

UNIVERZITA KARLOVA  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ  
KATEDRA FARMAKOGNOZIE

---

DIPLOMOVÁ PRÁCA

**IZOLÁCIA ALKALOIDOV DRUHU *GEISSOSPERMUM VELLOSI*  
ALEMÃO A ŠTÚDIUM ICH BIOLOGICKEJ AKTIVITY I.**

Vedúci diplomovej práce: PharmDr. Marcela Šafratová, Ph.D.

Hradec Králové, 2020

Anna Buláková

**CHARLES UNIVERSITY**  
**FACULTY OF PHARMACY IN HRADEC KRALOVE**  
**DEPARTMENT OF PHARMACOGNOSY**

---

**DIPLOMA THESIS**

**ISOLATION OF ALKALOIDS OF THE SPECIES *GEISSOSPERMUM*  
*VELLOSII* ALEMÃO AND STUDY OF THEIR BIOLOGICAL ACTIVITY**

**I.**

Supervisor: PharmDr. Marcela Šafratová, Ph.D.

Hradec Králové, 2020

Anna Buláková

## **PREHLÁSENIE**

Prehlasujem, že táto diplomová práca je mojím vlastným dielom, ktorú som vypracovala samostatne pod vedením a dohľadom PharmDr. Marcely Šafratovej, Ph.D.. Použitá literatúra a ďalšie zdroje, z ktorých som pri písaní tejto práce čerpala, som riadne citovala a sú uvedené v zozname použitej literatúry. Práca nebola využitá k získaniu iného alebo rovnakého titulu.

## Pod'akovanie

Chcela by som sa poďakovať vedúcej diplomovej práce PharmDr. Marcelle Šafratovej, Ph.D. za cenné rady a odbornú pomoc, ktoré mi poskytla pri vypracovaní tejto diplomovej práce. Taktiež by som sa chcela poďakovať doc. PharmDr. Jiřímu Kunešovi, CSc. za nameranie a interpretáciu NMR spektra.

## OBSAH

<b>PREHĽAD OBRÁZKOV A TABULIEK .....</b>	<b>4</b>
<b>ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK .....</b>	<b>5</b>
<b>1 ÚVOD .....</b>	<b>6</b>
<b>2 CIEĽ PRÁCE .....</b>	<b>8</b>
<b>3 TEORETICKÁ ČASŤ .....</b>	<b>9</b>
<b>3.1. Čeľad' Apocynaceae .....</b>	<b>9</b>
3.1.1 Farmaceuticky významné drogy čeľade Apocynaceae .....	9
3.1.1.1 <i>Catharanthus roseus</i> .....	10
3.1.1.2 <i>Vinca minor</i> .....	11
3.1.1.3 <i>Alstonia scholaris</i> .....	12
3.1.1.4 <i>Tabernaemontana divaricata</i> .....	13
3.1.1.5 <i>Holarrhena antidysenterica</i> .....	14
3.1.1.6 <i>Nerium oleander</i> .....	15
3.1.1.7 <i>Thevetia peruviana</i> .....	16
<b>3.2. Indolové alkaloidy .....</b>	<b>17</b>
3.2.1 Biosyntéza indolových alkaloidov .....	17
3.2.2 Základné podtypy indolových alkaloidov .....	19
3.2.2.1 Indolové alkaloidy indolalkylamínového typu .....	19
3.2.2.2 Indolové alkaloidy fyzostigminového typu .....	20
3.2.2.3 Indolové alkaloidy karbolínového typu .....	20
3.2.2.4 Indolové alkaloidy ergolínového typu .....	22
3.2.2.5 Indolové alkaloidy strychnínového typu .....	24
<b>3.3 <i>Geissospermum vellosii</i> Allemão .....</b>	<b>25</b>
3.3.1 Taxonomické zaradenie <i>Geissospermum vellosii</i> Allemão .....	25
3.3.2 Popis <i>Geissospermum vellosii</i> Allemão .....	25
3.3.3 Obsahové látky <i>Geissospermum vellosii</i> Allemão .....	26
3.3.4 Biologická aktivita alkaloidov rastliny <i>Geissospermum vellosii</i> Allemão .....	28
3.3.4.1 Anticholinesterázová aktivita .....	28
3.3.4.2 Antinociceptívna aktivita .....	29
3.3.4.3 Protinádorová aktivita .....	30

3.3.4.4 Benígna hyperplázia prostaty .....	32
<b>3.4 Alzheimerová choroba .....</b>	<b>33</b>
<b>4 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ .....</b>	<b>35</b>
<b>4.1 Materiál, chemikálie a prístrojové vybavenie .....</b>	<b>35</b>
4.1.1 Rozpúšťadlá a chemikálie .....	35
4.1.2 Pomocný materiál .....	35
4.1.3 Detekčné činidlá .....	35
4.1.4 Mobilné fázy pre tenkovrstvú chromatografiu .....	36
4.1.5 Adsorpčný materiál pre chromatografiu .....	36
4.1.6 Prístrojové vybavenie .....	36
<b>4.2 Všeobecné postupy .....</b>	<b>37</b>
4.2.1 Príprava rozpúšťadiel .....	37
4.2.2 Odparovanie .....	37
4.2.3 Sušenie a skladovanie .....	37
4.2.4 Stĺpcová chromatografia .....	37
4.2.5 Príprava liatych dosiek pre preparatívnu tenkovrstvú chromatografiu ....	37
4.2.6 Preparatívna tenkovrstvá chromatografia .....	37
4.2.7 Detekcia alkaloidov .....	38
<b>4.3 Stanovenie biologickej aktivity .....</b>	<b>38</b>
4.3.1 Testovanie inhibičnej aktivity získaných alkaloidov proti cholínesterázam .....	38
4.3.1.1 Chemikálie .....	38
4.3.1.2 Prístroje .....	39
4.3.1.3 Podmienky merania .....	39
4.3.2 Stanovenie inhibičnej aktivity izolovaných alkaloidov proti AChE a BuChE .....	39
<b>4.4 Izolácia alkaloidov .....</b>	<b>40</b>
4.4.1 Rastlinný materiál .....	40
4.4.2 Príprava alkaloidného extraktu .....	40
4.4.3 Stĺpcová chromatografia etherového výtrepku .....	42
4.4.4 Izolácia alkaloidov z podfrakcie GV 11 (189-199) .....	44
<b>4.5 Štruktúrna analýza .....</b>	<b>45</b>
4.5.1 GC-MS analýza .....	45
4.5.2 Nukleárna magnetická rezonancia (NMR analýza) .....	45

4.5.3 Optická otáčavosť .....	45
<b>5 VÝSLEDKY .....</b>	<b>46</b>
<b>5.1 Identifikácia štruktúry izolovaného alkaloidu .....</b>	<b>46</b>
5.1.1 Normacusin B .....	46
5.1.1.1 NMR analýza .....	46
5.1.1.2 GC-MS analýza.....	46
5.1.1.3 Optická otáčavosť.....	46
<b>5.2 Inhibičná aktivita izolovaného alkaloidu.....</b>	<b>47</b>
<b>6 DISKUSIA A ZÁVER .....</b>	<b>48</b>
<b>7 LITERATÚRA.....</b>	<b>50</b>
<b>8 ABSTRAKT.....</b>	<b>58</b>
<b>9 ABSTRACT.....</b>	<b>59</b>

## PREHĽAD OBRÁZKOV A TABULIEK

Obrázok 1 <i>Catharanthus roseus</i> .....	11
Obrázok 2 <i>Vinca minor</i> .....	11
Obrázok 3 <i>Alstonia scholaris</i> .....	12
Obrázok 4 <i>Tabernaemontana divaricata</i> .....	14
Obrázok 5 <i>Holarrhena antidysenterica</i> .....	14
Obrázok 6 Štruktúra alkaloidov rastliny <i>H. antidysenterica</i> .....	15
Obrázok 7 <i>Nerium oleander</i> .....	17
Obrázok 8 <i>Thevetia peruviana</i> .....	17
Obrázok 9 Prvé kroky biosyntézy indolových alkaloidov .....	18
Obrázok 10 Štruktúra základných podtypov indolových alkaloidov .....	19
Obrázok 11 Tetracyklická štruktúra námeľových alkaloidov .....	22
Obrázok 12 <i>Geissospermum vellosii</i> Allemäo .....	25
Obrázok 13 Štruktúry alkaloidov osiahnutých v <i>G. vellosii</i> .....	27
Obrázok 14 Súhrnné TLC alkaloidného extraktu <i>Geissospermum vellosii</i> zo spojených jednotlivých frakcií stĺpcovej chromatografie detegované Dragendorffovým činidlom .....	44
Obrázok 15 Normacusin B .....	46
Tabuľka 1 Podmienky stĺpcovej chromatografie .....	39
Tabuľka 2 Stĺpcová chromatografia spojená do jednotlivých podfrakcií .....	43



## ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK

A $\beta$	$\beta$ -amyloid
AD	Alzheimerova choroba
ACh	acetylcholín
AChE	acetylcholínesteráza
AKT	serín-treonínkináza
BHP	benígna hyperplázia prostaty
BuChE	butyrylcholínesteráza
CRPC	kastračne rezistentný karcinóm prostaty
DHT	dihydrotestosterón
DMAPP	dimetylallylpyrofosfát
DMSO	dimetylsulfoxid
DTNB	5,5'-dithiobis-2-benzoová kyselina
GALAE	ekvivalent galantamínu
GC-MS	plynová chromatografia-hmotnostná spektrometria
GSK-3 $\beta$	glykogénsyntáza kináza 3 $\beta$
NF- $\kappa$ B	nukleárny faktor kappa B
MRI	magnetická rezonancia
NMR	nukleárna magnetická rezonancia
NMDA	<i>N</i> -methyl-D-aspartát
TLC	tenkovrstvá chromatografia

## 1 ÚVOD

Prírodné liečivé prostriedky, hlavne liečivé rastliny, boli dlho jediným zdrojom liečiv pre ľudí a základom surovín na výrobu liekov. V dávnych dobách si lekári pripravovali sami lieky, za použitia surovín, ktoré získali od predavačov liečivých rastlín a bylinkárov. Rastlinné suroviny slúžia na izolovanie účinných látok a výrobu ďalších liečebných prostriedkov. Ľudové lekárstvo a bylinkárstvo dodnes udržiava liečebnú tradíciu, ktorá siaha až do začiatkov ľudstva. Pacienti sa opäť vracajú k možnosti rastlinnej terapie pri rôznych ťažkostiach a chorobách. Veľké množstvo liekov sa aj dnes vyrába vo farmaceutickom priemysle z rastlín a rastlinných prekurzorov. Rastlinné drogy však nie sú vždy vhodné na liečbu, či samoliečbu chorôb. Nesprávnym a nadmerným použitím môžu vykazovať potencionálne riziko poškodenia zdravia. No v mnohých prípadoch pomáhajú chorým navrátiť zdravie, pričom načierajú do najväčšej lekárne, do samotnej prírody. <sup>1</sup>

Liečivé rastliny, ktoré sa ďalej technologicky upravujú, obsahujú celú paletu látok, z ktorých väčšina pôsobí priaznivo na ľudský organizmus. Farmakognozia je veda zaoberajúca sa rastlinnými drogami a ich obsahom, ktorá úzko súvisí s farmakológiou, vedou skúmajúcou účinky liečivých prostriedkov na ľudský organizmus. Účinné látky obsiahnuté v liečivých rastlinách sa rozdeľujú na dva typy. A to na produkty primárneho metabolizmu, ktoré sú potrebné pre život rastliny. Druhý typ predstavujú látky sekundárneho metabolizmu, ktoré môžu mať široké uplatnenie ako fytoterapeutiká. Medzi tieto produkty môžeme zaradiť: alkaloidy, glykozidy, saponíny, triesloviny a mnoho ďalších. <sup>1</sup>

Ďalej môžeme rozdeliť liečivé rastliny podľa ich účinku na ľudský organizmus. Podľa farmakologického účinku sa drogy rozdeľujú do skupín, ktoré určujú okruh ich použitia. Účinok drogy nie je vždy jednoznačný, jedna droga môže byť použitá proti viacerým chorobám, kvôli bohatému obsahu účinných látok. Liečivé prostriedky sú pripravované v rôznych formách z farmaceutických surovín, z rastlinných drog a chemikálií. Jednou z týchto foriem môže byť príprava rastlinného extraktu. Extrakcia, je postup, pri ktorom sú účinné látky z drogy pod vplyvom rozpúšťadla, vylúhované do roztoku. Výluh z rastliny môže byť ovplyvnený teplotou, dobou extrakcie ale aj druhom rozpúšťadla, na konci môže byť daný extrakt zahustený. Takto

bol pripravený aj extrakt z rastliny *Geissospermum vellosii* Alemão, ktorý bol ďalej využitý na izoláciu alkaloidov obsiahnutých v tejto rastline a štúdium ich biologickej aktivity, čo je vlastne hlavnou témou tejto diplomovej práce. <sup>2</sup>

*Geissospermum vellosii* Alemão sa vyznačuje bohatým obsahom indolových alkaloidov, ktoré sú obsiahnuté v kôre kmeňa stromu rastúceho v amazonských pralesoch v severnej južnej Amerike od Guyany až po Brazíliu. <sup>2</sup> Domorodci z amazonského regiónu často používali kôru a listy druhov *Geissospermum* na početné liečebné účely. Existuje niekoľko dôkazov, ktoré dokazujú, že druhy *Geissospermum* vykazujú antimalarické, antibakteriálne, anticholinesterázové, protinádorové a antinociceptívne účinky.<sup>3</sup> Vďaka svojim vlastnostiam bola táto rastlina uvedená ako jeden z desiatich najužitočnejších liečivých brazílskych stromov. <sup>2</sup>

Práve izolácia obsahových látok z *G. vellosii*, hlavne indolových alkaloidov prispela k výskumu a potvrdeniu účinnosti extraktu, ktorý bol používaný na jednotlivé ochorenia už od dávnych dôb. Štúdie, podieľajúce sa na výskume tejto rastliny odhalili, že napríklad geissospermín, ktorý sa pokladá za jej hlavný indolový alkaloid sa vyznačuje anticholinesterázovou aktivitou, ktorá by mohla byť potenciou liečbou kognitívnych porúch pri Alzheimerovej chorobe (AD). <sup>4</sup> Ďalší účinok, ktorý bol preskúmaný je protinádorový. Zistilo sa, že práve flavopereirín, izolovaný z *G. vellosii*, selektívne inhibuje syntézu DNA v rakovinových bunkách a tak pôsobí cytotoxicky na rakovinu prostaty a aj kolorektálny karcinóm. <sup>5</sup> Kôra kmeňa *G. vellosii* sa už tradične používala na liečbu malárie pôvodnou populáciou v severnej Južnej Amerike, no neboli preskúmané látky, ktoré sú za tento účinok zodpovedné. Jedna z ďalších štúdií poskytuje dôkazy na podporu používania *G. vellosii* ako antimalarického agensu a že geissolosimín je vedúcou molekulárnou štruktúrou pre možný vývoj antimalarík. <sup>2</sup>

Kvôli svojim vlastnostiam je táto rastlina predmetom rozsiahleho výskumu už od roku 1838 a to z hľadiska chemického aj farmakologického. <sup>4</sup> Aj na základe toho bola rastlina *G. vellosii* zvolená ako hlavný predmet skúmania v tejto práci.

## 2 CIEĽ PRÁCE

1. Spracovanie rastlinného materiálu a príprava etherového a chloroformového alkaloidného výtrepku.
2. Stĺpcová chromatografia etherového výtrepku.
3. Izolácia alkaloidov z podfrakcie GV-11 etherového výtrepku, získaného po spracovaní kôry z rastliny *Geissospermum vellosii* Alemão.
4. Získanie aspoň jedného sekundárneho metabolitu alkaloidnej povahy ako čistú látku a v dostatočnom množstve za použitia tenkovrstvej preparatívnej chromatografie a rekryštalizácie.
5. Podieľanie sa na identifikácii a určení štruktúry izolovaných látok za použitia spektrálnych a fyzikálne-chemických metód (GC/MS, NMR, optická otáčavosť)
6. Stanovenie biologickej aktivity u izolovaných látok a vyhodnotenie výsledkov.
7. Teoretické spracovanie témy so zameraním na farmaceuticky významné rastliny z čeľade Apocynaceae a rastliny obsahujúce indolové alkaloidy.

