

UNIVERZITA KARLOVA

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA FARMAKOGNOZIE A FARMACEUTICKÉ BOTANIKY



DIPLOMOVÁ PRÁCE

Izolace alkaloidů druhu *Geissospermum vellosii* Allemão a studium jejich
biologické aktivity VI.

Autor práce: Lucie Váňová

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

HRADEC KRÁLOVÉ, KVĚTEN 2022

CHARLES UNIVERSITY

FACULTY OF PHARMACY IN HRADEC KRÁLOVÉ

DEPARTMENT OF PHARMACOGNOSY AND PHARMACEUTICAL BOTANY



DIPLOMA THESIS

**Isolation of alkaloids of the species *Geissospermum vellosii* Allemão
and study of their biological activity VI.**

Author of work: Lucie Váňová

Head of diploma work: PharmDr. Marcela Šafratová, Ph.D.

HRADEC KRÁLOVÉ, MAY 2022

Prohlášení

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně, pod vedením PharmDr. Marcely Šafratové, Ph.D.. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

V Hradci Králové, 2022

.....

Podpis

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala své vedoucí diplomové práce PharmDr. Marcele Šafratové, Ph.D. za odborné vedení, ochotu a trpělivost v průběhu práce na experimentální části v laboratoři a za pomoc a cenné rady při zpracování této diplomové práce. Dále děkuji PharmDr. Daniele Hulcové, Ph.D. za pomoc a rady při práci v laboratoři. Děkuji také ostatním pracovníkům kateder Farmaceutické fakulty, kteří se podíleli na měření a identifikaci izolovaných alkaloidů.

Tato práce vznikla za finanční podpory projektu Specifického vysokoškolského programu SVV 260 550.

Obsah

Seznam zkratk.....	7
Seznam obrázků	9
Seznam tabulek	9
1 Úvod	10
2 Cíl diplomové práce	12
3 Teoretická část	13
3.1 <i>Geissospermum vellosii</i> Allemão	13
3.1.1 Apocynaceae Amazonského pralesa	13
3.1.2 Taxonomické rozdělení <i>Geissospermum vellosii</i> Allemão	14
3.1.3 Výskyt a botanické aspekty	14
3.1.4 Využití	15
3.2 Indolové alkaloidy.....	16
3.3 Obsahové látky izolované z <i>Geissospermum vellosii</i> Allemão.....	18
3.3.1 Alkaloidy izolované z <i>Geissospermum vellosii</i> Allemão.....	18
3.3.2 Látky nepříslušící do skupiny alkaloidů	26
3.4 Alzheimerova choroba	28
3.4.1 Epidemiologie	28
3.4.2 Rizikové faktory	29
3.4.3 Příznaky a stádia onemocnění.....	29
3.4.4 Etiopatogeneze.....	30
3.4.5 Terapie Alzheimerovy choroby.....	40
4 Experimentální část	43
4.1 Materiál a vybavení	43
4.1.1 Rozpouštědla a chemikálie	43
4.1.2 Chromatografické adsorbenty.....	43
4.1.3 Pomocný materiál	43
4.1.4 Mobilní fáze pro tenkovrstvou chromatografii	44
4.1.5 Přístroje	44
4.1.6 Detekční činidla	44
4.2 Obecné postupy	45
4.2.1 Příprava a uchování rozpouštědel	45
4.2.2 Příprava litých desek pro preparativní TLC.....	45
4.2.3 Nános vzorku a preparativní tenkovrstvá chromatografie	45
4.2.4 Detekce alkaloidů pod UV lampou	45
4.2.5 Eluce	46

4.2.6	Odpařování.....	46
4.2.7	Sušení a skladování.....	46
4.2.8	Strukturní analýza.....	46
4.3	Stanovení biologické aktivity.....	48
4.3.1	Chemikálie.....	48
4.3.2	Přístroje pro stanovení inhibiční aktivity vůči <i>hAChE</i> a <i>hBuChE</i>	48
4.3.3	Činidla pro stanovení inhibiční aktivity vůči <i>hAChE</i> a <i>hBuChE</i>	48
4.3.4	Příprava rekombinantních enzymů.....	49
4.3.5	Vlastní stanovení inhibiční aktivity izolovaných alkaloidů.....	49
4.4	Izolace.....	50
4.4.1	Rostlinný materiál.....	50
4.4.2	Preparativní tenkovrstvá chromatografie.....	50
5	Výsledky.....	56
5.1	GV-5-B-3-A — (+)-19,20-dehydrotubifolidin.....	56
5.1.1	NMR analýza.....	56
5.1.2	GC-MS analýza.....	56
5.1.3	Otická otáčivost.....	56
5.2	GV-5-C-2-B-1 — Geissoreticulatin.....	57
5.2.1	NMR analýza.....	57
5.2.2	MS analýza.....	57
5.2.3	Otická otáčivost.....	57
5.3	GV-5-C-4-C — Aspidolimidin.....	58
5.3.1	NMR analýza.....	58
5.3.2	GC-MS analýza.....	58
5.3.3	Otická otáčivost.....	58
5.4	Biologická aktivita izolovaných alkaloidů.....	59
6	Diskuze a závěr.....	60
7	Abstrakt.....	63
8	Abstract.....	64
9	Literatura.....	65

