of *Staphylococcus Aureus*. *Microbial Pathogenesis* 2020, 138, 103790.
- (112) Abdelfatah, S. A. A.; Efferth, T. Cytotoxicity of the Indole Alkaloid Reserpine from *Rauwolfia Serpentina* against Drug-Resistant Tumor Cells. *Phytomedicine* 2015, 22, 308.
- (113) Chapter 2 Detection of Alkaloids in TLC. In *Journal of Chromatography Library*; Svendsen, A. B., Verpoorte, R., Eds.; Chromatography of alkaloids; Elsevier, 1983; Vol. 23, rozsah 11–18.
- (114) Gasparic, J.; Churacek, J. *Papírová a Tenkovrstvá Chromatografie Organických Sloučenin*; Státní nakladatelství technické literatury: Praha, 1981.
- (115) Wagner, H.; Blatt, S. *Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas*; Springer Science & Business Media: Berlín, 1984.

- (116) Mahto, S. K.; Chandra, P.; Rhee, S. W. In Vitromodels, Endpoints and Assessment Methods for the Measurement of Cytotoxicity. *Toxicol. Environ. Health. Sci.* 2010, 2, 87.
- (117) Breiterová, K.; Koutová, D.; Maříková, J.; Havelek, R.; Kuneš, J.; Majorošová, M.; Opletal, L.; Hošťálková, A.; Jenčo, J.; Řezáčová, M.; Cahlíková, L. Amaryllidaceae Alkaloids of Different Structural Types from *Narcissus* L. Cv. Professor Einstein and Their Cytotoxic Activity. *Plants (Basel)* 2020, 9, 2.
- (118) BioVision <https://www.biovision.com/documentation/datasheets/K304.pdf> (staženo 9. května 2021).
- (119) Sierra, P.; Novotný, L.; Samek, Z.; Buděšínský, M.; Dolejš, L.; Bláha, K. Alkaloids of *Rauvolfia Salicifolia* Griseb Species. *Collect. Czech. Chem. Commun.* 1982, 47, 2912.
- (120) Khanavi, M.; Pourmoslemi, S.; Farahanikia, B.; Hadjiakhoondi, A.; Ostad, S. N. Cytotoxicity of *Vinca Minor*. *Pharmaceutical Biology* 2010, 48, 96.
- (121) Doran, P. M. 10 - Unit Operations. In *Bioprocess Engineering Principles*; Doran, P. M., Ed.; Academic Press: London, 1995; rozsah 218–253.