## 3 TEORETICKÁ ČASŤ

### 3.1. Čeľad' Apocynaceae

Čeľad' Apocynaceae je jednou z najväčších a najvýznamnejších čeľadí. Skladá sa z 424 rodov s viac ako 4600 druhmi, ktoré sú rozdelené v piatich podčeľadiach: Rauvolfioideae, Apocynoideae, Periplocoideae, Secamonoideae a Asclepiadoideae. <sup>6</sup> Patrí medzi krytosemenné, dvojkľúčolistové rastliny, ktoré sú trvalé byliny obsahujúce mliečny latex, polokry, malé kry, v trópoch prevažne liany, kry alebo stromy s jednoduchými, celokrajnými, kožovitými listami ktoré, sú najčastejšie postavené protistojne v praslenoch alebo striedavo. <sup>7</sup> Výskyt tejto čeľade je najčastejší v trópoch a subtrópoch. Pôvodom sú rastliny tejto čeľade z Indie, Pakistanu, Číny, Bangladéšu a zo Srí Lanky. Plodom môže byť mechúrik, tobolka, bobuľa alebo kôstkovica. <sup>7</sup>

Členovia čeľade Apocynaceae sú bohatí na obsahové látky ako sú alkaloidy, steroidy, terpenoidy, flavonoidy, glykozidy, fenoly, laktóny uhľovodíky, <sup>6</sup> ale z týchto obsahových látok majú najväčší význam kardioaktívne glykozidy, indolové alkaloidy, sekoiridoidné a iridoidné monoterpény a taktiež kaučuky (polyterpény), ktoré sú rozptýlené v latexe. <sup>7</sup>

#### 3.1.1 Farmaceuticky významné drogy čeľade Apocynaceae

Čeľad' Apocynaceae je jednou z najrozmanitejších čeľadí v rastlinnej ríši. Je významnou pre bohatý obsah látok, pôsobiacich terapeuticky na ľudský organizmus. Rastliny tejto čeľade našli uplatnenie nie len v tradičnej, ale aj v konvenčnej medicíne. Na liečbu gastrointestinálnych ochorení, horúčky, malárie, bolesti, cukrovky a taktiež kožných a ektoparazitických ochorení sa v tradičnej medicíne využívajú dodnes. Liečivé vlastnosti týchto rastlín sa pripisujú hlavne prítomným indolovým, steroidným alkaloidom a kardioaktívnym glykozidom. <sup>8</sup>

Medzi medicínálne dôležité rastliny z tejto čeľade patria hlavne *Carissa carandas*, *Catharanthus roseus*, pochádzajúci z Madagaskaru, teraz už rozšírený do celého sveta, *Nerium oleander* často sa vyskytujúci v našich záhradách ako okrasný strom, *Holarrhena antidysenterica*, *Plumeria alba*, *Tabernaemontana divaricata*, *Ichnocarpus frutescens*, <sup>8</sup> *Thevetia peruviana* často známa ako žltý oleander, *Alstonia*

*scholaris*, *Strophantus gratus*, *Rauwolfia serpentina* a *Vinca minor*.<sup>6</sup> Niektoré z týchto rastlín, sú opísané v nasledujúcom texte.

### **3.1.1.1 *Catharanthus roseus***

Významnou rastlinou z čeľade Apocynaceae je *Catharanthus roseus* (viď. Obrázok 1) v preklade Zimozeleň ružová, tiež známa ako brčál alebo Madagaskarský brčál. Je vždy zelená, trvalá bylina, rastúca v tropickom a subtropickom pásme. Pôvodom je z Indie a Madagaskaru ale v súčasnosti je distribuovaná do celého sveta.<sup>9</sup>

Rastlina je farmaceuticky významná kvôli obsahu dimérnych cytotoxických alkaloidov ako sú vinkristín a vinblastín. Okrem alkaloidov sa v rôznych častiach rastliny potvrdila prítomnosť aj ďalších obsahových látok ako sú fenoly, polyfenoly, flavonoidné glykozidy, antokyány, steroidy a iridoidné glykozidy.<sup>10</sup> Vo všetkých častiach rastliny boli nájdené alkaloidy s indolovým zvyškom. Približne 130 indolových alkaloidov bolo extrahovaných z tejto rastliny, avšak len 5 z nich sa využíva. Medzi ne patrí vinkristín, vinblastín, 3', 4'-anhydrovinblastín, serpentín a ajmalicín.<sup>11</sup> Vinka alkaloidy, vinkristín a vinblastín sa najčastejšie používajú v režimoch chemoterapie na liečbu nádorov ako napríklad Hodgkinov lymfóm a na liečbu leukémie.<sup>10</sup>

Tieto protirakovinové alkaloidy inhibujú proliferáciu buniek väzbou na mikrotubuly, následne blokujú mitózu a tak vedú k apoptóze buniek. Lesklé zelené listy rastliny *Catharanthus roseus* sú jediným známym zdrojom látok vinkristínu a vinblastínu. Tie sa vyskytujú v listoch len v extrémne nízkych výťažkoch. Pričom odhadovaný ročný dopyt je približne 3kg, čo predstavuje spracovanie 300 ton sušených listov *Catharanthus roseus*.<sup>12</sup>



### 3.1.1.3 *Alstonia scholaris*

*Alstonia scholaris* (viď obrázok 3) patrí do rodu *Alstonia* a čeľade Apocynaceae. Ako vždy zelený strom sa najčastejšie vyskytuje v tropických oblastiach Afriky a Ázie. Sušené listy a kôra z tohto stromu sa používajú v ľudovej medicíne na liečbu kašľu, astmy, chronickej bronchitídy a iných infekcií dýchacích ciest.<sup>17</sup>

Fytochemické štúdie ukázali, že *Alstonia scholaris* je rastlina bohatá na monoterpenoidné indolové alkaloidy, ako sú alistonitrín A, scholarizín A, alstoscholarín, scholarizín P, 19-epischolarizín, vallesamín a picrinín. Bolo zistené, že indolové alkaloidy z tejto rastliny pôsobia antitusickým, antiastmatickým, expektoračným, antialergickým, protizápalovým, antineoplastickým, antibakteriálnym a analgetickým účinkom.<sup>17 18</sup> Tieto účinky sú spôsobené inhibičnou aktivitou zlúčenín z tejto rastliny na NF- $\kappa$ B. Je známe, že NF- $\kappa$ B je dôležitý prozápalový transkripčný faktor, ktorý hrá kľúčovú úlohu v mechanizme bunkovej signalizácie na zápal vyvolané oxidačným stresom a imunitne. Štúdie hovoria, že tri hlavné alkaloidy picrinín, vallesamín a scholarizín rastliny *Alstonia scholaris* vyvolávali periférne protizápalové a analgetické účinky *in vivo*.<sup>18</sup>

Navyše niektoré alkaloidy izolované z listu *Alstonia scholaris* vykazovali inhibičnú aktivitu na mediatory zápalu cyklooxygenázu 1 a 2 a 5-lipooxygenázu protizápalovým testom *in vitro*. Zápalové procesy v tele sú sprevádzané zvýšenou produkciou prostaglandínov a leukotrienov z kyseliny arachidónovej. Cyklooxygenáza 1 a 2 sú zodpovedné za produkciu prostaglandínov a lipooxygenáza za tvorbu leukotrienov, čiže zablokovaním týchto mediátorov zápalu alkaloidmi rastliny *Alstonia scholaris* dochádza k protizápalovému účinku.<sup>19</sup>



Obrázok 3 *Alstonia scholaris*<sup>20</sup>



### **3.1.1.4 *Tabernaemontana divaricata***

Ďalšou významnou rastlinou čeľade Apocynaceae a rodu *Tabernaemontana* je *Tabernaemontana divaricata*. (viď. obrázok 4) Rozšírená hlavne v tropických a subtropických oblastiach Ázie, Afriky a Ameriky. Patrí medzi vždyzelené kry rastúce nadvoko alebo ako okrasné rastliny. <sup>22</sup>

Významná je práve pre obsah monoterpenoidných indolových alkaloidov ako napríklad, tabercorymín A, ervachín C a kofylín, u ktorých bola preukázaná významná protinádorová aktivita. <sup>21</sup> Ďalšie účinky boli preukázané pôsobením extraktu z rôznych častí *Tabernaemontana divaricata* (kvetov, listov, stoniek, koreňov), ktorý pôsobil antikonvulzívne, protizápalovo, antidiabeticky a cytotoxicky. <sup>22</sup>

*In vitro* štúdia ukázala, že extrakt z koreňov a stoniek *Tabernaemontana divaricata* pôsobí inhibične na acetylcholinesterázu (AChE). Následne sa skúmali obsahové látky koreňa tejto rastliny, ktoré by mohli byť zodpovedné za inhibičný účinok na AChE. Tento inhibičný účinok bol pripísaný dvom indolovým alkaloidom 19,20-dihydrotabernamínu a 19,20-dihydroervaanínu A, ktoré dokonca boli silnejšími inhibítormi AChE ako galantamín, ktorý sa používa na liečbu AD. Okrem toho bol odhalený neuroprotektívny účinok extraktu na kognitívne deficity vyvolané Ap25–35 peptidmi. Tieto peptidy Ap25–35 zvyšujú hladinu AChE v mozgovej kôre a hipokampu, čo pravdepodobne vedie k konštantnému nedostatku acetylcholínu (ACh), čím je spôsobená strata pamäte. Subchronická predliečba extraktom z *Tabernaemontana divaricata* alebo galantamínom by však mohla zvrátiť tieto účinky a to inhibíciou AChE, čoho výsledkom je zvýšená hladina ACh v neuronálnej synaptickej štrbine a zlepšenie behaviorálnych deficitov vyvolaných peptidmi Ap25-35. Preto vznikla myšlienka potencionálneho použitia rastliny *Tabernaemontana divaricata* na liečbu demencie u pacientov trpiacich na AD alebo ako doplnok stravy na podporu pamäte u bežných ľudí. Je však potrebný ďalší výskum s cieľom preskúmať možné zapojenie ďalších mechanizmov zodpovedných za vlastnosti *Tabernaemontana divaricata* zlepšujúce pamäť. <sup>23</sup>



Obrázok 4 *Tabernaemontana divaricata* <sup>24</sup>



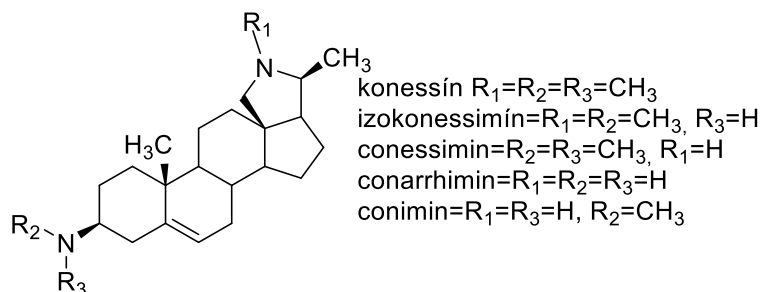
Obrázok 5 *Holarrhena antidysenterica* <sup>25</sup>

### **3.1.1.5 *Holarrhena antidysenterica***

*Holarrhena antidysenterica* (viď. obrázok 5), taktiež rastlina patriaca do čeľade Apocynaceae je typickou indickou liečivou rastlinou. Kôra a semená sa používajú na liečbu amébovej úplavice, hnačky, astmy, bronchopneumónie a malárie. Uvádza sa, že rastlina má anthelmintické, cholagogické, analgetické, antidiarhoické a adstringentné vlastnosti. Tieto vlastnosti sú spôsobené prítomnosťou steroidných alkaloidov konaínového a aminopregnánového typu, pričom hlavným alkaloidom je konessín. <sup>26</sup>

Štúdie taktiež potvrdili inhibičnú aktivitu extraktu zo semien *Holarrhena antidysenterica* na AChE. Konessín, izokonessimín, conessimín, conarrhimín a conimín sú steroidné alkaloidy izolované zo semien *Holarrhena antidysenterica*, u ktorých bola preukázaná silná inhibičná AChE aktivita. Celkový alkaloidný extrakt zo semien *Holarrhena antidysenterica* inhiboval AChE s hodnotou  $IC_{50}$  6,1 ng/ml, pričom jednotlivé izolované alkaloidy s výnimkou izokonessimínu vykazovali silnú inhibičnú aktivitu voči AChE s  $IC_{50}$  hodnotami v rozmedzí od 4 do 28  $\mu$ M. Najaktívnejším inhibítorom je conessimin s  $IC_{50}=4 \mu$ M, ktorý pôsobí reverzibilne a nekompetitívne. Zistilo sa, že inhibičná aktivita AChE je významne ovplyvnená prítomnosťou a polohou metylových skupín na N-atómoch. Odstránenie N-metylovej skupiny na pyrolidíne viedlo k významnému zvýšeniu aktivity a naopak štiepenie jednej alebo dvoch N-metylových skupín v polohe C-3 viedlo k zníženiu inhibičnej účinnosti, preto N, N-dimetyl skupina na C-3 a nesubstituovaná NH skupina na pyrolidíne sú dôležité

skupiny na zvýšenie inhibície AChE. Tieto zistenia naznačujú, že steroidný skelet môže mať dobrú afinitu k molekule AChE, čo predstavuje potenciál pre vývoj nových liekov na liečbu AD a to modifikáciou a transformáciou týchto steroidných alkaloidov. <sup>26</sup>



Obrázok 6 Štruktúra alkaloidov rastliny *H. antidysenterica*<sup>26</sup>

### 3.1.1.6 *Nerium oleander*

*Nerium oleander* (viď obrázok 7) nazývaný tiež Ružový oleander, je stredomorský vždyzelený ker s dlhými, kopijovitými, kožovitými listami a bielymi alebo ružovými kvetmi v zhlukoch. Je jediným zástupcom z rodu *Nerium* patriaci do čeľade Apocynaceae <sup>27</sup>

Zatiaľ čo v našich záhradách je táto rastlina okrasným krom, v tradičnej indickej medicíne sa používajú listy a korene tejto rastliny na liečbu ochorení kože, diabetu a reumatickej bolesti. <sup>28</sup> Okrem toho štúdie preukázali, že niektoré ľudové liečivé prípravky z kvetov oleandra vykazujú rôzne aktivity, ako sú cytotoxické, protizápalové, analgetické, antioxidačné, kardioprotektívne, hepatoprotektívne a neuroprotektívne. <sup>29</sup> Všetky časti rastliny sú toxické, hlavne listy, stonky, semená a koreň. Toxicky pôsobiace sú kardioaktívne glykozidy obsiahnuté v tejto rastline, ktorými sú oleandrín, neriin, folinerin, rosagenin a digitoxigenin. Sú to látky podobne pôsobiace ako digoxín, spôsobujú inhibíciu sodno-draselnej pumpy ( Na-K-ATPázy). Konzumácia 15 g koreňa alebo 5-15 listov môže byť fatálna. <sup>28</sup>

Okrem kardioaktívnych glykozidov sa taktiež preukázala prítomnosť triterpénov, steroidov, pregnanov a flavonoidov, ktoré predstavujú sekundárne metabolity z rôznych orgánov *Nerium oleander*. Čím ďalej, tým viac sa preukazuje účinnosť *Nerium oleander* v liečbe AD. Bolo zistené, že metanolový extrakt z kvetov rastliny zvracia demenciu vyvolanú meďou a hliníkom u potkanov a polysacharidy z

kvetov majú neuroprotektívne účinky v primárnych potkaních kortikálnych, neuronálnych kultúrach proti sérovej deprivácii a  $\beta$ -amyloidnej toxicite.<sup>30</sup>

V štúdiu, ktorá porovnávala inhibičnú aktivitu extraktov na AChE z *Nerium oleander*, za použitia rôznych rozpúšťadiel ako boli napríklad etanol, etylacetát, n-hexán a dichlormetán, mal najvyššiu AChE inhibičnú aktivitu extrakt pripravený z etylacetátu. Jej hodnota bola ( $0,93 \pm 0,01$  mg GALAE / g extraktu). Inhibičná aktivita AChE bola vyjadrená ako miligram ekvivalentu galantamínu na gram extraktu (mg GALAE / g extraktu).<sup>32</sup> Z toho dôvodu sú čím ďalej, tým viac predmetom výskumu rastliny, ktoré pôsobia ako inhibítory AChE a tým sa zaradzujú medzi rastliny potencionálne pôsobiace na liečbu AD.