Seznam zkratek

Acetyl-CoA	Acetyl koenzym A
ACh	Acetylcholin
AChE	Acetylcholinesterasa
A β	Amyloid β
β AP	β -amyloidní plaky
AChE-A β	Komplex acetylcholinesterasy-amyloidu β
APP	Amyloid prekursorový protein
BACE-1	Beta sekretasa 1
BuChE	Butyrylcholinesterasa
CDK	Cyklin dependentní kinasa
CNS	Centrální nervový systém
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
GABA	Kyselina γ -aminomáselná
GC-MS	Plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií
GSK-3	Glykogen synthasa kinasa 3
GV	<i>Geissospermum vellozii</i>
HIV	Virus lidské imunodeficiency
5-HT receptor	5-hydroxytryptaminový receptor
IC	Inhibiční koncentrace
IL	Interleukin
LPS	Lipopolysacharid
M receptor	Muskarinový receptor
NF- κ B	Nukleární faktor kappa B
NMDA receptor	N-methyl-D-aspartátový receptor
NMR	Nukleární magnetická rezonance
N receptor	Nikotinový receptor
PAS	Periferní aniontové místo
PKC	Protein kinasa C
TLC	Tenkovrstvá chromatografie

TNF	Tumor nekrotizující faktor
-----	----------------------------

Seznam obrázků

Obrázek 1: 1. Listy, 2. kmen, 3. koruna stromu <i>Geissospermum vellosii</i> Allemão [16]	15
Obrázek 2: Biosyntéza β -karbolinových alkaloidů [34]	17
Obrázek 3: Aspidospermin [35]	18
Obrázek 4: Flavopereirin [35]	19
Obrázek 5: Geissolosimin [35]	20
Obrázek 6: Geissoschizon [35]	21
Obrázek 7: Geissoschizolin [35]	21
Obrázek 8: Geissospermin [35]	22
Obrázek 9: 12-methoxy-1-methyl-aspidospermidin [35]	23
Obrázek 10: Vellosiminol [35]	24
Obrázek 11: Sesamin [35]	26
Obrázek 12: Lupeol [35]	27
Obrázek 13: Role cholinergních receptorů v rámci patogeneze Alzheimerovy choroby [67]	36
Obrázek 14: Souhrn působení GSK-3 v rámci patogeneze Alzheimerovy choroby [71]	39
Obrázek 15: Patologická aktivita CDK-5 při konverzi p35 na p25 [72]	40
Obrázek 16: Souhrnné TLC frakcí GV po detekci Dragendorffovým činidlem	51
Obrázek 17: TLC všech podfrakcí GV-5 v S 1	52
Obrázek 18: Strukturní vzorec (+)-19,20-dehydrotubifolidinu	56
Obrázek 19: Strukturní vzorec geissoreticulatinu	57
Obrázek 20: Strukturní vzorec aspidolimidinu	58

Seznam tabulek

Tabulka 1: Taxonomické rozdělení <i>Geissospermum vellosii</i> Allemão [12, 1]	14
Tabulka 2: Alkaloidy <i>Geissospermum vellosii</i> Allemão [35]	25
Tabulka 3: Mobilní fáze pro tenkovrstvou chromatografii	44
Tabulka 4: Hmotnosti frakcí GV-5-A až GV-5-I	52
Tabulka 5: Hmotnosti podfrakcí GV-5-B	53
Tabulka 6: Hmotnosti podfrakcí GV-5-C	54
Tabulka 7: Hmotnosti podfrakcí GV-5-C-2	54
Tabulka 8: Hmotnosti podfrakcí GV-5-C-4	55
Tabulka 9: Porovnání inhibiční aktivity izolovaných alkaloidů	59

1 Úvod

Rostlinná říše je nezměrným zdrojem organických látek různé chemické struktury a biologické aktivity. V mnoha kulturách, nacházejících se v různých koutech světa, je užívání samotných rostlin, nebo jejich výtažků, prostředkem tradiční medicíny. Díky znalostem, které jsou předávány po generace, jsme dnes schopni selektovat ty, u nichž existuje větší pravděpodobnost nalezení vhodného léku pro konkrétní symptomy nebo onemocnění. Pomocí fytochemických a na ně navazujících farmakologických studií je poté možné identifikovat příslušného nositele těchto vlastností.

V této diplomové práci jsem se snažila izolovat obsahové látky, a to konkrétně alkaloidy ze stromu *Geissospermum vellosii* (GV) Allemão, pocházejícího z Amazonského tropického deštného pralesa. Jelikož se v kůře tohoto stromu již v minulosti našla řada látek vykazující farmakoterapeuticky zajímavou biologickou aktivitu, je zde snaha o pokračování v izolaci látek dalších. [1] V případě této diplomové práce, pak jejich testování na možné využití ve farmakoterapii Alzheimerovy choroby.

Toto téma jsem si vybrala z důvodu aktuálnosti dané problematiky. S neustále rostoucí populací vzrůstá i počet lidí trpících chorobami spojenými se stářím. K nim se řadí i Alzheimerova choroba, typ demence spjatý s negativním dopadem jak na postiženou osobu, tak i na její okolí. Toto onemocnění nelze, na rozdíl od mnoha dalších, skrýt. Kromě toho, projevy s ním spojené mají velký sociální i ekonomický dopad. Bohužel, v dnešní době není portfolio farmak k léčbě Alzheimerovy choroby příliš široké a k dlouhodobému zvládnutí projevujících se symptomů ani příliš účinné. Časem tak, přes z počátku pozitivní farmakoterapeutickou odezvu, dochází k nevratnému zhoršení symptomů specifických pro tuto chorobu. Jejich přítomnost postupně zbavuje danou osobu soběstačnosti, což prohlubuje ztrátu lidské důstojnosti nemocného. Porucha paměti dokonce dokáže nejen zbavit danou osobu schopnosti orientovat se v čase a prostoru, ale také nemocného izolovat od svých bližních. Zhoršená kvalita života, kterou tato nemoc přináší a fakt, že její přítomnost v lidské populaci je dle Světové zdravotnické organizace na vzestupu, dala podnět mnoha vědcům k hledání jak cílů farmakoterapie, tak i látek, které by se k ní daly využít. Jeden z těchto cílů představují cholinesterasy, enzymy uplatňující se v degradaci důležitého neurotransmiteru acetylcholinu (ACh), jehož deplece hraje v patofyziologii dané nemoci významnou roli. [2, 3]

Izolované alkaloidy byly, na základě dříve získaných informací o účincích dané rostliny, v této práci podrobeny testování inhibiční aktivity vůči acetylcholinesterase (AChE) a butyrylcholinesterase (BuChE). Jelikož se v současné medicíně užívají léčiva na principu inhibice těchto enzymů, je již účinnost léčby při využití tohoto cíle prokázána. Stále je však snaha o nalezení bezpečnějšího a účinnějšího léčiva, a tak se zde nabízí prostor pro jeho hledání v rostlinné říši.

2 Cíl diplomové práce

1. Izolace alespoň tří alkaloidů v čisté formě z frakce GV-5 z alkaloidního extraktu kůry *Geissospermum vellosii* Allemão pomocí tenkovrstvé chromatografie (TLC) a rekrytalizace
2. Podílení se na identifikaci izolovaných alkaloidů pomocí plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií (GS-MS) a nukleární magnetické rezonance (NMR) analýzy a porovnání s literaturou
3. Stanovení biologické aktivity izolovaných látek: určení inhibiční aktivity vůči AChE a BuChE
4. Teoretické zpracování tématu
5. Vyhodnocení výsledků

3 Teoretická část

3.1 *Geissospermum vellosii* Allemão

3.1.1 Apocynaceae Amazonského pralesa

Apocynaceae (toješťovité) představují velmi rozsáhlou čeleď krytosemenných rostlin, čítající přibližně 5100 druhů patřících do 360 rodů. Vytrvalé byliny, polokeře, keře, stromy a někdy také liány lze nalézt v tropických i subtropických oblastech zeměkoule, výjimkou však není ani jejich přítomnost v oblastech mírného pásma. [4, 5]

Amazonský tropický deštný prales je bohatým zdrojem rostlin, které mohou sloužit pro izolaci látek s potencionálně léčivým účinkem. U řady izolovaných látek z různých rostlinných druhů probíhá testování biologické aktivity ve snaze získat konkrétní metabolity či vzory, jejichž struktury bude možno obměnit za účelem dosažení více aktivních látek. [6]

V Amazonském pralesu lze nalézt přibližně 234 druhů čeledi Apocynaceae [4]. Jako názorný příklad lze uvést rostlinu *Himatanthus sucuuba*, *Aspidosperma subincanum* nebo *Tabernaemontana sananho* [7, 8, 9].

Himatanthus sucuuba, až 30 metrů dorůstající strom, je zkoumán pro své antibakteriální, analgetické a protizánětlivé účinky. Jeho obsahové látky jsou však zajímavé i pro jejich nemalý potenciál k uplatnění v léčbě leishmaniózy (např. iridoid plumericin vykazuje významnou aktivitu proti axenickým amastigotům *Leishmania amazoniensis* s $IC_{50} = 0,21 \mu M$) nebo inhibiční působení na nádorové buňky. [7, 10]

Podobnými účinky se vyznačuje i další rostlina, která se v Jižní Americe využívá v tradiční medicíně. ***Aspidosperma subincanum***, kolem 20 metrů vysoký strom, někdy nazýván Carapanaúba (komáří strom), u kterého, kromě cytotoxického působení některých izolovaných látek (např. alkaloidu ellipticinu s $IC_{50} = 0,67 \pm 0,06 \mu M$ proti buněčné linii leukémie HL-60), byla zaznamenána také aktivita diuretická. Ta byla pozorována na zvířecích modelech (krysách) pomocí orálně aplikovaného ethanolického extraktu kůry (kumulativní exkrece moči byla signifikantní, kdy při 120 mg/kg tvořila $10 \pm 0,9$ ml s větší exkrecí Na^+ než K^+). [8]