### **3.1.1.7 *Thevetia peruviana***

*Thevetia peruviana* (viď obrázok 7), tiež známa pod názvom žltý oleander je okrasný, vždy zelený ker alebo strom patriaci do čeľade Apocynaceae, bežne rastúci v tropických a subtropických oblastiach.<sup>32</sup> Listy tejto rastliny sú tmavo zelené, lesklé a lineárne. Už podľa názvu je zrejmé, že kvety sú žltej farby, sú umiestnené v zhlukoch na špičkách vetvičiek.<sup>33</sup>

*Thevetia peruviana* je dobre známa pre jej toxické účinky. Vo všetkých častiach rastliny sa nachádzajú kardioaktívne glykozidy, ktoré sú zodpovedné za tento toxický účinok. Najvyššia koncentrácia kardioaktívnych glykozidov sa nachádza v jadre semien.<sup>33</sup> Preto po požití semien alebo iných častí rastliny môže dôjsť k intoxikácii. Okrem toxicity majú kardioaktívne glykozidy aj farmakologický význam, používajú sa na liečbu srdcovej nedostatočnosti. Terapeutický index kardioaktívnych glykozidov sa blíži toxickej dávke, preto musí byť kontrolovaná ich hladina v krvi, taktiež veľkú rolu zohráva aj individuálna senzitivita pacienta. Semená *Thevetia peruviana* obsahujú zmes niekoľkých kardioaktívnych glykozidov. Medzi primárne thevetiové glykozidy patrí thevetín A, thevetín B a aj acetylthevetín A a B a medzi sekundárne patria neriifolín, peruvosid a cerberín.<sup>34</sup> Štúdie hovoria o ďalších možných terapeutických účinkoch žltého oleandru ako napríklad antimikrobiálny, antiparazitický a taktiež o protirakovinovej aktivite. Pre potvrdenie tejto protinádorovej aktivity boli prevedené cytotoxické testy s použitím nádorových bunkových línií HL-60 (bunky akútnej promyelocytovej leukémie), HepG2 (ľudskej bunky hepatocelulárneho karcinómu),

PC-12 (bunky myšieho feochromocytómu), ktoré boli ošetrované rôznymi koncentraciami pripraveného metanolového extraktu z *Thevetia peruviana*. Potvrdilo sa, že prítomné kardioaktívne glykozidy v pripravenom extrakte pôsobili na tieto tri línie nádorových buniek, pričom u typu HL-60, bola účinnosť závislá na dávke a v prípade HEP-G2 a PC-12 nebola pozorovaná korelácia závislosti od dávky. Test cytotoxicity preukázal inhibíciu replikácie buniek a preto *Thevetia peruviana* obsahuje látky, ktoré sa môžu použiť na boj proti rakovine. <sup>35</sup>



Obrázok 7 *Nerium oleander* <sup>36</sup>



Obrázok 8 *Thevetia peruviana* <sup>37</sup>

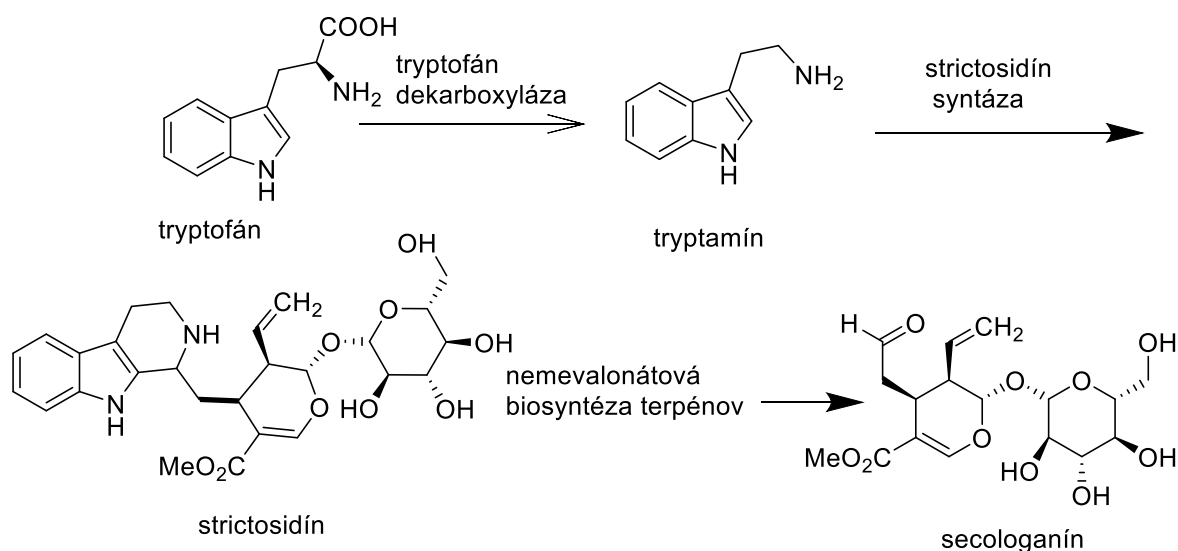
### 3.2. Indolové alkaloidy

Indolové alkaloidy sú významné pre ich širokospektrálnu biologickú aktivitu. Pôsobia protinádorovo, antimalaricky, antimikróbne, antihypertenzívne a taktiež stimulujú centrálny nervový systém. Už z názvu je zrejmé, že indol je hlavnou chemickou štruktúrou týchto alkaloidov.

Najčastejšie sa vyskytujú v rastlinách čeľade Apocynaceae, Rubiaceae, Loganiaceae a Nyssaceae. Ide o rozmanitú a najpočetnejšiu skupinu alkaloidov, z ktorej bolo izolovaných približne 2000 zlúčenín. <sup>38</sup>

#### 3.2.1 Biosyntéza indolových alkaloidov

Chemická štruktúra indolových alkaloidov je odvodená od aminokyseliny tryptofánu, jej dekarboxylačného produktu tryptamínu a iridoidného terpénového secologanínu. Enzým tryptofán dekarboxyláza je zodpovedný za prevod tryptofánu na tryptamín. <sup>39</sup>



Obrázok 9 Prvé kroky biosyntézy indolových alkaloidov <sup>39</sup>

Tryptamín a secologanín sú dôležitými prvkami v prvom záväznom kroku biosyntézy indolových alkaloidov. V tomto kroku dochádza k stereoselektívnej kondenzácii medzi tryptamínom a secologanínom za vzniku strictosidínu, táto kondenzácia je katalyzovaná enzýmom strictosidín syntázou. Enzým zodpovedný za túto dôležitú reakciu, strictosidín syntáza, bol izolovaný a z neho boli charakterizované bunkové kultúry mnohých druhov, vrátane *Rauwolfia serpentina*, *Cinchona robusta* a *Catharanthus roseus* a množstvo ďalších izoforiem. <sup>40</sup>

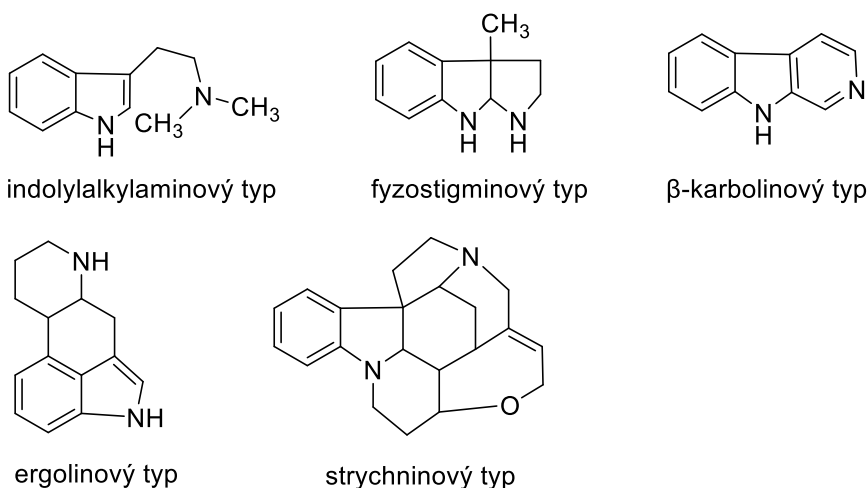
Každá skupina rastlín z čeľadí Apocynaceae, Loganiaceae a Rubiaceae produkuje indolové alkaloidy s výrazne odlišnými štruktúrami. Majú bicyklickú štruktúru pozostávajúcu z benzénového kruhu kondenzovaného k päťčlennému pyrrolovému kruhu obsahujúcemu dusík. Tento pyrrolový kruh s atómom dusíka vedie k základným vlastnostiam indolových alkaloidov, vďaka ktorým sú obzvlášť farmakologicky aktívne. <sup>40</sup> Tieto alkaloidy sú klasifikované podľa svojej biogénnej dráhy do troch hlavných skupín, corynanthe, aspidosperma a iboga. Rozdiel medzi týmito molekulami je prítomnosť karbonylových, metoxylových a hydroxylových skupín v rôznych polohách. Preto prestavby bočného skeletu vytvorili veľkú štruktúrnu rozmanitosť indolových alkaloidov, ktoré podporujú rôzne biologické aktivity. <sup>41</sup> Taktiež je známe, že zložitejšie indolové alkaloidy obsahujú časť molekuly, ktorá nie je odvodená od tryptofánu, ale od kyseliny mevalonovej. U námeľových

alkaloidov tvorí túto časť C5-izopentenylová jednotka a u indolových alkaloidov čeľade Apocynaceae, Rubiace a Loganiaceae je to jednotka C10-geraniol. <sup>42</sup>

### 3.2.2 Základné podtypy indolových alkaloidov

Indolové alkaloidy sa ďalej rozdeľujú na jednotlivé podtypy:

1. Indolové alkaloidy typu indolalkylamínu
2. Indolové alkaloidy typu fyzostigmínu
3. Indolové alkaloidy karbolínového typu
4. Indolové alkaloidy ergolínového typu
5. Indolové alkaloidy typu strychnínu <sup>43</sup>



Obrázok 10 Štruktúra základných podtypov indolových alkaloidov <sup>43</sup>

#### 3.2.2.1 Indolové alkaloidy indolalkylamínového typu

Indolové alkaloidy tohoto typu patria medzi deriváty 5-hydroxyindolu, medzi ktoré sa radia gramín, psilocybín, psilocín a bufotenin. Gramín je alkaloid nachádzajúci sa v trávach, hlavne v jačmeni (*Hordeum vulgare*), ktorý zohráva významnú úlohu v alopatickom potenciáli jačmeňa a jeho obrane proti burinám, hmyzu alebo patogénom. <sup>44</sup> Bufotenín je alkaloid nachádzajúci sa v kožnom sekréte ropuchy. <sup>45</sup> Psilocín a jeho fosforyloxyderivát psilocybín sú indolové alkaloidy, ktoré sa prirodzene vyskytujú v halucinogénnych hubách patriacich do rodu *Psilocybe*. Psilocybín, podobne ako iné halucinogénne látky, je agonista serotonínového receptora 2A (5-

HT<sub>2A</sub>). Alkaloidy tohto typu pôsobia halucinogénnymi účinkami, práve kvôli týmto účinkom im v minulosti nebola venovaná až taká pozornosť, no opäť sa dostávajú do popredia pri skúmaní farmaceuticky významných rastlín. <sup>46</sup>

### **3.2.2.2 Indolové alkaloidy fyzostigminového typu**

Hlavným alkaloidom tejto skupiny je fyzostigmín, jeho štruktúra je odvodená od tryptofánu. Vedľajšími alkaloidmi sú eserín, eseramín, izofyzostigmín, fyzín, génerín, N-8-norfyzostigmín, kalamatín a kalabacín. Sú to látky nachádzajúce sa rastline *Physostigma venenosum*. Je to liana udomácnená v tropickej západnej Afrike patriaca do čeľade Fabaceae. Pre túto rastlinu sú typické papilárne kvety, plodom je asi 15cm dlhý drevnatý lusk, v ktorom sú približne 1-3 semená. <sup>42</sup>

Physostigmatis semen, tiež známe pod názvom Calabar semen, v preklade Kalabarské semeno je hlavnou časťou rastliny s najväčším obsahom indolových alkaloidov fyzostigminového typu. Fyzostigmín, najcennejší alkaloid semena Calabar, je vysoko nestabilný, po vystavení na svetlo, vzduch a hlavne teplo oxiduje na červenú zlúčeninu, rubreserín. Pôsobí ako silný inhibítor AChE ( $IC_{50}=0,15 \mu M$ ), ktorý účinne zvyšuje koncentráciu ACh v miestach cholínergického prenosu, teda účinkuje ako parasymptomimetikum. Tento alkaloid sa používa v oftalmológii ako silné miotikum na zníženie vnútroočného tlaku a tým na liečbu glaukómu a na liečbu myasténie gravis. <sup>47</sup>

### **3.2.2.3 Indolové alkaloidy karbolínového typu**

Rastliny *Peganum harmala* (Harmala stepná) a *Passiflora incarnata* (Mučenka opletavá) sú bohaté na obsah indolových alkaloidov s jednoduchou štruktúrou karbolínových bází.

Medzi tieto alkaloidy patria harmín, harmalín, harman, harmol a harmalol. O väčšine karbolínových alkaloidov je známe, že sú silnými inhibítormi monoaminoxidázy, ktorá metabolizuje katecholamínové neurotransmitery. Harmín pôsobí priaznivo na ochorenie extrapyramidového systému a na liečbu amoebovej dyzentérie. <sup>48</sup>



*Peganum harmala*, rastlina patriaca do čeľade Zygophyllaceae, je vytrvalá bylina rastúca vo vyprahnutých oblastiach Číny, USA, Indie, Afriky a Iránu. Práve semená tejto rastliny sú bohaté na už vyššie spomínané karbolínové alkaloidy. Štúdie hovoria o ich ďalších možných farmakologických využitíach a to, že tieto alkaloidy vykazujú významné cytotoxické účinky proti niekoľkým nádorovým bunkovým líniam a taktiež, že vykazujú potenciálne výhody pri liečbe mozgových porúch vrátane depresie a AD.<sup>49</sup>

Ďalšou rastlinou, ktorej sa pripisuje význam práve kvôli obsahu karbolínových alkaloidov je *Passiflora incarnata*, zaradená do čeľade Passifloraceae a rastúca hlavne v tropických a subtropických oblastiach Južnej Ameriky. Alkaloidy tohto typu sa najviac vyskytujú v nadzemnej časti rastliny a to hlavne vo vňati. Rastlina sa používa ako sedatívum a na liečbu rôznych psychických porúch ako je anxieta, nervozita, neuralgia.<sup>50</sup> Niekoľko štúdií naznačilo, že *Passiflora incarnata* má farmakologický profil podobný benzodiazepínom a jej pôsobenie je prostredníctvom receptorov kyseliny gama-aminomaslovej. Štruktúra benzodiazepínových liečiv pozostáva z benzénového kruhu kondenzovaného k diazepínovému systému, ktorý obsahuje sedemčlennú heterocyklickú skupinu s dvoma atómami dusíka v polohách 1. a 2. kruhu. Indolové alkaloidy izolované z *Passiflora incarnata*, konkrétne harmán, harmol, harmín, harmalol a harmalín, pozostávajú z benzénového kruhu kondenzovaného k päťčlennému heterocyklu obsahujúcemu jeden atóm dusíka.<sup>40</sup>

Medzi indolové alkaloidy karbolínového typu môžeme ďalej zaradiť aj alkaloidy skupiny yohimbínu, alstoninu a ajmalínu. Vznikajú spojením tryptamínu s monoterpenickými prekurzormi a tak je ich skelet rozšírený o ďalšie heterocykly. Rastliny *Rauwolfia serpentina* a *Pausinystalia yohimbe* sa vyznačujú obsahom alkaloidov tohto typu.

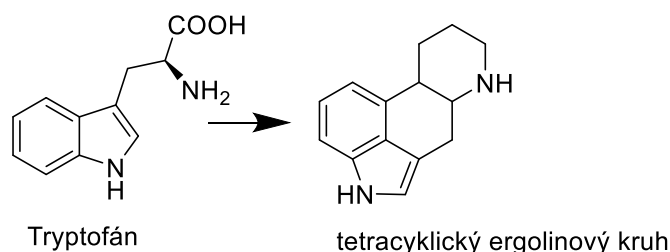
Rezerpín, ajmalicin, ajmalin, serpentín a yohimbin sú izolovanými alkaloidmi z koreňa rastliny *Rauwolfia serpentina*. Rezerpín je hlavnou účinnou látkou a používa sa na liečbu hypertenzie, schizofrénie a Parkinsonovej choroby.<sup>51</sup> Ajmalicin a ajmalín pôsobia taktiež antihypertenzívne. Ajmalín má okrem toho aj antiarytmický účinok. Antihistamínovou aktivitou sa vyznačuje serpentín, ktorý sa používa na liečbu po

poštípaní hadom. R. serpentína v preklade Rauwolfia hadovitá patrí do čeľade Apocynaceae. Je to malý krík rastúci v Indii, Pakistane, Barme a Thajsku. <sup>52</sup>

Na izoláciu yohimbínu sa používa kôra zo stromu *Pausinystalia yohimbe*, rastúceho v tropickej západnej Afrike a patriaceho do čeľade Rubiaceae. Yohimbín má potenciálne klinické využitie na liečbu erektilnej dysfunkcie a používa sa ako afrodisiakum v doplnkoch stravy. Okrem toho pôsobí hypotenzívne, teda znižuje krvný tlak a rozširuje periférne cievy. <sup>53</sup>

### 3.2.2.4 Indolové alkaloidy ergolínového typu

Ergolinové (námeľové) alkaloidy sú skupinou indolových derivátov produkovaných rodmi *Ascomycota* vrátane *Claviceps*, *Aspergillus*, *Penicillium* a *Epichloë*, ale hlavne druhom *Claviceps*. Tieto alkaloidy boli ako prvé izolované z námeľu, ktorý je sušeným skleróciom huby *Claviceps purpurea* (v preklade Kyjanička purpurová) patriacej do čeľade Clavicipitaceae. Kyjanička purpurová je parazitujúca vreckovýtrusná huba, ktorá napadá semenníky tráv, ale hlavne žita a pretvára ich v skleróciom (námeľ). <sup>54</sup> Všetky námeľové alkaloidy majú spoločnú tetracyklickú kruhovú štruktúru odvodenú od indolu (ergolín), pričom kruhy A a B sú z L-tryptofánu a kruhy C a D pochádzajú z cyklizácie dimetyllallylpyrofosfátu (DMAPP). <sup>55</sup>



Obrázok 11 Tetracyklická štruktúra námeľových alkaloidov <sup>56</sup>

Ergolinové alkaloidy sú 3,4-substituované indolové deriváty. Na základe substituentov pripojených k ergolinovému kruhu sa môžu rozdeliť do dvoch skupín: prvou skupinou sú amidové deriváty kyseliny D-lyzergovej, v ktorých amidovú skupinu môže byť primárny amid, jednoduchý alkylamid alebo malý peptid. Druhou skupinou sú farmakologicky nevyužívané klavínové alkaloidy, ktoré sú derivátmi 6,8-dimetylergolínu alebo tricyklickými prekurzormi. Farmakologicky významné

námeľové alkaloidy patria do prvej skupiny, kde karboxylová skupina kyseliny D-lyzergovej tvorí amid alebo peptidickú väzbu s aminoskupinou rôznych aminokyselín alebo s peptidickými zvyškami. Počas izolácie a taktiež pri skladovaní drogy, môže dochádzať k jej izomerizácii na deriváty kyseliny D-isolyzergovej, ktoré nie sú farmakologicky účinné.<sup>57</sup>