Strom malého vzrůstu, ***Tabernaemontana sananho***, také někdy nazýván domorodým obyvatelstvem Sikta, je již dlouhá léta prostředkem tradiční medicíny komunity Kichwa z Pakayaku, sídlící v Ekvádoru. Díky tomu vznikla snaha o izolaci obsahových látek,

kteře jsou zodpovědné za příslušné léčivé vlastnosti. Jednou z nich se stal například indolový alkaloid, coronaridin, vykazující analgetickou či antiparazitickou aktivitu. [9]

V neposlední řadě je nutné zmínit rod *Geissospermum*, čítající přibližně 12 druhů, z nichž již několik bylo podrobenu bližšímu zkoumání biologické aktivity. Jedná se například o druh *G. argenteum*, *G. fuscum*, *G. reticulatum*, *G. sericeum*, *G. urceolatum* a také *G. leave* (*G. vellosii*), který je předmětem této diplomové práce. [11]

3.1.2 Taxonomické rozdělení *Geissospermum vellosii* Allemão

	LATINSKY	ČESKY
ŘÍŠE	Plantae	Rostliny
PODŘÍŠE	Streptophyta	Streptofyty
ODDĚLENÍ	Tracheophyta	Cévnaté
PODODDĚLENÍ	Spermatophytina	Semenné
PODODDĚLENÍ	Angiospermae	Krytosemenné
TŘÍDA	Magnoliopsida	Dvouděložné
ŘÁD	Gentianales	Hořcotvaré
ČELEĎ	Apocynaceae	Toješťovité
ROD	<i>Geissospermum</i>	<i>Geissospermum</i>
DRUH	<i>Geissospermum vellosii</i> Allemão	<i>Geissospermum vellosii</i> Allemão

Tabulka 1: Taxonomické rozdělení *Geissospermum vellosii* Allemão [12, 1]

3.1.3 Výskyt a botanické aspekty

Geissospermum vellosii Allemão [syn.: *Geissospermum laeve*], někdy také známý pod názvy Pao Pereira, Pao-de-penta, Quinarana („falešný chinin“), Triguaaba či Pinguaciba, je jedním z druhů rodu *Geissospermum* [1, 13]. Tento stálezelený, až 30 metrů vysoký strom, pochází ze severní části Jižní Ameriky [14]. Zde ho lze nalézt v Amazonském pralese na slunných či polostinných místech ve státech jako je Bolívie, Ekvádor, Peru, Venezuela, Guayana, Surinam, Francouzská Guayana, přestože původem je přisuzován hlavně Brazílii [1, 15].

Tato dřevina, disponující větvemi se střídavě postavenými listy, se stala středem zájmu mnoha vědeckých pracovníků pro biologicky zajímavé obsahové látky, které lze získat z její zvrásněné hnědožluté kůry (Obr.1). [1]



Obrázek 1: 1. Listy, 2. kmen, 3. koruna stromu *Geissospermum vellosii* Allemão [16]

3.1.4 Využití

Kůra kmene tohoto stromu našla již dříve využití pro své léčivé vlastnosti v tradiční medicíně domorodého obyvatelstva. To z ní připravovalo odvar ve vodě (používáno ve státech: Brazílie, Guyana, Surinam). V jiných částech Jižní Ameriky z ní připravovali alkoholickou tinkturu (využíváno v oblastech Francouzské Guyany). [17] Stala se tak prostředkem k léčbě horečky, malárie, žaludečních potíží, zácpy, jaterních problémů, ale našla také uplatnění při léčbě bolesti nebo jako afrodiziakum. Při léčbě zažívacích potíží a ztráty apetitu mohla sehrát roli

i její velmi hořká chuť, kterou se tato rostlina vyznačuje. [1] V praxi se v tradiční medicíně na léčbu malárie, zvracení a na bolest jater používá 500 g nastrouhané kůry kmene. Ta se má vařit 15 minut ve 2 litrech vody a následně se podává 1 šálek 2× denně do vymizení příznaků. [18]

Hlavní obsahové látky, které byly z GV izolovány, a ve vědeckých studiích projevují významnou biologickou aktivitu vůči mnoha patofyziologickým procesům živočišných organismů, se řadí především do skupiny alkaloidů. Významnou skupinu aktivních látek této rostliny představují indolové alkaloidy β -karbolinového typu. [1, 13]

3.2 Indolové alkaloidy

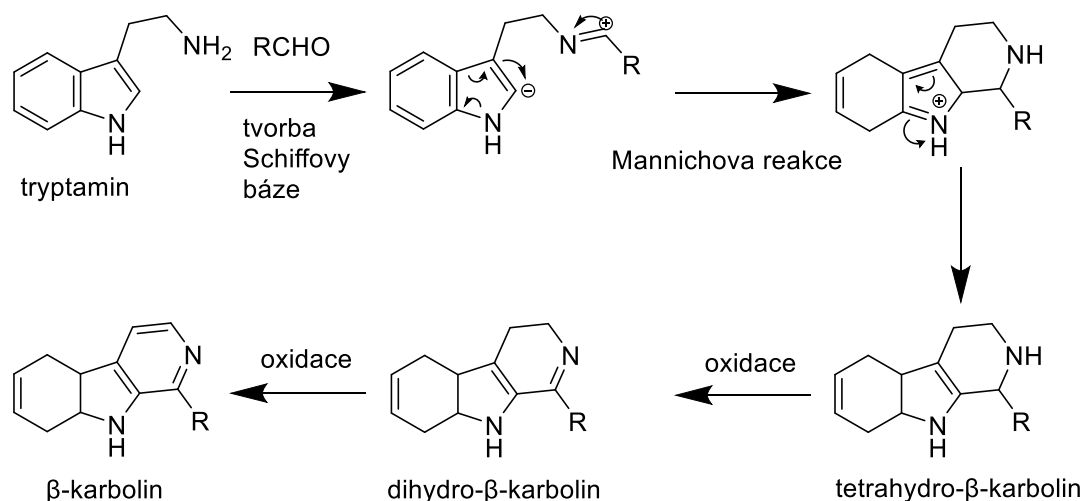
Indolové alkaloidy představují početnou skupinu přírodních látek, které lze nalézt nejen v suchozemských rostlinách, ale jejich zástupce je možno hledat i v organismech moří a oceánů, jako jsou někteří příslušníci pláštěnců, červených řas či houbovců [19, 20]. V rostlinné říši se nacházejí v zástupcích čeledí Apocynaceae, Rubiaceae, Nyssaceae, Loganiaceae, ale také v mnoha dalších [20].

Již bylo popsáno přes tisíc různých indolových alkaloidů a mnoho z nich vykázalo při testování jejich biologické aktivity významnou účinnost při atakování různých terapeutických cílů [21]. Doposud bylo zjištěno, že v této skupině látek se nachází zástupci, kteří se vykazují antibakteriální [voacaficin A a B – *Voacanga africana* (Apocynaceae)] [22], antimykotickou [hamacanthin A a B – *Hamacantha* sp. (Biemnidae)] [23], antimykobakteriální [globospiramin – *Voacanga globosa* (Apocynaceae)] [24] nebo antivirotickou [17-nor-excelsinidin – *Alstonia scholaris* (Apocynaceae)] [25] aktivitou. Některé alkaloidy dokonce projevily významnou aktivitu proti parazitickým prvokům, kteří způsobují malárii [ellipticin – *Aspidosperma vargasii* (Apocynaceae)] [26] či leishmaniózu [ramiflorin A a B – *Aspidosperma ramiflorum* (Apocynaceae)] [27]. Dále byly identifikovány látky, projevující analgetické [umbellatin – *Psychotria umbellata* (Rubiaceae)] [28], protizánětlivé [scholarisin I – *Alstonia rupestris* (Apocynaceae)] [29], antitrombotické (protidestičkové) [harman, harmin – *Peganum harmala* (Zygophyllaceae)] [30], spasmolytické [glypetelotin – *Glycosmis petelotii* (Rutaceae)] [31], hypolipidemické a antidiabetické [vincamin – *Catharantus roseus* (Apocynaceae)] [32] nebo hypotenzivní účinky [reserpin – *Rauwolfia serpentina* (Apocynaceae)] [33].

Někteří zástupci indolových alkaloidů se však stali středem zájmu pro svou cytotoxickou aktivitu. Dnes se při léčbě určitých onkologických onemocnění můžeme například setkat s látkami vinkristin a vinblastin, izolovaných z polokeře *Cataranthus roseus*. Tyto látky tak představují jedny z nejznámějších zástupců indolových alkaloidů. V oblasti výzkumu patofyziologických procesů nervové soustavy si získala pozornost i inhibiční aktivita některých indolových alkaloidů vůči enzymu AChE [physostigmin – *Physostigma venenosum* (Fabaceae)]. [33] Tento účinek lze farmakoterapeuticky aplikovat na léčbu Alzheimerovy choroby. Je také nutné podotknout, že jeden alkaloid může být nositelem nejen jedné, ale i více z výše zmíněných vlastností. [1, 20]

Společným chemickým základem těchto organických látek je bicyklická heterocyklická sloučenina indol. Ten je tvořen pyrolovým kruhem, napojeným na benzenové jádro. Svou strukturou je tento typ alkaloidů odvozen od aminokyseliny tryptofanu. [20, 33]

Indolové alkaloidy lze dále dělit ještě detailněji, podle toho, jaké další organické struktury se naváží na indol a v jaké části tak učiní [33]. V GV se nachází indolové alkaloidy β -karbolinového typu [1], jejichž částečný vznik lze shrnout v následující reakci (Obr.2).