Ergoamidy a ergopeptíny sú amidy a peptidy kyseliny D-lyzergovej. Dôležitými ergoamidmi sú prirodzene sa vyskytujúci ergometrín a jeho semisyntetický derivát metylergometrín. V týchto štruktúrach je kyselina D-lyzergová amidovaná 2-aminopropanolom alebo 2-aminobutanolom. Ergometrín je uterotonikum, spôsobuje kontrakcie maternice a používa sa na zastavenie krvácania po pôrode.<sup>55</sup>

Ergopeptíny sú deriváty kyseliny lyzínovej s tripeptidovými skupinami naviazanými na svoju karboxylovú skupinu prostredníctvom peptidových amidových väzieb. Ergotamín je najdôležitejším ergopeptínom a hlavným námeľovým alkaloidom. Chemicky je to peptidový amid kyseliny D-glykolovej s peptidom odvodeným od aminokyselín L- alanínu, L- fenylalanínu a L- prolínu. Ergotamín a jeho semisyntetický derivát dihydroergotamín sú agonisti 5-HT receptora. Klinicky sa používajú na liečbu akútnych záchvatov migrény a bolesti hlavy.<sup>54 57</sup>

Ergolínové alkaloidy interagujú s rôznymi receptormi centrálného nervového systému. Ich účinky sú založené na podobnosti štruktúr námeľových alkaloidov s noradrenalínom, dopamínom a serotonínom (5-hydroxytryptamínom). Niektoré námeľové alkaloidy pôsobia ako agonisti, zatiaľ čo iné pôsobia ako antagonisti. Rozdiely vo fyzikálnych, fyziologických a farmakologických vlastnostiach námeľových alkaloidov sú spôsobené rôznymi substituentami pripojenými ku karboxylovej skupine kyseliny D-lyzergovej.<sup>54</sup>

Ďalšími alkaloidmi sú bromokriptín,  $\alpha$ -dihydroergokriptín, cabergolín, nicergolín a pergolín. Bromokriptín, pergolín a cabergolín sú agonistami dopamínu, okrem toho cabergolín inhibuje sekréciu prolaktínu v hypofýze. Bromokriptín sa používa na liečbu Parkinsonovej choroby a hyperprolaktinémie. Nicergolín pôsobí ako antagonista  $\alpha$ -1a adrenérgnych receptorov, jeho pozitívna účinnosť sa preukázala pri liečbe demencie a vaskulárnych porúch, ako aj mozgovej trombózy.  $\alpha$ -

Dihydroergocryptin je  $\alpha$ -adrenérgný antagonist a agonista dopamínu, jeho účinnosť sa preukázala v monoterapii v skorých štádiách Parkinsonovej choroby. <sup>55</sup>

### **3.2.2.5 Indolové alkaloidy strychnínového typu**

Strychnín a brucín sú hlavnými predstaviteľmi skupiny indolových alkaloidov strychnínového typu. Medzi menej významné patrí  $\alpha$ -kolubrín,  $\beta$ -kolubrín, icajín, 3-metoxycajín, protostrychnín, vomícín, novacín, N-oxystrychnín, pseudo-strychnín a izostrychnín. Sú to alkaloidy obsiahnuté v niektorých rastlinách rodu *Strychnos* patriace do čeľade Loganiaceae. Hlavným zástupcom je strom *Strychnos nux vomica* rastúci v juhovýchodnej Ázii, Srí Lanke, juhozápadnej Indii a severnej Austrálii. Plodom je bobuľa, v ktorej je uložených 3-5 semien, práve v týchto semenách sú najviac zastúpené indolové alkaloidy strychnínového typu. <sup>58</sup>

Strychnín je centrálné analeptikum s dlhodobým účinkom. V terapeutických dávkach zvyšuje tonus svalstva a má potencujúci účinok na dýchací systém a krvný obeh. Naopak toxická dávka spôsobuje kŕče svalstva. Rozpätie medzi terapeutickou a toxickou dávkou je však veľmi úzke, dávka v rozmedzí 30–90 mg môže byť už smrteľnou dávkou. Oproti tomu brucín má asi 50-krát slabší účinok. <sup>59</sup>

Moderné farmakologické štúdie preukázali, že sušené zrelé semená *Strychnos nux-vomica*, indukujú inhibíciu nádorov, pôsobia ako antidiabetikum, antiarytmikum a podieľajú sa na liečbe reumatoidnej artritídy a myasténie gravis. Avšak klinická aplikácia tejto rastliny je obmedzená, z dôvodu jej závažných už vyššie spomínaných toxických účinkov. <sup>60</sup>

### 3.3 *Geissospermum vellosii* Allemão

Hlavnou témou tejto práce je rastlina *Geissospermum vellosii*, patriaca do čeľade Apocynaceae. Taktiež známa pod názvom Pao pereira alebo ďalšími synonymami *Geissospermum laeve*, *Geissospermum martianum*, *Tabernaemontana laevis*.<sup>4</sup>

#### 3.3.1 Taxonomické zaradenie *Geissospermum vellosii* Allemão

Ríša: Plantae (Rastliny)

Podríša: Tracheobionta (Cievnaté rastliny)

Oddelenie: Magnoliophyta (Krytosemenné)

Trieda: Magnoliopsida (Dvojkličnolistové)

Podtrieda: Asterids

Rad: Gentianales (Horcotvaré)

Čeľaď: Apocynaceae (Zimozeleňovité)

Rod: *Geissospermum* Allem.

Druh: *Geissospermum vellosii* Allemão<sup>61</sup>



Obrázok 12 *Geissospermum vellosii* Allemão<sup>62</sup>

#### 3.3.2 Popis *Geissospermum vellosii* Allemão

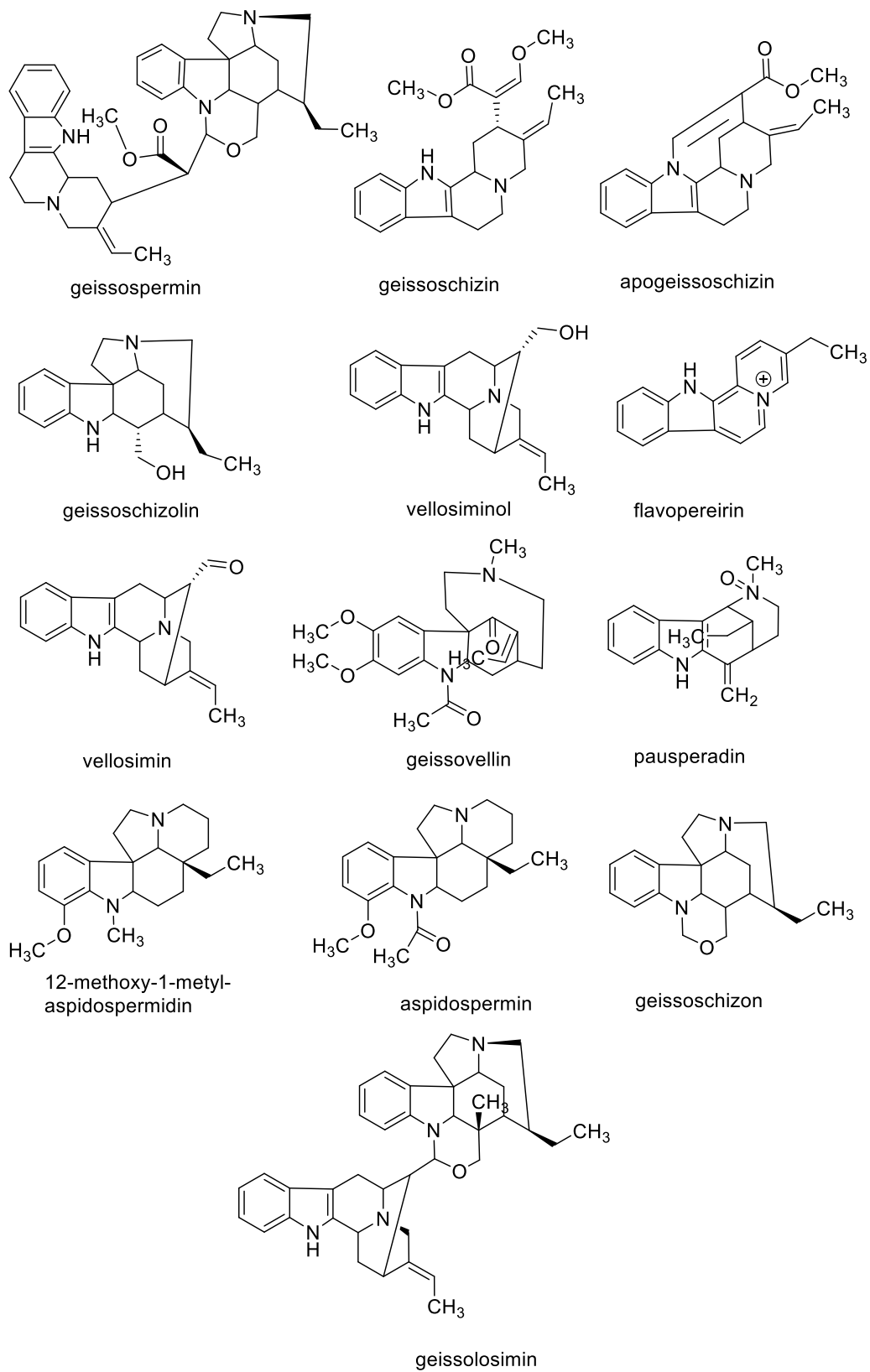
Je rastlinou pochádzajúcou z Brazílie, rastúcou v dažďových pralesoch a často používanou ako liek na horúčku juhoamerickými indiánskymi kmeňmi. Okrem antipyretického účinku táto rastlina vykazuje ďalšie účinky ako sú antimalarický,

protinádorový, antioxydačný, antinociceptívny, anticholinesterázový, antibakteriálny a antivirotický. Kôra kmeňa tohto stromu je bohatá na indolové alkaloidy. <sup>4</sup>

Je to stredne vysoký strom, rastúci v amazonskom dažďovom pralese dosahujúci výšku až do 80 metrov a priemer do 3 metrov. Má svetlohnedý až žltý kmeň a listy usporiadané striedavo. Kvety sú bielej farby, kvitnúce od septembra do novembra. Plodmi sú pravidelné alebo nepravidelné zrná nešpecifickej vône a horkej chuti s mäsitou dužinou, v ktorej sa zvyčajne nachádza 5-15 plochých semien bielej farby. Plody a končeky vetvičiek produkujú latex. <sup>63</sup>

### **3.3.3 Obsahové látky *Geissospermum vellosii* Allemão**

Tak ako ostatné rastliny čeľade Apocynaceae, tak aj *Geissospermum vellosii* je bohatá rastlina na rôzne chemické zlúčeniny. Hlavnými obsahovými látkami tejto rastliny sú indolové alkaloidy, ktoré sa obzvlášť vyskytujú v kôre kmeňa. Ako prvý izolovaný indolový alkaloid z *Geissospermum vellosii* bol geissospermín v roku 1877, ktorý bol následne kyslou hydrolýzou rozštiepený na ďalšie tri zlúčeniny geissoschizín, apogeissoschizín a geissoschizolín. Ďalšími izolovanými alkaloidmi sú geissolosimin, vellosiminol, flavopereirin, vellosimin, geissovellin, pausperadin, 12-methoxy-1-metyl-aspidospermidin, aspidospermin, geissoschizon. <sup>64</sup>



Obrázok 13 Štruktúry alkaloidov osiahnutých v *G. vellosii* <sup>64</sup>

### 3.3.4 Biologická aktivita alkaloidov rastliny *Geissospermum vellosii* Allemão

Biologická aktivita alkaloidov obsiahnutých v tejto rastline je rozmanitá. Už oddávna bola táto rastlina využívaná pôvodnou populáciou, ktorá si z kôry pripravovala odvary vo vode alebo v alkohole na liečbu malárie, bolesti pečene, horúčky, žalúdočných porúch, zápchy, závratov a ako sexuálny stimulant. Neskôr sa u rastliny potvrdili ďalšie biologické aktivity ako sú anticholinesterázová, antinociceptívna, antiplazmodiálna, antivirotická a protinádorová aktivita, ktoré sú stále predmetom výskumu. <sup>65</sup>

#### 3.3.4.1 Anticholinesterázová aktivita

Acetylcholinesterázová aktivita bola objavená štúdiou aj u rastliny záujmu a to u *G. vellosii* za použitia Ellmanovho kolorimetrického testu na tenkovrstvovej chromatografii. Zistilo sa, že v mozgu potkanov a paúhrov elektrických bola AChE inhibovaná koncentračne závislým spôsobom a to frakciou obsahujúcou indolový alkaloid geissospermín, ktorý bol izolovaný a identifikovaný z kôry *G. vellosii* a je známe, že je hlavným alkaloidom tejto rastliny. Okrem toho sa tento alkaloid silne viaže na ľudský enzým AChE. <sup>4 65</sup>

Hlavnou úlohou tejto štúdie bolo vyhodnotiť AChE aktivitu alkaloidov z kôry *G. vellosii in vitro* a ich vlastnosti zvyšujúce pamäť *in vivo*. Získané frakcie obsahujúce alkaloidy z *G. vellosii* boli vyhodnotené *in vitro* na ich možnú inhibičnú aktivitu AChE a BuChE, ako aj na účinky správania myší proti amnézii vyvolanej skopolamínom *in vivo*. Frakcia z *G. vellosii* pri pH 7 vykazovala inhibičné účinky na AChE aj na BuChE v závislosti od koncentrácie. Stredná inhibičná hodnota IC<sub>50</sub> AChE u paúhora bola asi 15-krát nižšia (IC<sub>50</sub> 2.9 µg/mL) ako hodnota AChE v mozgu potkana. (IC<sub>50</sub> 39.3 µg/mL) Je známe, že medzi citlivosťou AChE na anticholinesterázové zlúčeniny existuje veľká medzidruhová variabilita. Táto získaná frakcia bola približne 25-krát účinnejšia proti BuChE ako AChE v mozgu potkana, ale iba 1,8-krát účinnejšia proti AChE paúhora. Čo ale naznačuje, že došlo k inhibícii oboch cholinesteráz s miernou selektivitou voči BuChE. Zistilo sa, že u pacientov s AD úroveň AChE aktivity klesá a aktivita BuChE sa zvyšuje. Test na tenkovrstvej chromatografii potvrdil, že alkaloid geissospermín, zodpovedá za pozorovanú anticholinesterázovú aktivitu. <sup>4</sup>



*In vivo* sa zistilo, že u myší, ktoré boli ošetrované alkaloidnou frakciou *G. vellosii*, došlo k zvráteniu skopolamínom indukovanej amnézie, táto frakcia pri hodnote pH 7 vykazovala na dávke závislé zvrátenie kognitívnych deficitov vyvolaných skopolamínom u myší, ale jeho účinky sa pri vyšších dávkach znížili. Je možné, že zlúčeniny z tejto frakcie vo vyšších dávkach vedú k nadmernej stimulácii pre-synaptických muskarínových receptorov M2, čo vedie k zníženému uvoľňovaniu ACh. Výsledky tejto štúdie naznačujú, že zlúčeniny prítomné v kôre *G. vellosii* majú anticholinesterázovú aktivitu a môžu priaznivo ovplyvniť kognitívny deficit v modeli cholinergnej hypofunkcie. <sup>4</sup>

#### **3.3.4.2 Antinociceptívna aktivita**

Nocicepcia je taká aktivita v periférnych nociceptívnych dráhach, ktorá prenáša alebo sprostredkuje informáciu o škodlivých udalostiach, obyčajne spojenú s poškodením tkaniva. <sup>66</sup> Keď nociceptívny stimul dosiahne dorzálne spinálne rohy, môžeme tento proces nazývať nocicepciou, keď však vystúpi k mozgu, stáva sa bolesťou. Nociceptívna bolesť je vyvolaná poškodením tkaniva a je spojená so zápalom. Zápal je obranná reakcia tela, ktorá je skoro vždy spojená s bolesťou. <sup>67</sup>

Aj antinociceptívna aktivita bola skúmaná u rastliny *Geissospermum vellosii*. Ukázalo sa, že surový extrakt, jednotlivé frakcie a zlúčeniny izolované z *Geissospermum vellosii* vykazovali antinociceptívny účinok proti viscerálnej bolesti vyvolanej intraperitoneálnou injekciou kyseliny octovej u myší. Okrem toho, surový extrakt z *Geissospermum vellosii* alebo jeho dichlórmetánová frakcia tiež inhibovali reakcie na neurogennú (skorú fázu) aj zápalovú (neskorú fázu) bolesť, spôsobenú formalínovou injekciou u myší. Kyselina octová a formalín boli použité v chemických modeloch nocicepcie. Tieto modely boli navrhnuté tak, aby za použitia kyseliny octovej a formalínu dochádzalo k vyvolávaniu bolesti u myší. Antinociceptívny účinok dichlórmetánovej frakcie zahŕňal interakciu so serotoninergným systémom 5-HT1A. Serotoninergný systém hrá veľmi dôležitú úlohu pri potláčaní bolesti. Niekoľko štúdií preukázalo, že serotoninergný systém v mieche môže potlačiť prichádzajúci škodlivý vnem do miechy a inhibovať vznik bolesti. Zistilo sa, že niektoré alkaloidy izolované z *Geissospermum vellosii* znižujú absorpciu serotonínu potkaními synaptosómami *in vitro*. Tieto nálezy spoločne naznačujú, že serotoninergný systém by sa mohol

skutočne podieľať na antinociceptívnych účinkoch dichlórmetánovej frakcie z *Geissospermum vellosii* na myši. Alkaloid, ktorý bol izolovaný z dichlórmetánovej frakcie a podieľa sa na tejto interakcii, je 12-metoxi-1-metyl-aspidospermidín, čo vysvetľuje antinociceptívne vlastností rastlinného extraktu. <sup>68</sup>