Obrázek 2: Biosyntéza β -karbolinových alkaloidů [34]

V úvodu reakce vzniká z tryptofanu vlivem dekarboxylace tryptamin. Následně dochází ke vzniku Schiffovy báze, která podléhá intramolekulární Mannichově reakci, za následného zacyklení. Oxidacemi v dalších krocích pak vzniká tricyklická sloučenina β -karbolin. Ta poté

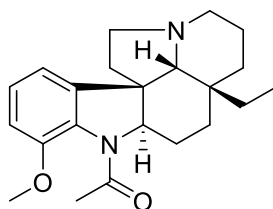
v důsledku navázání různých substituentů může vykazovat farmakoterapeuticky zajímavé biologické účinky. [34]

3.3 Obsahové látky izolované z *Geissospermum vellosii* Allemão

3.3.1 Alkaloidy izolované z *Geissospermum vellosii* Allemão

Díky zkušenostem vzešlých z používání kůry GV Allemão v lidovém léčitelství, vznikla snaha izolovat hlavní sekundární metabolity, které mohou být v této rostlině nositeli konkrétních biologických účinků. Tyto látky v mnoha případech představují alkaloidy, které vykazují rozmanitou škálu, ve farmacii potenciálně aplikovatelných, biologických aktivit. [1]

3.3.1.1 Aspidospermin



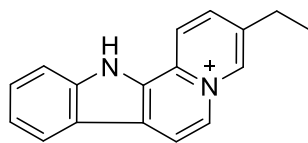
Obrázek 3: Aspidospermin [35]

Indolový alkaloid aspidospermin (Obr.3) se vyznačuje schopností působit proti různým parazitickým prvokům z rodu *Leishmania*, *Plasmodium* a *Trypanosoma*. Jak je známo, zástupci těchto rodů mohou vyvolávat různé nepříjemně se projevující druhy onemocnění, jako je například leishmanióza (*L. brasiliensis*, *L. amazoniensis*), Chagasova choroba (*T. cruzi*), spavá nemoc (*T. brucei gambiense*, *T. rhodesiense*) a malárie (*P. falciparum*). [36, 37] Při testování na antimalarickou aktivitu vykazoval aspidospermin po 72 h inkubaci s chlorochin rezistentním kmenem *P. falciparum* inhibiční aktivitu s $IC_{50} = 5,6 \pm 1,3 \mu M$ [37]. Studie provedená Galarretou et al. zjistila, že 100 μM aspidosperminu dokázalo inhibovat *L. amazonensis* v promastigotním stádiu o 89 % [36].

Další biologickou aktivitou, kterou se aspidospermin vyznačuje, je cytotoxicita a genotoxicita. Tato vlastnost byla zkoumána na HepG2 buněčné linii, buňkách jaterního karcinomu. Z výsledků dané studie vyplynulo, že po pozměnění struktury aspidosperminu, která by měla vlastnosti, jež nenesou riziko cytotoxicity a mutagenity pro nenádorové buňky,

by daná molekula mohla představovat další z potencionálních léčiv na nádorové onemocnění. [38]

3.3.1.2 Flavopereirin



Obrázek 4: Flavopereirin [35]

β -karbolinový alkaloid flavopereirin (Obr.4) se vyznačuje širokým spektrem účinků, ať už biologickou aktivitou proti různým parazitickým původcům nemocí, proti viru lidské imunodeficiency (HIV), tak i proti nádorovým onemocněním. [1]

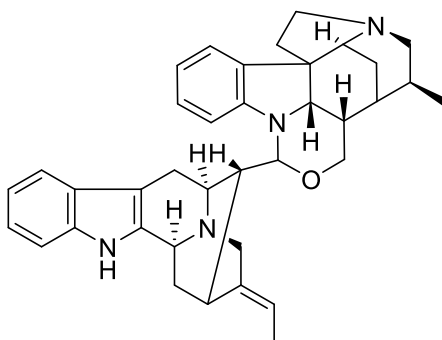
V roce 2002 byla publikována studie, ve které je popsáno testování aktivity flavopereirinu a dalších alkaloidů izolovaných z *G. sericeum*, proti původci malárie. Konkrétně se jednalo o dva typy *P. falciparum*: ty, které byly na chlorochin senzitivní (kmen T9-96) a ty, které si již na chlorochin vybudovaly rezistenci (kmen K1). Antiplasmodiální aktivita byla pozorována v obou případech, a to s $IC_{50} = 11,53 \mu M$ proti kmeni K1 a s $IC_{50} = 1,83 \mu M$ proti kmeni T9-96. [39]

Dalším parazitickým prvokem, vůči kterému flavopereirin projevila svou aktivitu, je *L. amazonensis*. Tento druh je zodpovědný za anergickou difúzní kožní formu leishmaniózy a kožní formu s diseminovanými lézemi. [40] Aktivita alkaloidu byla zkoušena proti promastigotnímu stádiu parazita a již v prvních hodinách se dostavil inhibiční efekt. Dokonce se tento alkaloid ukázal jako selektivnější než amphotericin B, léčivo, které se v dnešní době k léčbě této nemoci používá. Navíc splňuje Lipinského pravidlo pěti, a to ho v budoucnu činí potenciálně nadějnou molekulou pro vývoj nového léčivého přípravku. [35]

Již v dřívějších studiích se objevila informace, že flavopereirin dokáže selektivně inhibovat syntézu deoxyribonukleové kyseliny (DNA) v rakovinotvorných buňkách, a to především v rychle se dělících, než v těch, co jsou přítomné v pomalu rostoucích tumorech. Vědečtí pracovníci z Taiwanu poté přišli s daty, která dokládají ovlivnění nádorových buněk rakoviny tlustého střeva právě prostřednictvím tohoto alkaloidu a snažili se objasnit jeho

mechanismus účinku. Dospěli k výsledkům, jež dokazují zvýšení exprese a fosforylace P53. [41] Tento protein je považován za takzvaného „strážce genomu“, reaguje na poškození DNA a kupříkladu aktivuje gen p21, což vyústí v zastavení buněčného cyklu [42]. Zastavením buněčného cyklu v G2/M-fázi a indukci apoptózy nádorových buněk tak může flavopereirin ovlivnit růst kolorektálního karcinomu [41].

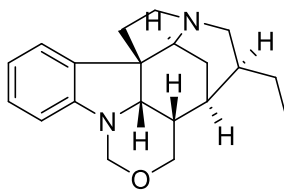
3.3.1.3 Geissolosimin



Obrázek 5: Geissolosimin [35]

U alkaloidu geissolosiminu (Obr.5) byla zkoumána *in-vitro* antiplasmodiální aktivita proti chlorochin senzitivnímu kmeni *P. falciparum*. S naměřenou biologickou aktivitou ($IC_{50} = 0,96 \pm 0,008 \mu M$) se ukázal jako potencionální strukturní vzor pro vyvinutí nového antimalarického léčiva. [17]

3.3.1.4 Geissoschizon

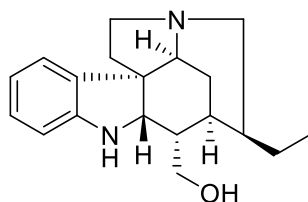


Obrázek 6: Geissoschizon [35]

Geissoschizon (Obr.6) projevilo určitou antimalarickou aktivitu proti chlorochin senzitivnímu kmeni prvoka *P. falciparum*. Ovšem v porovnání s geissolosiminem nebyla tato aktivita příliš významná. [20]

Dále u něj byla provedena studie na aktivitu vůči enzymům AChE a BuChE. Výsledky prokázaly neselektivní inhibici vůči cholinesterasám, avšak s rostoucí koncentrací tohoto alkaloidu, se začaly projevovat i jeho cytotoxické vlastnosti vůči mikrogliovým buňkám. [43]

3.3.1.5 Geissoschizolin



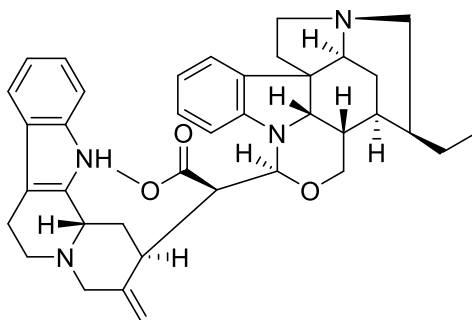
Obrázek 7: Geissoschizolin [35]

Geissoschizolin (Obr.7) byl zkoumán hlavně pro inhibiční působení vůči cholinesterasám. Bylo prokázáno, že vykazoval vyšší inhibiční aktivitu vůči humánní BuChE než humánní AChE. Pomocí molekulového dockingu došlo k zjištění, že se tato molekula váže nejen na aktivní místo enzymu, ale také na periferní aniontové místo (PAS) enzymu. Tento podstatný fakt přičítá geissoschizolinu další přínosnou vlastnost, a to snížení množství komplexu AChE-A β . PAS je za normálních podmínek schopné reagovat s β -amyloidem (A β). Vzniklé spojení pak vede k vytvoření komplexu cholinesterasy s tímto peptidem a důsledkem je vznik struktury s ještě vyšší toxicitou, než představuje přítomnost samotného A β . [43]

Dalším pozitivním zjištěním byla schopnost redukovat sekreci tumor nekrotizujícího faktoru α (TNF α) a NO, tedy zánětlivých mediátorů, které jsou uvolňovány mikroglie. Tato sekrece vzniká na podkladě prozánětlivého stimulu, jako je například vznikající A β , neuronální poškození nebo výskyt lipopolysacharidů (LPS). Právě pomocí LPS byl proveden test, na základě kterého se dospělo k závěru, že alkaloid geissoschizolin způsobuje signifikantní redukcí výše zmíněných zánětlivých mediátorů již od koncentrace 1 μ M. [43]

Z obou zjištění tak vyplývá, že geissoschizolin pomáhá jak v předcházení poškození neuronálních buněk, zabráněním vzniku toxických komplexů, tak i v řešení již vzniklé neuroinflamace, způsobené různými prozánětlivými působky. Lze tedy konstatovat, že daná molekula představuje zajímavý vzor pro další studie v oblasti Alzheimerovy choroby, a v budoucnu případně prototyp léčiva k léčbě tohoto neurodegenerativního onemocnění. [43]