### **3.3.4.3 Protinádorová aktivita**

Jednou z najčastejších príčin úmrtia v dnešnej dobe sú onkologické ochorenia. Rakovina je všeobecným pojmom pre veľkú skupinu onkologických chorôb charakterizovaných nekontrolovanou bunkovou proliferáciou. Súčasná terapia založená na syntetických chemoterapeutikách sa vyznačuje radou vedľajších nežiadúcich účinkov. Z toho dôvodu sa neustále hľadajú nové látky, ktoré by tieto vlastnosti nemali a pôsobili by selektívnejšie na nádorové bunky. Prírodné produkty sa v tomto ohľade javia ako sľubný zdroj nových účinných látok na liečbu rakoviny. <sup>69</sup>

#### *Kolorektálny karcinóm*

Rakovina hrubého čreva a konečníka je jednou z najčastejšie diagnostikovaných druhov rakoviny. Okrem toho je tretím najrozšírenejším novotvarom na svete a druhou najčastejšou príčinou úmrtia na rakovinu. Väčšina z týchto novotvarov je ojedinelá kvôli somatickým mutáciám, ale asi 15 % je dedičných. Napriek tomu, že je to ten istý nádor, má zreteľné odlišné klinicko-patologické a molekulárne vlastnosti, ako aj rôzne prognózy. <sup>70</sup> V súčasnosti je radikálna chirurgická resekcia štandardnou liečbou kolorektálneho karcinómu. Mnoho pacientov však progreduje do systémových metastáz a relatívna miera prežitia týchto pacientov sa zníži iba na 5%. <sup>71</sup>

Jedna z ďalších štúdií na tejto rastline preukázala, že flavopereirín,  $\beta$ -karbolínový alkaloid extrahovaný z *G. vellosii*, selektívne inhibuje syntézu DNA v rakovinových bunkách. Bol zpozorovaný väčší inhibičný účinok flavopereirínu po 24 hodinách a 72 hodinách ( $IC_{50, 24\text{hod}} = 0,023 \mu\text{g/ml}$ ,  $IC_{50, 72\text{hod}} = 0,015 \mu\text{g/ml}$ ). Cieľom tejto štúdie bolo skúmať funkčný mechanizmus a terapeutický potenciál flavopereirínu na bunkách kolorektálneho karcinómu *in vitro* a *in vivo*. <sup>72</sup>

Flavopereirín selektívne potláča syntézu DNA *in vitro* tým, že vytvára komplexy alkaloid-DNA s rakovinovými ale nie s normálnymi bunkami. Tento komplex skôr inhibuje syntézu než predlžovanie reťazca DNA v rakovinových bunkách. Flavopereirín

zvyšuje expresiu P53 a fosforyláciu v bunkách kolorektálneho karcinómu spôsobom závislým od dávky. P53 spôsobuje zastavenie bunkového cyklu v reakcii na poškodenú DNA, taktiež hrá dôležitú úlohu v bunkových dráhach pri reakcii na opravu DNA, apoptózu a starnutie buniek. <sup>73</sup> Preto bránením iniciácie syntézy DNA v bunkách kolorektálneho karcinómu môže flavopereirín zvyšovať aktivitu P53 a spúšťať zastavenie rastu buniek, indukciu apoptózy a zníženie regulácie signálov prežitia. Tento mechanizmus funkčne obmedzuje rast kolorektálneho karcinómu a ďalších rakovinových buniek. <sup>5</sup>

### *Rakovina prostaty*

Rakovina prostaty je častou rakovinou u mužov vo veku nad 50 rokov. Napriek terapeutickým pokrokom predstavuje rakovina prostaty stále hlavné urologické ochorenie spojené so značnou chorobnosťou a úmrtnosťou. Androgén-deprivačná terapia (ADT) bola základným kameňom u pokročilých a metastatických rakovín prostaty. Napriek počiatkovej vysokej miere odpovede je liečba rakoviny s ADT obmedzená; takmer u všetkých mužov sa po ADT vytvoril progresívny karcinóm prostaty nazývaný: kastrochene rezistentný karcinóm prostaty (CRPC) <sup>74</sup>

Okrem pôsobenia flavopereirínu,  $\beta$ -karbolínového alkaloidu z extraktu *G. vellosii*, na kolorektálny karcinóm, má taktiež tento alkaloid inhibičné účinky na dve línie buniek rakoviny prostaty a to líniu LNCaP a PC3. <sup>75</sup> Tento extrakt potláča rast a indukuje apoptózu buniek LNCaP rakoviny prostaty závislých od androgénov *in vitro* a *in vivo*. Ďalším skúmaním tejto rastliny sa potvrdili protirakovinové účinky *G. vellosii* extraktu na bunky prostaty CRPC odolné voči metastatickým kastráciám. *G. vellosii* extrakt potláča rast vysoko malígnych metastatických buniek CRPC PC3 v závislosti od dávky a času a to indukciou apoptózy a zastavením bunkového cyklu. Zistilo sa, že tento extrakt zvýšil hladiny expresie inhibítorov bunkového cyklu, p21 a p27 a znížil expresiu proliferčných proteínov. Ďalej vykazoval protinádorové účinky prostredníctvom inhibície signalizácie AKT/NF $\kappa$ B. <sup>76</sup> NF- $\kappa$ B hrá rozhodujúcu úlohu pri regulácii indukovateľnej génovej expresie v imunite, stresových reakciách a zápaloch, okrem toho sa podieľa na regulácii prežitia buniek. AKT je serín-treonínkináza, ktorá je známa svojou schopnosťou inhibovať dráhy bunkovej smrti. Expresia a aktivita AKT je regulovaná NF- $\kappa$ B. <sup>77</sup>

Výsledky pôsobenia extraktu z Pao pereira, potvrdzujú jeho silné protinádorové účinky na CRPC bunky, ktoré podporujú zastavenie rastu, apoptózu a narušujú proliferáciu buniek. Úlohou Pao extraktu je supresia aktivácie NFκB a jeho proliferlačnej a metastatickej génovej expresie, tieto účinky vyvolávajú myšlienku možného použitia tohto extraktu, ako potenciálneho terapeutického kandidáta pri liečbe pacientov s CRPC. <sup>76</sup>

#### **3.3.4.4 Benígna hyperplázia prostaty**

Benígna hyperplázia prostaty (BHP) je jednou z hlavných urogenitálnych patológií postihujúcich starnúcich mužov. Vyznačuje sa progresívnym prerastaním glandulárneho a stromálneho tkaniva, ktoré spôsobuje zväčšenie veľkosti prostaty. Kompresia močovej trubice je spôsobená rastúcim tkanivom BHP, ktorá vyvoláva nepríjemné príznaky dolných močových ciest vrátane urinárnej naliehavosti, obštrukcie výstupu močového mechúra a neúplného vyprázdnenia močového mechúra. Prerušovaným močením a narušením trvalého spánku BHP znižuje kvalitu života postihnutých mužov. <sup>78</sup>

BHP je spôsobená hormonálnou nerovnováhou medzi testosterónom a dihydrotestosterónom (DHT), ktorý vzniká z testosterónu pôsobením 5α-reduktázy. DHT má trojnásobne vyššiu afinitu k androgénnym receptorom ako testosterón. Väzbou DHT na androgénne receptory dochádza k ich aktivácii a k proliferácii buniek prostaty. Jedna z ďalších štúdií odhalila, že extrakt z Pao pereira potláča benígnu hyperpláziu prostaty (BHP) indukovanú testosterónom u potkanov, inhibíciou 5α-reduktázy. Táto prevedená štúdia, ktorá signifikantne preukázala, že výťažok z Pao pereira zabraňuje vzniku BHP, indukovanej testosterónom na potkaňom modeli. Kastrovaným potkanom bol podaný testosterón propionát a následne časti testovaných potkanov bol podaný extrakt z Pao pereira a druhej časti bol podaný finasterid (inhibítor 5α-reduktázy), ktorý slúžil ako pozitívna kontrola. Po 28 dňoch boli odobraté a zvážené vzorky jednotlivých potkaních prostat a bola preukázaná významná podobnosť inhibičných účinkov extraktu z Pao pereira a finasteridu na BHP. Extrakt z Pao pereira používaný v tejto štúdii obsahoval predovšetkým flavopereirín a niekoľko ďalších indolových a p-karbolínových alkaloidov prítomných v menších množstvách vrátane alkaloidného geissolosimínu, geissospermínu, geissoschizolínu a

vellosiminolu. Zistilo sa, že účinnosť Pao extraktu proti BPH bola aspoň čiastočne sprostredkovaná flavopereirínom. Výsledky štúdie potvrdzujú anti-BHP účinnosť Pao pereira extraktu *in vivo* a tým naznačujú, že extrakt z Pao pereira by mohol byť sľubným rastlinným liekom na liečbu BHP.<sup>75</sup>

### 3.4 Alzheimerová choroba

Alzheimerova choroba, tiež nazývaná presenilná demencia je chronické neurodegeneratívne ochorenie spojené so selektívnou stratou cholinergných neurónov v mozgu. Taktiež je sprevádzaná klesajúcou hladinou neurotransmiteru ACh. Výskyt AD koreluje so zvýšeným hromadením senilných plakov bohatých na  $\beta$ -amyloidy ( $A\beta$ ) a neurofibrilárnych kĺbiok v mozgu. Ochorenie je klinicky charakterizované progresívnym poklesom kognitívnych funkcií a stratou pamäti, čo nakoniec vedie k demencii.<sup>65</sup>

Tak ako u iných demencií neurodegeneratívneho pôvodu dochádza u AD k degenerácii určitých mozgových proteínov a k tvorbe patologických proteínov, hlavne k tvorbe  $A\beta$ . Tento typ beta-peptidu najskôr oligomeruje, ďalej dochádza ku koagulácii týchto peptidov v extracelulárnom priestore mozgovej kôry, následne častice peptidu polymerizujú a tak dochádza k vzniku patologického proteínu  $A\beta$ . Ten je základnou jednotkou neurodegeneratívnych plakov. V oblasti výskytu plakov dochádza k celej rade neurodegeneratívnych dejov ako napríklad k sterilnému zápalu s uvoľňovaním pôsobkov akútnej zápalovej fázy. V dôsledku toxicity  $A\beta$  dochádza k aktivácii niektorých proteinkináz ako napríklad  $GSK3\beta$  (Glykogénsyntáza kináza-3 beta je proteín-serínkináza, ktorá sa podieľa na určovaní a diferenciacii buniek, fosforyluje niekoľko regulačných proteínov, ktoré sú aktivované defosforyláciou v reakcii na hormóny alebo rastové faktory. Je negatívnym regulátorom glukózovej homeostázy a podieľa sa na metabolizme energie, zápale, mitochondriálnej dysfunkcii a apoptických dráhach. Poruchy tohto génu boli spojené s Parkinsonovou chorobou a Alzheimerovou chorobou.)<sup>81</sup> a k degradácii intraneuronálneho proteínu TAU. Tým dochádza k tvorbe tzv. neurofibrilárnych tangles (kĺbiok), a takto poškodené neuróny potom podliehajú apoptóze. Celkovo sa apoptóza u AD výrazne zvyšuje a preto dochádza k kortikosubkortikálnej atrofii mozgu. Následne k zníženiu synaptickej

plasticity, k zníženiu tvorby niektorých rastových faktorov mozgu a k ďalším degeneratívnym zmenám. <sup>79</sup>

Okrem prítomnosti patologických proteínov A $\beta$  a TAU proteínu dominuje v patofyziológii AD strata cholinérgnych neurónov. Poškodenie cholinérgného systému v časných štádiach ochorenia prispieva ku kognitívnemu oslabeniu, stratám pozornosti a poruchám chovania. Metabolizmus ACh je ovplyvňovaný dvoma cholinesterázami, ktoré ho štiepia. AChE a BuChE se líšia svojou špecifitou, expresiou a aktivitou v rôznych oblastiach centrálného nervového systému. K zmenám aktivít cholinesteráz dochádza v staršom veku a taktiež za patologických stavov, v prípade AD se znižuje aktivita AChE a zvyšuje sa činnosť BuChE. Inhibítory cholinesteráz zmierňujú cholinérgny deficit a pozitívne ovplyvňujú kognitívne, funkčné a behaviorálne symptómy ochorenia. V súčasnosti sú schválenými inhibítormi cholinesteráz donepezil, rivastigmin a galantamin. Jednotlivé látky se líšia svojou afinitou k cholinesterázám, farmakodynamickými a farmakokinetickými vlastnosťami. <sup>80</sup>

V patofyziológii AD je taktiež zahrnutá znížená aktivita GABAérgného systému a vyššia vulnerabilita k excitotoxicite vyvolanej glutamátom. Nadmernou aktiváciou ionotropných glutamátových receptorov dochádza k nadmernému influxu kalcia do buniek, aktivácii rady enzýmov a kaskád reakcií, ktoré môžu končiť programovanou bunčnou smrťou, apoptózou. Memantin účinkuje ako antagonista N-methyl-D-aspartátových glutamátových receptorov, blokuje nadmernú aktivitu týchto receptorov, ale umožňuje ich fyziologickú funkciu, nevyhnutnú pre tvorbu pamäťových stôp. <sup>80</sup>

AD je nevyliciteľnou chorobou, liečba spomaľuje len progresiu ochorenia. Súčasná liečba AD spočíva v nahradení neurotransmitterov, teda zvýšení syntézy ACh, ďalej zvýšení presynaptického uvoľňovania ACh a zníženiu ACh synaptickej degradácie AChE inhibítormi. Inhibícia AChE má priaznivé účinky na kognitívne, funkčné a behaviorálne príznaky AD. <sup>65</sup>

## 4 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

### 4.1 Materiál, chemikálie a prístrojové vybavenie

#### 4.1.1 Rozpúšťadlá a chemikálie

- acetón p. a. ( $\text{CH}_3\text{COCH}_3$ ), (Penta, Praha)
- amoniak p. a. ( $\text{NH}_3$ ), (Penta, Praha)
- benzín, (Penta, Praha)
- cyklohexán p. a. ( $\text{C}_6\text{H}_{12}$ ), (Penta, Praha)
- dietylamin p. a. ( $\text{Et}_2\text{NH}$ ), (Penta, Praha)
- dietyléter p. a. ( $\text{Et}_2\text{O}$ ), (LachNer)
- etanol 95% ( $\text{EtOH}$ ), (Lihovar Chrudim, Chrudim)
- etylacetát p. a. ( $\text{EtOAc}$ ), (Penta, Praha)
- chloroform p. a. ( $\text{CHCl}_3$ ), (Penta, Praha)
- kyselina chlorovodíková ( $\text{HCl}$ ) 35%, (Penta, Praha)
- toluén č. (To), (Penta, Praha)
- uhličitan sodný 35% ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), (Penta, Praha)
- Dusičnan bizmutitý [ $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$ ] (Penta, Praha)
- Jodid draselný ( $\text{KI}$ ) (Penta, Praha)
- Kyselina vínna ( $\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_6$ ) (Penta, Praha)
- Chlorid rtuťnatý ( $\text{HgCl}_2$ ) (Penta, Praha)

#### 4.1.2 Pomocný materiál

- kremelina C 535 Cedlite, Sigma-Aldrich, Praha
- vata

#### 4.1.3 Detekčné činidlá

- Zásobný roztok Dragendorffovho činidla (modifikovaný podľa Muniera)

Zásobný roztok činidla vznikol zmiešaním roztoku A a roztoku B v pomere 1:1. Roztok A bol pripravený rozpustením 1,7 g dusičnanu bizmutitého zásaditého a 20 g kyseliny vínnej v 80 ml vody. Roztok B rozpustením 32 g jodidu draselného v 80 ml vody. Detekčný roztok bol pripravený, pridaním vodného roztoku kyseliny vínnej, ktorý bol

zložený z 10 g kyseliny vínnej a 50 ml vody k 5 ml zásobného roztoku. Činidlo bolo uchovávané v chladničke pri teplote 4°C.

- Mayerovo činidlo

Vzniklo rozpustením 5 g jodidu draselného v 30 ml vody a pridaním 1,35 g chloridu ortuťnatého. Činidlo bolo uchovávané v chladničke pri teplote 4°C.

#### **4.1.4 Mobilné fázy pre tenkovrstvú chromatografiu**

- S1: cHex : To : Et<sub>2</sub>NH (50 : 50 : 10)
- S2: To : EtOAc : Et<sub>2</sub>NH (70 : 20 : 10)
- S3: To : EtOAc : Et<sub>2</sub>NH (60 : 30 : 10)
- S4: To : CHCl<sub>3</sub> : EtOH : Et<sub>2</sub>NH (80 : 80 : 30 : 10)
- S5: To : Et<sub>2</sub>NH (9 : 1)
- S6: To : EtOAc : MeOH : Et<sub>2</sub>NH (9 : 1 : 0,1 : 5)

#### **4.1.5 Adsorpčný materiál pre chromatografiu**

Ako adsorbent pre stĺpcovú chromatografiu bol použitý neutrálny oxid hlinitý (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>), ktorý bol deaktivovaný 6% vody, veľkosť zrna 63-200 μm (Across, Lach-Ner, Neratovice)

Silikagél (Silica gel 60 GF254) bol použitý na prípravu liatych dosiek pre preparatívnu tenkovrstvú chromatografiu (Merck, Praha)

Komerčné chromatografické dosky potiahnuté (Silica gel 60 GF<sub>254</sub>) o veľkosti 20 x 20 cm a hrúbke 0,2 mm boli použité na kontrolné TLC (Merck, Praha)

#### **4.1.6 Prístrojové vybavenie**

- vákuová odparka Büchi rotavapor R-114 (Büchi, Labortechnik, AG Švajčiarsko)
- plynový chromatograf Agilent Technologies 7890A s hmotnostným detektorom Agilent Technologies 5975 (Agilent Technologies Santa Clara, California USA)
- spektrometer ESI-MS Thermo Finnigan LCQDuo (GenTech Scientific, Inc., New York, USA)
- spektrometer Varian Iniova 500 (Varian, USA)
- polarimeter P3000 (A. Krüss Optronic Nemecko)



## **4.2 Všeobecné postupy**

### **4.2.1 Príprava rozpúšťadiel**

Pred použitím boli všetky používané rozpúšťadlá prečistené destiláciou, následne boli uchovávané v označených nádobách z tmavého skla, chránené pred svetlom.

### **4.2.2 Odparovanie**

Frakcie, obsahujúce rozpúšťadlá, boli odparené na rotačnej vákuovej odparke za zníženého tlaku vo vodnom kúpeli pri teplote 40°C. Menšie objemy v ampulkách boli odparené pomocou vodného kúpeľa s teplotou 60–80°C a celý proces bol urýchľovaný prúdom vzduchu.

### **4.2.3 Sušenie a skladovanie**

Jednotlivé frakcie a získané čisté látky boli dosušené vo vákuovom exsikátore nad silikagélom po dobu min. 24 hodín, po vysušení boli uchovávané v chladničke pri teplote 2-8°C.

### **4.2.4 Stĺpcová chromatografia**

Stĺpcová chromatografia bola prevedená skokovou elúciou. Naliatím suspenzie adsorbentu (neutrálny  $\text{Al}_2\text{O}_3$  deaktivovaný 6 % vody) v mobilnej fáze bola pripravená kolóna pre stĺpcovú chromatografiu. Extrakt bol nanosený na kolónu vo forme rozteru. Rozter bol pripravený rozpustením surového extraktu v chloroforme a pridaním adsorbentu v pomere 1 : 4. Následne bol chloroform na vodnom kúpeli odparený. Pred aplikáciou na kolónu bol rozter dosušený za zníženého tlaku v exsikátore, po dobu 24 hodín.

### **4.2.5 Príprava liatych dosiek pre preparatívnu tenkovrstvú chromatografiu**

Suspenzia zložená z 6,5 g silikagélu Silica gel 60 GF254 a 20 ml destilovanej vody bola rovnomerne nanosená na predom očistené a chloroformom odmastené sklenené dosky o rozmere 15 x 15 cm. Po nanosení sa dosky nechali sušiť najmenej 24 hodín.

### **4.2.6 Preparatívna tenkovrstvá chromatografia**

Na liate sklenené a komerčné hliníkové dosky boli nanášané jednotlivé vzorky rozpustené v zmesi etanolu a chloroformu v pomere 1 : 1.

Dosky sa nechali vyvíjať v sklenených komorách, ktoré boli predtým aspoň 20 minút sýtené príslušnou elučnou zmesou.

#### **4.2.7 Detekcia alkaloidov**

Jednotlivé chromatogramy boli detegované pod UV lampou pri vlnovej dĺžke 254 nm, následne boli jednotlivé zóny označené. Pre potvrdenie prítomnosti alkaloidov boli dosky postriekané Dragendorffovým činidlom, ktoré reaguje s alkaloidmi za vzniku oranžového až oranžovočerveného sfarbenia.

Počas prípravy alkaloidného extraktu sa zisťovala prítomnosť alkaloidov v kyslej vodnej fáze reakciou s Mayerovým činidlom. Po okyslení na pH 3-4 a pridaní 1-2 ml vody sa k roztoku pridalo pár kvapiek činidla a za prítomnosti alkaloidov došlo k vylúčeniu bielej zrazeniny.

### **4.3 Stanovenie biologickej aktivity**

#### **4.3.1 Testovanie inhibičnej aktivity získaných alkaloidov proti cholínesterázam**

##### **4.3.1.1 Chemikálie**

- Acetylthiocholin jodid p. a. (Sigma Aldrich, Praha) (ATChI) (použitý 10mM roztok)
- Butyrylthiocholin jodid p. a. (Sigma Aldrich, Praha) (BuTChI) (použitý 10mM roztok)
- Dihydrogenfosforečnan draselný bezvodý p. a. (Lach-Ner, Neratovice) ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )
- Dihydrogenfosforečnan sodný dihydrát p. a. (ing. Švec – Penta, Praha) ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )
- 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoová kyselina  $\geq 98\%$  (Sigma Aldrich, Praha) (DTNB) (použitý 5mM roztok)
- Dimetylsulfoxid p.a. (Sigma-Aldrich) (DMSO)
- Hydrogenfosforečnan disodný bezvodý p. a. (ing. Švec – Penta, Praha) ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ )
- 100mM fosfátový pufor pH 7,4
- Rekombinantná AChE (Univerzita Hradec Králové)
- Rekombinantná BuChE (Univerzita Hradec Králové)

- Tabuľka 1 Podmienky stĺpcovej chromatografie etherového výtrečku

Hmotnosť odparku	50,4 g
Adsorbent na rozter	200 g
Adsorbent Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	2,05 kg
Deliaca vrstva na stĺpci	7,2 : 50 cm
Mŕtvy objem	1600 ml
Objem frakcie	250 ml
Doba toku	20 min

#### **4.3.1.2 Prístroje**

- Reader Synergy<sup>TM</sup> HT Multi-Detection Microplate Reader (BioTek, USA)

#### **4.3.1.3 Podmienky merania**

- teplota 37 °C
- prostredie fosfátového pufru (pH 7,4)
- spektrofotometrické meranie farebných produktov pri vlnovej dĺžke 412 nm (AChE) a 412 nm (BuChE)

#### **4.3.2 Stanovenie inhibičnej aktivity izolovaných alkaloidov proti AChE a BuChE**

Na stanovenie hodnoty inhibičnej aktivity IC<sub>50</sub> bola použitá Ellmanova spektrofotometrická metóda s použitím 5,5'-dithiobis-2-benzoovej kyseliny (DTNB).

Pri stanovení inhibičnej aktivity jednotlivých alkaloidov bol najskôr prevedený screening pri koncentrácii 100Mm, pokiaľ bola inhibičná aktivita vyššia než 50 %, prebehlo stanovenie hodnoty IC<sub>50</sub>. Na meranie inhibičnej aktivity týchto látok boli použité s DMSO nariadené roztoky s koncentráciami 40 mM, 10 mM, 4 mM, 1 mM a 0,4 mM. DMSO bol použitý aj ako slepá vzorka.

Počas stanovenia bol spektrofotometricky sledovaný nárast absorbancie za 1 min pri vlnových dĺžkach [ $\lambda$ = 412 nm pre AChE a aj pre BuChE]. Hodnoty IC<sub>50</sub> boli vypočítané v  $\mu$ M, zo získaných hodnôt poklesu aktivity AChE alebo BuChE nelineárnou

regresiou v programe GraphPaD Prism (verzia pre Windows; výrobca GraphPaD Software, San Diego, CA, USA). Výsledky boli následne porovnané s hodnotami IC<sub>50</sub> vzoriek známych inhibítorov cholinesteráz: galantamínom (IC<sub>50</sub> AChE = 1,710 ± 0,065 μM, IC<sub>50</sub> BuChE = 42,301 ± 0,065 μM), a berberínom (IC<sub>50</sub> AChE = 0,705 ± 0,104 μM, IC<sub>50</sub> BuChE = 30,721 ± 3,492 μM). Percentá inhibície (% I) boli vypočítané podľa vzorca:

$$\% I = 100 - (\Delta A_{BL} / \Delta A_{SA}) * 100$$

% I – percentá inhibície

ΔA<sub>BL</sub> – pokles absorbancie slepej vzorky počas 1 minúty

ΔA<sub>SA</sub> - absorbancia testovanej vzorky počas 1 minúty

## 4.4 Izolácia alkaloidov

### 4.4.1 Rastlinný materiál

Sušená kôra *Geissospermum vellosii* bola prevzatá 10.10.2018 od dodávateľa Amazon Herbs Surinam. Dokladovaná vzorka rastlinného materiálu je uchovaná na katedre farmaceutickej botaniky pod kódom AL-674. Rastlina bola vybratá pre fytochemickú prácu na základe screeningovej štúdie, pri ktorej preukázala zaujímavú inhibičnú aktivitu voči cholinesterázam. (IC<sub>50</sub> AChE = 15,19 ± 0,96 μg/ml, BuChE = 0,37 ± 0,049 μg/ml)

### 4.4.2 Príprava alkaloidného extraktu

Sumárny alkaloidný extrakt bol pripravený z 43 kg vysušenej a rozomletej kôry *Geissospermum vellosii*. Kôra drogy bola rozomletá približne na veľkosť do 5 mm. Dvojnásobná extrakcia prebiehala za varu pod spätným chladičom s 95% EtOH po dobu asi 30 minút. Bolo použité jeden diel drogy a štyri diely rozpúšťadla. Extrakt bol prefiltrovaný a rozpúšťadlo bolo následne odparené za zníženej teploty. Vo výsledku bolo získané množstvo primárneho extraktu približne 5 kg, ktorý bol viskózne konzistencie a tmavohnedej farby.

Terciárne bázy boli získané tak, že, odparok bol rozpustený v 500 ml 95% EtOH. Rozpustený primárny extrakt bol prevedený do destilačnej banky s približne 1,5 l H<sub>2</sub>O, zahriaty na 60°C kvôli oddestilácii EtOH. K zbytku bolo pridané asi 5 l 80°C destilovanej

vody, dokonale premiešané a pridané také množstvo 5% HCl, aby pH filtrátu bolo v rozmedzí 1,3-1,5. Roztok bol doplnený destilovanou vodou približne na objem 15 l a počas noci sa nechal sedimentovať. Ráno bola prevedená s opatrnosťou dekantácia, následne bol roztok izbovej teploty prefiltrovaný cez neutrálnu kremelinu a zbytok bol ešte raz premytí malým množstvom destilovanej vody. Takto bolo získané 17,5 l primárneho extraktu.

Pred vytrepávaním alkaloidov z primárneho extraktu bol filtrát zriedený destilovanou vodou v pomere 1 : 1, následne bol každý liter tohoto extraktu zalkalizovaný pridaním 200 ml 10% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> a s 500 ml CHCl<sub>3</sub> bolo prevedené prvotné vytrepávanie v Erlenmayerovej banke. Následne bol roztok prefiltrovaný do trepačky cez vliselin. Celkovo bolo prevedené vytrepávanie terciárnych bází 5-krát. Chloroformový výtrepok bol odparený. Zo 43 kg drogy bolo získané 1530 g výtrepku terciárnych bází, ktorý bol tmavohnedej farby a veľmi viskózneho charakteru.

Čistenie terciárnych bází prebiehalo tak, že odparok (1530 g) bol rozpustený v chloroforme a rozdelený do šiestich baniek po 255 g. V každej banke bol odparok spracovaný zvlášť. Banky boli zahriate na vodnom kúpeli až do stekutenia odparku, približne na 70°C. K tekutému odparku bolo pridané 200 ml 5% HCl, dôkladne premiešané a 300 ml vody a znovu dôkladne premiešané. Potom sa nechala suspenzia vychladiť. Kyslý hnedý roztok bol zliaty a postup bol znovu opakovaný s tým rozdielom, že na konci bola prevedená sonikácia po dobu asi 5 minút. Nerozpustené zbytky zo všetkých šiestich baniek boli nakoniec spojené. K tomu bolo pridané 500 ml 5% HCl, dôkladne pretrepané s 600 ml destilovanej vody, zahriate na 70°C a sonifikované, následne bola vodná vrstva opäť zliata. Spojené kyslé roztoky alkaloidov boli zriedené vodou a po vychladnutí bol tento roztok prefiltrovaný. Bolo získané 12,5 l kyslého, hnedého roztoku. Tento roztok alkaloidov bol vytrepávaný v deliacom lieviku po jednom litri. K roztoku bolo vždy pridané 230 ml 10% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 600 ml Et<sub>2</sub>O a potom ešte 4x 300 ml Et<sub>2</sub>O. Éterová vrstva bola dobre deliteľná a pritom bola vylúčená hnedosivá zrazenina. Oddelené vrstvy éteru boli zliate a rozpúšťadlo bolo oddestilované. Vznikol žlto-medový, veľmi viskózny odparok. Hmotnosť získaná z 1230 g primárneho alkaloidného etherového výtrepku bola 50,4 g.

Použitím Mayerovho činidla bolo preukázané ešte veľké množstvo alkaloidov vo vodnom roztoku, z toho dôvodu bol vodný roztok opäť vytrepávaný 1x s 500 ml  $\text{CHCl}_3$  a 5x s 350 ml  $\text{CHCl}_3$ . Spojené chloroformové výtrepky boli odparené za vzniku sivohnedého odparku. Celková hmotnosť z 1230 g primárneho alkaloidného chloroformového výtrepku bola 53,8 g.

Kvartérne báze vo forme jodidov boli získané tak, že bázičky extrakt po vytrepávaní terciárnych bázy bol prefiltrovaný cez vliselin. Celkovo 25 l, z toho bolo odobraté 1200 ml a opatrne zneutralizované v 2 litrovej banke pomocou HCl v pomere 2 : 1 až roztok pri miešaní prestal peniť, približne na pH 3. Za stáleho miešania a po častiach bol k tomu pridávaný roztok z 19,5 g KI a 30 ml vody. Následne bola vylúčená belavá zrazenina. Táto suspenzia sa nechala za občasného miešania odležať približne na 15 minút. Potom bolo k suspenzii pridané 300 ml  $\text{CHCl}_3$  a obsah v banke bol pretrepávaný. Zrazenina bola rozpustená a roztok sa vyčeril. Následne bol tento roztok vliati do trepačky cez vliselin a znovu dokonale pretrepávaný. Vytrepávanie s chloroformom za týchto podmienok bolo prevedené celkovo 3x. Chloroformový výtrepok bol odparený a vodný zbytok sa už ďalej neuchovával. Celkové získané množstvo kvartérnych jodidov bolo 75,6 g žltého odparku.

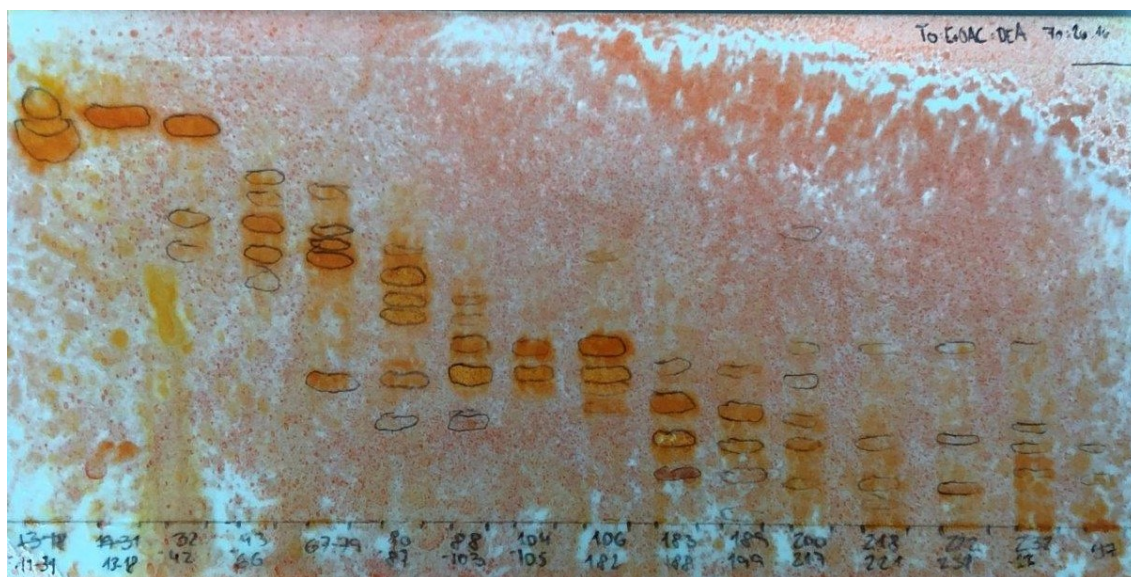
#### **4.4.3 Stĺpcová chromatografia etherového výtrepku**

Odparok získaný z primárneho alkaloidného etherového extraktu bol separovaný na jednotlivé frakcie pomocou stĺpcovej chromatografie, ktorá prebiehala formou stupňovitej elúcie za použitia mobilnej sústavy benzín,  $\text{CHCl}_3$  a EtOH. Jednotlivé frakcie boli zbierané po objeme 250 ml, tie boli ďalej spájané podľa podobného obsahu alkaloidov na základe retenčného času na TLC. Prítomnosť alkaloidov v jednotlivých frakciách bola taktiež potvrdená postrekom s Dragendorffovým činidlom, kedy za prítomnosti alkaloidov došlo k oranžovo-červenému sfarbeniu škvŕny. Celkovo bolo získaných 272 frakcií, ktoré boli následne spojené do 16 podfrakcií. Podfrakcie boli ďalej využité na izoláciu čistých alkaloidov.

Tabuľka 2 Stĺpcová chromatografia spojená do jednotlivých podfrakcií

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

Ďalej bolo pripravené súhrnné TLC alkaloidného extraktu *Geissospermum vellosii* z jednotlivých spojených frakcií stĺpcovej chromatografie. Silika gél 60 GF254 slúžil ako adsorbent za použitia mobilnej fázy S2. Na detekciu bola použitá UV lampa a taktiež Dragendorffovo činidlo na potvrdenie prítomnosti alkaloidov. (Obrázok č.14)



Obrázok 14 Súhrnné TLC alkaloidného extraktu *Geissospermum vellosii* zo spojených jednotlivých frakcií stĺpcovej chromatografie detegované Dragendorffovým činidlom

#### 4.4.4 Izolácia alkaloidov z podfrakcie GV 11 (189-199)

Hlavnou úlohou práce bolo spracovať podfrakciu č. 11, ktorej celková hmotnosť bola 3,0227 g. Spracovanie prebiehalo preparatívnou tenkovrstvou chromatografiou (TLC). Z tejto podfrakcie bolo odobraté množstvo 0,4922 g, ktoré bolo rozpustené v malom objeme chloroformu a následne nanosené v tenkej línii na nalievané preparatívne TLC dosky o veľkosti 15 x 15cm. Separácia prebiehala 2 krát v sklenených komorách, ktoré boli predtým približne 20 minút sýtené S5 mobilnou fázou. Mobilná fáza bola vybratá na základe najlepšej separácie jednotlivých alkaloidov. Výber bol uskutočnený podľa kontrolných TLC vyvíjaných v jednotlivých mobilných fázach.

Po separácii boli dosky vysušené a následne detekované pod UV lampou. Na nalievaných doskách boli pozorovateľné 4 zóny. Zóny s rovnakým retenčným faktorom z jednotlivých dosiek boli spojené a eluované z adsorbentu pomocou  $\text{CH}_3\text{Cl}_3$  : EtOH v pomere 1 : 1. Zóny boli označené GV 11a až GV 11d. Ďalej bola spracovaná zóna GV 11b preparatívnou TLC, až do získania čistej látky. Čistá látka bola získaná z podfrakcie GV 11b2, ktorá bola vyvíjaná v nasýtenej komore fázou S6. Následne bola prevedená



separácia na zóny, ďalej elúcia a po odparení rozpúšťadla a rekryštalizácii, bola získaná žltá kryštalická látka, GV 11 b2D, u ktorej bola následne prevedená štruktúrna analýza a testy biologickej aktivity.

## **4.5 Štruktúrna analýza**

### **4.5.1 GC-MS analýza**

Analýza hmotnostných spektier izolovaných látok bola prevedená na plynovom chromatografe Agilent 7890A GC 5975, ktorý pracuje s hmotnostným detektorom pri elektrónovej ionizácii 70 eV za teplotného programu 100-180°C 7 minút, potom pri 180°C 1 minútu a nakoniec pri teplote 180-300°C 24 minút. Použila sa kolona Hp-5 MS (30m x 0,250 mm x 0,250 µm Agilent Technologies, USA). Hélium bolo nosným plynom s prietokovou rýchlosťou 1 ml/min. Vzorka bola nanosená vo forme nástreku pri teplote 180°C a objeme 1 µl metanolického roztoku (split 1 : 10).

Alkaloidná identifikácia bola prevedená na základe porovnania ich spektier so spektrami dostupnými v komerčnej knižnici NIST (National Institute of Standards and Technology Library USA), s dátami publikovanými v odborných literatúrach a so štandardami látok, ktoré už boli izolované na našom pracovisku.

### **4.5.2 Nukleárna magnetická rezonancia (NMR analýza)**

Spektrá  $^1\text{H}$ -NMR a  $^{13}\text{C}$ -NMR boli namerané prístrojom Varian Iniova 500. Na meranie  $^1\text{H}$  spektra sa použila inverzná 5mm ID PGF sonda s pracovnou frekvenciou 499,9 MHz.  $^{13}\text{C}$  spektrum bolo namerané 5 mm SW širokopásmovou sondou s pracovnou frekvenciou 125,7 MHz. Meranie prebehlo pri teplote 25°C v deuteriochloroforme ( $\text{CDCl}_3$ ).

### **4.5.3 Optická otáčavosť**

Optická otáčavosť bola meraná polarimetrom P3000 v prostredí ethanolu pri teplote 25°C.

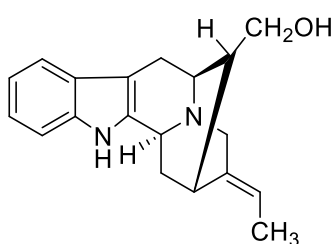
## 5 VÝSLEDKY

### 5.1 Identifikácia štruktúry izolovaného alkaloidu

Identifikácia izolovanej látky prebehla na základe výsledkov hmotnostnej spektrometrie GC-MS, nukleárnej magnetickej rezonancie NMR a porovnania štruktúry s literatúrou. Izolovanou látkou je Normacusin B.

#### 5.1.1 Normacusin B

Popis: žltá kryštalická látka



Obrázok 15 Normacusin B

##### 5.1.1.1 NMR analýza

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  1.57 (3H, d,  $J = 6.8$  Hz), 1.66 (1H, dt,  $J = 12.5, 3.7$  Hz), 1.78 (1H, q,  $J = 7.5$  Hz), 1.93 (1H, t,  $J = 10.0$  Hz), 2.61 (1H, d,  $J = 15.4$  Hz), 2.72 (1H, s), 2.74 (1H, d,  $J = 6.5$  Hz), 3.03 (1H, dd,  $J = 15.4, 5.1$  Hz), 3.43–3.49 (4H, m), 4.07 (1H, d,  $J = 10.3$  Hz), 5.26 (1H, q,  $J = 6.7$  Hz), 7.03–7.14 (1H, m), 7.28 (1H, d,  $J = 6.0$  Hz), 7.42 (1H, d,  $J = 7.0$  Hz), 8.22 (1H, s).

$^{13}\text{C}$  NMR (75.5 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  12.75, 26.95, 27.58, 33.37, 44.14, 50.48, 54.47, 55.85, 64.90, 104.52, 110.99, 116.84, 118.07, 119.35, 121.44, 127.59, 135.33, 136.33, 137.80.

##### 5.1.1.2 GC-MS analýza

EIMS ( $m/z$ ) 294 (84), 293 (85), 279 (10), 263 (30), 169 (100), 168 (79).

##### 5.1.1.3 Optická otáčavosť

Optická otáčavosť nebola z dôvodu rozkladu látky meraná.

## **5.2 Inhibičná aktivita izolovaného alkaloidu**

Inhibičná aktivita alkaloidu Normacusu B nebola meraná z dôvodu jeho rozkladu. Došlo ku kryštalizácii látky, aj keď na plynovom chromatografe a pri zkuškach v rôznych mobilných fázach sa javila látka ako čistá, no pri rozpúšťaní na NMR nebola táto čistota dostačujúca. Rozklad alkaloidu mohol byť spôsobený použitím nevhodného rozpúšťadla alebo spôsobom akým bol skladovaný.

## 6 DISKUSIA A ZÁVER

Rastlina *Geissospermum vellosii* Allemão bola vybratá pre túto prácu na základe screeningovej štúdie, v ktorej vykazovala zaujímavú inhibičnú aktivitu voči cholinesterázam. Stredná inhibičná aktivita predstavovala hodnoty  $15,19 \pm 0,96$   $\mu\text{g/ml}$  pre AChE a  $0,37 \pm 0,049$   $\mu\text{g/ml}$  pre BuChE.

Cieľom tejto práce bolo spracovanie rastlinného materiálu a to konkrétne kôry z *G. vellosii* do etherového a chloroformového alkaloidného výtrepku. Etherový výtrepok bol následne chromatograficky spracovaný do 272 frakcií, ktoré boli spojené do podfrakcií GV-1 až GV-16. Detekciou bola potvrdená prítomnosť alkaloidov za pomoci Dragendorffovho činidla. V rámci tejto diplomovej práce bola spracovaná podfrakcia GV-11 a to využitím metódy preparatívnej TLC. Na základe TLC bola vo frakcii potvrdená prítomnosť viacerých látok, ktoré vykazovali pozitívnu reakciu s Dragendorffovým činidlom. Z frakcie sa podarilo izolovať jeden alkaloid, ktorý bol identifikovaný na základe NMR a GC-MS analýzy. Získané výsledky boli porovnané s odbornou literatúrou a alkaloid bol určený ako Normacusin B. Z dôvodu rozkladu tejto látky neboli prevedené biologické testy a preto nebola meraná inhibičná aktivita voči AChE a BuChE. Dochádzalo ku kryštalizácii látky, aj keď sa najprv látka na plynovom chromatografe a pri zkušokách v rôznych mobilných fázach javila ako čistá, no napriek tomu čistota nebola dostačujúca pri rozpúšťaní na NMR, čo mohlo byť spôsobené skladovaním látky alebo použitím nevhodného rozpúšťadla. Dôvodom prečo dochádza k rozkladu alkaloidov je pôsobenie faktorov ako sú svetlo, teplo, kyslík, kyslé a zásadité prostredie, ktoré majú vplyv na ich stabilitu. Účinkom svetla a tepla v prostredí kyslíka dochádza u terciárnych amínových alkaloidov k premene na N-oxidy. Pôsobením kyselín za zvýšenej teploty môže dôjsť k dehydratácii za vzniku anhydro- alebo apo-alkaloidov a k hydrolýze esterových alkaloidov. Vplyvom zásad dochádza k tvorbe solí. Taktiež je známe, že sa u alkaloidov znižuje stabilita prevedením zo suchého stavu do roztoku.<sup>82</sup>

Normacusin B patrí medzi indolové alkaloidy, ktorého prítomnosť bola potvrdená vo viacerých rastlinách, konkrétne v *Strychnos potatorum* a *Strychnos atlantica*,<sup>83</sup> *Alstonia angustifolia*,<sup>84</sup> *Rauwolfia vomitoria*,<sup>85</sup> *Ervatamia hirta*,<sup>86</sup> *Aspidosperma pruinosum*<sup>87</sup> a v mnohých ďalších. U rastliny *Rauwolfia vomitoria*, bola

skúmaná aktivita Normacusu B voči AChE. Tento alkaloid vykazoval potencióálnu inhibičnú aktivitu voči AChE s hodnotou  $IC_{50} 186,62 \pm 31,71 \mu M$ .<sup>85</sup>

Z dôvodu nestability izolovaného Normacusu B nie možné určiť, či sa jedná o látku, ktorá by mohla vykazovať významnú inhibičnú aktivitu voči cholinesterázam a tým pádom nie je možné ani porovnať hodnoty získané v iných štúdiách.

## 7 LITERATÚRA

- <sup>1</sup> Volák J., Stodola J., Severa F. Veľká kniha liečivých rastlín. 1.vyd. Praha: Artia 1983, 319 s.
- <sup>2</sup> Mbeunkui F., Grace M. H., Lategan C., Smith P. J., Raskin I., Lila M. A. In vitro antiplasmodial activity of indole alkaloids from the stembark of *Geissospermum vellosii*. *J. of Ethnopharmacol.* 2012; 139, 471–477.
- <sup>3</sup> Sajkowska-Kozielewicz J. J., Gulik K., Makarova K., Paradowska K. Antioxidant Properties and Stability of *Geissospermum Reticulatum* Tinctures: Lag Phase ESR and Chemometric Analysis. *Acta physica polonica.* 2017; 132, 68-73.
- <sup>4</sup> Lima J. A., Costa R. S., Epifânio R. A., Castro N. G., Rocha M. S., Pinto A. C. *Geissospermum vellosii* stembark Anticholinesterase activity and improvement of scopolamine-induced memory deficits. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior.* 2009; 92, 508–513.
- <sup>5</sup> Li J. M., Huang Y. CH., Kuo Y. H., Cheng CH. CH., Kuan F. CH., Chang S. F., Lee Y. R., Chin CH. CH., Shi CH.S. Flavopereirine Suppresses the Growth of Colorectal Cancer Cells through P53 Signaling Dependence. *Cancers.* 2019; 11, 1-15.
- <sup>6</sup> Bhadane B. S., Patil M. P., Maheshwari V. L., Patil R. H. Ethnopharmacology, phytochemistry, and biotechnological. *Phytotherapy Research.* 2018; 32, 1181- 1210.
- <sup>7</sup> Jahodář, L. Farmakobotanika-semenné rostliny. Praha: Karolinum 2006, 258 s.
- <sup>8</sup> Islam M. S., Lucky R. A. A study on diferent plants of apocynaceae family and their medicinal uses. *Univer.I J. of Pharmaceutical Research.* 2019; 4, 42-46.
- <sup>9</sup> Falcão M. A., Scopel R., Almeida R.N., Espirito Santo A. D., Franceschini G., Garcez J. J., Vargas R. M. F., CasseL E. Supercritical fluid extraction of vinblastine from *Catharanthus roseus*. *The J. of Supercritical Fluids.* 2017; 129, 9-15.
- <sup>10</sup> Mustafa N. R., Verpoorte R. Phenolic compounds in *Catharanthus roseus*. *Phytochemistry Reviews.* 2007; 6, 243-258.

<sup>11</sup> Nejat N., Valdiani A., Cahill D., Tan Y., Maziah M., Abiri R. Ornamental Exterior versus Therapeutic Interior of Madagascar Periwinkle (*Catharanthus roseus*): The Two Faces of a Versatile Herb. *The Scientific World J.* 2015; 10, 1-15.

<sup>12</sup> Palem P. P. C., Kuriakose G. C., Jayabaskaran CH. An Endophytic Fungus, *Talaromyces radicus*,. *Plos one.* 2015; 10, 1-22.

<sup>13</sup><https://i.pinimg.com/> (**stiahnuté 14.4.2020**)

<sup>14</sup><https://botanical.com/botanical/> (**stiahnuté 14.4.2020**)

<sup>15</sup> Demessie Z., Woolfson K. N., Yu f., Qu F., Luca V. The ATP binding cassette transporter, VmTPT2/VmABCG1, is involved in export of the monoterpene indole alkaloid, vincamine in *Vincaminor* leaves. *Phytochemistry.* 2017; 140, 118-124.

<sup>16</sup> Zhang Y., Li j., Yan CH. An update on vinpocetine: New discoveries and clinical implications. *Eur. J. Pharmacol.* 2018; 819, 30-34.

<sup>17</sup> Zhao Y., Yang Z., Shang J., Huang W., Wang B., Wei X., Khan A., Yuan Z., Liu Y., Wang Y., Wang X., Luo X. Effects of indole alkaloids from leaf of *Alstonia scholaris* on post-infectious cough in mice. *J. of Ethnopharmacol.* 2018; 69-75.

<sup>18</sup> Yang J., Fu J., Liu X., Jiang Z., Zhu G. Monoterpene indole alkaloids from the leaves of *Alstonia scholaris* and their NF- $\kappa$ B inhibitory activity. *Fitoterapia.* 2018; 124, 73-79.

<sup>19</sup> Shang J., Cai X., Feng T., Zhao Y., Wang J., Zhang L., Yan M., Luo X. Pharmacological evaluation of *Alstonia scholaris*: Anti-inflammatory and analgesic effects. *J. of Ethnopharmacol.* 2010; 129, 174-181.

<sup>20</sup> <https://c8.alamy.com/comp/2A83F81/> (**stiahnuté 14.4.2020**)

<sup>21</sup> Yuwen H., Yuan Y., Hao X., He H., Zhang Y. Two new monoterpene indole alkaloids from *Tabernaemontana divaricata*. *Natural Product Research.* 2018; 10, 2139-2144.

<sup>22</sup> Khongsombat O., Nakdook W., Ingkaninan K. Inhibitory effects of *Tabernaemontana divaricata* root extract on oxidative stress and neuronal loss induced by amyloid  $\beta$ 25–35 peptide in mice. *Journal of Traditional and Complementary Medicine.* 2018; 8, 184-189.

- <sup>23</sup> Nakdook W., Khongsombat O., Taepavarapruk P., Taepavarapruk N., Ingkaninan K. The effects of *Tabernaemontana divaricata* root extract on amyloid  $\beta$ -peptide 25–35 peptides induced cognitive deficits in mice. *J. of Ethnopharmacol.* 2010; 130, 122-126.
- <sup>24</sup><https://d2seqvvy3b8p2.cloudfront.net/> (stiahnuté 14.4.2020)
- <sup>25</sup><https://image.shutterstock.com/z/> (stiahnuté 14.4.2020)
- <sup>26</sup> Yang Z., Duan D., Xue W., Yao X., Li S. Steroidal alkaloids from *Holarrhena antidysenterica* as acetylcholinesterase inhibitors and the investigation for structure–activity relationships. *Life Sciences.* 2010; 90, 229-233.
- <sup>27</sup> Lazzaro L., Sarracco E., Benesperi R., Coppi A. A probable anthropic origin of *Nerium oleander* L. (Apocynaceae) population in Montecristo island (Italy, Tuscany): evidence from loci polymorphism and ISSR analysis. *Caryologia.* 2017; 50-57.
- <sup>28</sup> Pillay v., Sasidharan A. Oleander and Datura Poisoning: An Update. *Indian J. of Critical Care Medicine.* 2019; 23, 250-255.
- <sup>29</sup> Balkan I. A., Doğan H. T., Zengin G., Colak N., Ayaz F. A., Gören A. C., Kırmızıbekmez H., Yeşilada E. Enzyme inhibitory and antioxidant activities of *Nerium oleander* L. flower extracts and activity guided isolation of the active components. *Industrial Crops and Products.* 2018; 112, 24-31.
- <sup>30</sup> Singhal K. G., Gupta G. D. Neuroprotective appraisal of methanolic extract of flowers of *Nerium oleander* in a no-cClassical rat model of Alzheimer disease. *Natural Products J.* 2012; 2, 235-245.
- <sup>31</sup> Anand, P., Singh, B. A review on cholinesterase inhibitors for Alzheimer’s disease. *Arch. Pharm.*, 2013; 36, 375–399.
- <sup>32</sup> Eddleston M., Ariaratnam C. A., Sjöström L., Jayalath S., Rajakanthan K., Rajapakse S. Acute yellow oleander (*Thevetia peruviana*). *Hearts.* 2000; 83, 301-306.
- <sup>33</sup> Bandara V., Weinstein S.A., White J., Eddleston M. A review of the natural history, toxinology, diagnosis and clinical management of *Nerium oleander* (common oleander) and *Thevetia peruviana* (yellow oleander) poisoning. *Toxicon.* 2010; 56, 273-281.



- <sup>34</sup> Kohls S., Scholz-Böttcher B. M., Teske J., Zark P., Rullkötter J. Cardiac glycosides from Yellow Oleander (*Thevetia peruviana*) seeds. *Phytochemistry*. 2012; 75, 114-127.
- <sup>35</sup> Barbon T. C., Silva P. C., Sampaio S. V., Baldo M. A. 164. Evaluation of Anticancer Activity Promoted by Molecules Contained in the Extracts of *Thevetia peruviana*. *Toxicon*. 2012; 60, 179-180.
- <sup>36</sup><https://www.mediastorehouse.com/pimage/617/9497661/> (stiahnuté 14.4.2020)
- <sup>37</sup><https://i.pinimg.com/originals/> (stiahnuté 14.4.2020)
- <sup>38</sup> Monnerat C. S., Souza J. J., Mathias L., Braz-Filho F., Vieira I. J. A New Indole Alkaloid Isolated from *Tabernaemontana hystrix* Steud (Apocynaceae). *J. Braz. Chem. Soc.* 2005; 16, 1331-1335.
- <sup>39</sup> O'Connor S. E., Maresh J. J. Chemistry and biology of monoterpeneindole alkaloid biosynthesis. *Nat. Prod. Rep.* 2006; 23, 532–547.
- <sup>40</sup> Hamid H. A., Ramli A. N. M., Mashitah M. Y. Indole Alkaloids from Plants as Potential Leads for Antidepressant Drugs: A Mini Review. *Frontiers in Pharmacology*. 2017; 8, 1-7.
- <sup>41</sup> Rosales P. F., Bordin G. S., Gower A. E., Moura S. Indole alkaloids: 2012 until now, highlighting the new chemical structures and biological activities. *Fitoterapia*. 2020; 143, 1-26.
- <sup>42</sup> Evans W. C., Trease G. Trease and Evans' *Pharmacognosy*. 16.Edition: W.B.Saunders, 2009, 616 s.
- <sup>43</sup> Spilková J., Martin J., Siatka T., Tůmová L., Kašparová M. *Farmakognozie*. Praha: Univerzita Karlova Nakladatelství Karolinum 2016, 346 s.
- <sup>44</sup> Kotzamani A., Vasilakoglou I., Dhima K., Moulas A. N., Vaiou M., Stefanou S. Impact of Soil Salinity on Barley Allelopathic Potential and Main Secondary Metabolites Gramine and Hordenine. *J. of Plant Growth Regulation*. 2020; 57, 1-10.
- <sup>45</sup> McClean S., Robinson R. C., Shaw CH., Smyth W. F. Characterisation and determination of indole alkaloids in frog-skin secretions by electrospray ionisation

ion trap mass spectrometry. *Rapid communications in mass spectrometry*. 2002; 16, 346-354.

<sup>46</sup> Spain A., Howarth C., Khrapitchev A., Sharp T., Sibson N. R., Martin CH. Neurovascular and neuroimaging effects of the hallucinogenic serotonin receptor agonist psilocin in the rat brain. *Neuropharmacology*. 2015; 99, 210-220.

<sup>47</sup> Zhao B., Moochhala S. M., Tham S.Y. Biologically active components of *Physostigma venenosum*. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2004; 812, 183-192.

<sup>48</sup> Yonezawa T., Hasegawa S., Asai M., Ninomiya T., Sasaki T., Cha B. Y., Teruya T., Ozawa H., Yagasaki K., Nagai K., Woo J. T. Harmine, a  $\beta$ -carboline alkaloid, inhibits osteoclast differentiation and bone resorption in vitro and in vivo. *Eur. J. Pharmacol*. 2011; 650, 511-518.

<sup>49</sup> Wang K., Hu X., Li S., Li X., Li D., Bai J., Pei Y., Li Z., Hua H. Racemic indole alkaloids from the seeds of *Peganum harmala*. *Fitoterapia*. 2018; 125, 55-160.

<sup>50</sup> Soulimani R., Younos CH., Jarmouni S., Bousta D., Misslin R., Mortier F. Behavioural effects of *Passiflora incarnata* L. and its indole alkaloid and flavonoid derivatives and maltol in the mouse. *J. of Ethnopharmacol*. 1997; 57, 11-20.

<sup>51</sup> Kumar S., Singh A., Kumar B. Screening of monoterpene indole alkaloids in six *Rauwolfia* species by ultra-high performance liquid chromatography-orbitrap velocity mass spectrometer. *Sep Sci plus*. 2019; 2, 300-308.

<sup>52</sup> Kumar S., Singh A., Bajpai V., Srivastava M., Singh B. P., Kumar B. Structural characterization of monoterpene indole alkaloids in ethanolic extracts of *Rauwolfia* species by liquid chromatography with quadrupole-time-of-flight mass spectrometry. *J. of Pharmaceutical Analysis*. 2016; 6, 363-373.

<sup>53</sup> Chen Q., Li P., Zhang Z., Li K., Liu J., Li Q. Analysis of yohimbine alkaloid from *Pausinystalia yohimbe* by non-aqueous capillary electrophoresis and gas chromatography-mass spectrometry. *J. of separation science*. 2008; 31, 2211–2218.

<sup>54</sup> Wallwey CH., Li S. M. Ergot alkaloids: structure diversity, biosynthetic gene clusters and functional proof of biosynthetic genes. *Natural Product Reports*. 2010; 28, 496-510.

<sup>55</sup> Chen J. J., Han M. Y., Gong T., Yang J. L., Zhu P. Recent progress in ergot alkaloid research. *RSC Advances*. 2017; 7, 27384–27396.

<sup>56</sup><https://media.springernature.com/lw785/springerstatic/image/>(**stiahnuté 8.4.2020**)

<sup>57</sup> Liu H., Jia Y. Ergot alkaloids: synthetic approaches to lysergic acid and clavine alkaloids. *Natural Product Reports*. 2017; 34, 411–432.

<sup>58</sup> Zhao N., Li L., Liu J., Zhuang P., Yu S., Ma S., Qu J., Chen N., Wu L. New alkaloids from the seeds of *Strychnos nux-vomica*. *Tetrahedron*. 2012; 68, 3288-3294.

<sup>59</sup> Li Y., He W., Qi S., Gao W., Chen X., Hu Z. Separation and determination of strychnine and brucine in *Strychnos nux-vomica* L. and its preparation by nonaqueous capillary electrophoresis. *Jl of Pharmac. and Biomedical Analys.* 2006; 41, 400-407.

<sup>60</sup> Fan Y., Liu S., Chen X., Feng M., Song F., Gao X. Toxicological effects of *Nux Vomica* in rats urine and serum by means of clinical chemistry, histopathology and <sup>1</sup>H NMR-based metabonomics approach. *J. of Ethnopharmacol.* 2018; 210, 242-253.

<sup>61</sup> <https://www.gbif.org/species/> (**stiahnuté 20.1.2020**)

<sup>62</sup><https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/d/d9/> (**stiahnuté 15.4.2020**)

<sup>63</sup> Camargo M. R. M., Amorim R. C. A., Silva L. F. R., Carneiro A. L. B., Vital M. J. S., Pohlit A. M. Chemical composition, ethnopharmacology and biological activity of *Geissospermum Allemão* species (Apocynaceae Juss.). *QuímiCA*. 2013; 8, 73-160.

<sup>64</sup> Silva E Silva J.V., Cordovil Brigido H.P., Oliveira de Albuquerque K.C., Flavopereirine—An Alkaloid Derived from *Geissospermum vellosii*—Presents Leishmanicidal Activity In Vitro. *Molecules*. 2019; 24, 1-13.

<sup>65</sup> Araújo J. Q., Lima J. A., Cunha Pinto A., Alencastro R. B., Albuquerque M. G. Docking of the alkaloid geissospermine into acetylcholinesterase: a natural scaffold targeting the treatment of Alzheimer's disease. *J. of Molecular Modeling*. 2011; 17, 1401–1412.

- <sup>66</sup> Kulichová M. Bolest—definícia, patofyziológia. *Paliatívna medicína a liečba bolesti*. 2008; 3, 109-111.
- <sup>67</sup> Patarák M. Antinociceptívny efekt venlafaxínu. *Psychiatria pre prax*. 2010; 4, 112-114.
- <sup>68</sup> Werner J. A. T., Oliveira S. M., Martins D. F., Mazzardo L., Dias J. F. G., Lordello A. L., Miguel O. G., Royes L. F., Ferreira J., Santos A. R. S. Evidence for a role of 5-HT<sub>1A</sub> receptor on antinociceptive action from *Geissospermum vellosii*. *J. of Ethnopharmacol.* 2009; 125, 163–169.
- <sup>69</sup> Blažejová R., Hošek J. Liečivá rastlinného pôvodu a ich využitie v terapii onkologických. *Česká a slovenská farmacie*. 2019; 68, 3–11.
- <sup>70</sup> Matos M. B., Barbosa L. E., Teixeira J. P. Narrative review comparing the epidemiology, characteristics and survival in sporadic colorectal carcinoma/Lynchsyndrome. *J. of Coloproctology*. 2020; 40, 73-78.
- <sup>71</sup> Xu L., Su T., Xu X., Zhu L., Shi L. Platelets membrane camouflaged irinotecan-loaded gelatin nanogels for in vivo colorectal carcinoma therapy. *J. of Drug Delivery Science and Technol.* 2019; 53, 101-190.
- <sup>72</sup> Hughes N. A., Rapoport H. Flavopereirine, an Alkaloids from *Geissospermum vellosii*. *J. Am. Chem. Soc.* 1958; 80, 1604–1609.
- <sup>73</sup> Vogelstein B., Lane D., Levine A. J. Surfing the p53 network. *Nature*. 2000; 408, 307-310.
- <sup>74</sup> Ge R., Wang Z., Montironi R., Jiang Z., Cheng M., Santoni M., Huang K., Massari F., Lu X., Cimadamore A., Lopez-Beltran A., Cheng L.. Epigenetic modulations and lineage plasticity in advanced prostate cancer. *Annals of Oncology*. 2020; 31, 470-479.
- <sup>75</sup> Liu J., Fang T., Li M., Song Y., Li J., Xue Z., Li J., Bu D., Li W., Zeng Q., Zhang Y., Yun S., Huang R., Yan J. Pao Pereira Extract Attenuates Testosterone-Induced Benign Prostatic Hyperplasia in Rats by inhibiting 5 $\alpha$ -Reductase. *Scientific Reports*. 2019; 9, 1-10.

- <sup>76</sup> Chang C., Zhao W., Xie B. Pao Pereira Extract Suppresses Castration-Resistant Prostate Cancer Cell Growth, Survival, and Invasion Through Inhibition of NFκB Signaling. *Integrative Cancer Therapies*. 2014; 13, 249 –258.
- <sup>77</sup> Meng A., Liu L., Chin P. C., D’Mello S. R. Akt Is a Downstream Target of NF-Kb. *The j. of biological chcemistry*. 2002; 277, 29674 –29680.
- <sup>78</sup> Lorenzo G., Hughes T. J. R., Reali A., Gomez A. A numerical simulation study of the dual role of 5α-reductaseinhibitors on tumor growth in prostates enlarged by benign prostatichyperplasia via stress relaxation and apoptosis upregulation. *Comput. Methods Appl. Mech. Engrg*. 2020; 362, 1-21.
- <sup>79</sup> Jiráček R. Diagnostika a terapie Alzheimerovy choroby. *Neurol. Prax*. 2008; 4, 224-227.
- <sup>80</sup> Hroudová J. Výzkum nových léčiv u Alzheimerovy choroby. *Psychiatria pre prax*. 2018; 2, 74-77.
- <sup>81</sup> Stambolic V., Woodgett J. R. Mitogen inactivation of glycogen synthase kinase-3 beta in intact cells via serine 9 phosphorylation. *Biochem.J*. 1994; 303, 701-704.
- <sup>82</sup> Svendsen B., Verpoorte R. Chapter 4 Isolation of Alkaloids. *J. of Chromatography Library*. 1983; 23, 51-58.
- <sup>83</sup> Massiot G., Thepenier P., Jacquier M. J., Le Men-Olivier L., Delaude C. Alkaloids from roots of *Strychnos potatorum*. *Phytochemistry*. 1992; 31, 2873-2876.
- <sup>84</sup> Ghedira K., Zeches-Hanrot M., Richard B. Alkaloids of *Alstonia angustifolia*. *Phytochemistry*. 1988; 27, 3955-3962.
- <sup>85</sup> Guanqun Z., Rongkun M., Fuxin Z., Gang Ch., Lei Z., Xinxin Z., Hui Z. Monoterpene indole alkaloids with acetylcholinesterase inhibitory activity from the leaves of *Rauvolfia vomitoria*. *Bioorganic Chemistry*. 2020; 102, 104-136.
- <sup>86</sup> Pascale C., Richard B., Deverrea J., Alkaloids from leaves and root bark of *Ervatamia hirta*. *Phytochemistry*. 1991; 31, 3785-3792.
- <sup>87</sup> Taveira J., Nunes D., Franciscode K., ReisIndole K. Alkaloids from *Aspidosperma pruinosum*. *Phytochemistry*. 1992; 31, 2507-2511.

## 8 ABSTRAKT

Buláková, A: Izolácia alkaloidov druhu *Geissospermum vellosii* Alemão a štúdium ich biologickej aktivity I. Diplomová práca, Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra farmakognozie, Hradec Králové, 2020.

Kľúčové slová: *Geissospermum vellosii*, kôra, alkaloidné extrakty, izolácia alkaloidov, GC-MS analýza, biologická aktivita, acetylcholinesteráza, butyrylcholinesteráza.

*Geissospermum vellosii*, je rastlina patriaca do čeľade Apocynaceae, ktorej kôra sa vyznačuje obsahom indolových alkaloidov, ktoré môžu pôsobiť aj ako inhibítory acetylcholinesterázy.

Cieľom tejto práce bolo spracovanie rastlinného materiálu získaného z rastliny *Geissospermum vellosii* a príprava éterového a chloroformového alkaloidného výtrepku. Éterový výtrepok bol ďalej spracovaný stĺpcovou chromatografiou do podfrakcií GV-1 až GV-16.

Využitím preparatívnej TLC metódy bola spracovaná podfrakcia GV-11, z ktorej bola izolovaná jedna látka alkaloidnej povahy. Jej štruktúra bola určená na základe GC-MS a NMR analýzy a po porovnaní získaných údajov s literatúrou bola látka identifikovaná ako Normacusin B. Získaná látka bola nestabilnej povahy a preto u nej nemohla byť skúmaná biologická aktivita voči AChE a BuChE.

Z dôvodu nestability získanej látky nie je možné určiť či sa jedná o látku, ktorá by mohla vykazovať významnú inhibičnú aktivitu voči cholinesterázam.

## 9 ABSTRACT

Buláková, A: Isolation of alkaloids of the species *Geissospermum vellosii* Allemão and study of their biological activity I. Diploma thesis, Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Department of Pharmacognosy, Hradec Králové, 2020.

Key words: *Geissospermum vellosii*, bark, alkaloidal extracts, isolation of alkaloids, GC/MS analysis, biological activity, acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase.

*Geissospermum vellosii* as a plant belongs to the Apocynaceae family, whose bark is characterized by the content of indole alkaloids, which can also act as acetylcholinesterase inhibitors.

The aim of this thesis was to process the pool of ethereal and chloroformic alkaloids from the plant *Geissospermum vellosii*. By means of column chromatography, the ethereal pool was processed into subfractions GV-1 to GV-16.

Taking advantage of preparational method TLC, the subfraction GV-11 was processed, of which one alkaloid-based substance was isolated. Its structure was determined based on GC-MS and NMR analysis and after comparing obtained data with the literature, the substance was identified as Normacusin B. The substance, we extracted, was of unstable nature and because of that, we could not research its biological activity further in relation to AChE and BuChE.

Due to the unstable nature of said substance, it was not possible to determine, whether it can emanate potential inhibitory activity towards cholinesterases.