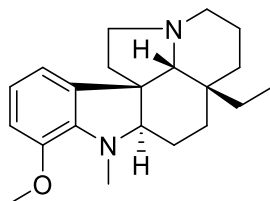
3.3.1.6 Geissospermin



Obrázek 8: Geissospermin [35]

Geissospermin (Obr.8) je jeden z nejhojněji zastoupených alkaloidů kůry GV. Taktéž u něj se prokázalo určité inhibiční působení proti *P. falciparum*. V dalších studiích geissospermin projevilo přítomnost inhibičního působení proti AChE, enzymu, který je jedním z cílů terapie Alzheimerovy choroby. [1, 44]

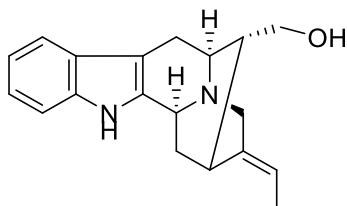
3.3.1.7 12-methoxy-1-methyl-aspidospermidin



Obrázek 9: 12-methoxy-1-methyl-aspidospermidin [35]

Jak již bylo zmíněno dříve, kůra stromu GV představuje pro domorodé obyvatelstvo i prostředek k léčbě bolesti. Tento poznatek vedl vědce z Brazílských univerzit k provedení studie na ovlivnění nocicepce perorálně administrovaným extraktem z kůry. Během této studie byl pozorován vliv na 5-hydroxytryptaminové (5-HT) receptory na myších modelech, kdy docházelo k interakci na 5-HT_{1A} receptorech. K tomuto závěru se dospělo na základě předlčení testovaných myších subjektů různými látkami, které byly selektivními antagonisty určitého typu receptorů. WAY-100635 (0,3mg/kg; s.c.) antagonizoval 5-HT₁, katanserin (0,3mg/kg; i.p.) představoval antagonistu 5-HT_{2A} receptoru a ondasetron (0,5 mg/kg; i.p.) byl antagonistu receptoru 5-HT₃. Za 20 minut následovalo podání dichlormethanové frakce GV. O 60 minut později byla podána kyselina octová, která byla zodpovědná za vyvolávané bolestivé vzruchy. Pouze v případě podání antagonisty 5-HT₁, docházelo k přetrvávání nocicepce, tedy k zabránění účinku dichlormethanové frakce. Jako hlavní alkaloid, který je pravděpodobně zodpovědný za tento účinek, byl označen právě 12-methoxy-1-methyl-aspidospermidin (Obr.9). [45]

3.3.1.8 Vellosiminol

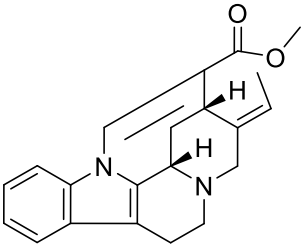
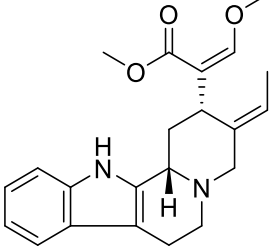
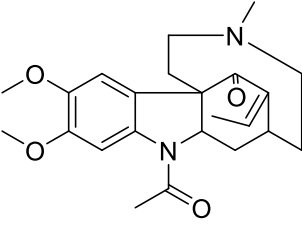
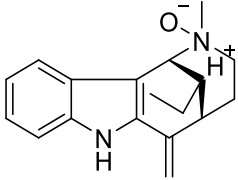
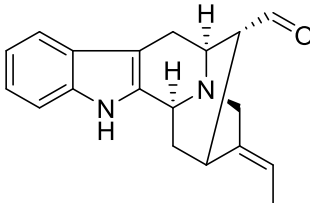


Obrázek 10: Vellosiminol [35]

Rovněž další z alkaloidů přítomných v GV, vellosiminol (Obr.10), také někdy k nalezení pod názvem Normacusin B, byl podroben zkoumání biologické aktivity [17, 46]. Studie provedená F. Mbeunkui et al. zkoumala *in-vitro* antiplasmodiální působení methanolového extraktu kůry GV, a poté z něj izolovaných alkaloidů. U vellosiminolu dospěla k výsledkům, které potvrzovaly určitou přítomnost této aktivity, avšak celkově, a to i v porovnání s jinými zkoušenými alkaloidy, jako byl například geissolosimin ($IC_{50} = 0,55 \pm 0,05 \mu\text{g/mL}$), bylo působení proti chlorochin sensitivnímu kmeni *P. falciparum* nevýznamné ($IC_{50} = 46,16 \pm 0,88 \mu\text{g/mL}$). [17]

Tento alkaloid byl objeven také v kůře kořene rostliny *Strychnos atlantica*. Studie provedená v Brazílii, u něj zjišťovala a potvrdila jeho *in-vivo* hypotenzivní a spasmolytickou aktivitu na krysích modelech. [47]

3.3.1.9 Další alkaloidy izolované z *Geissospermum vellosii* Allemão

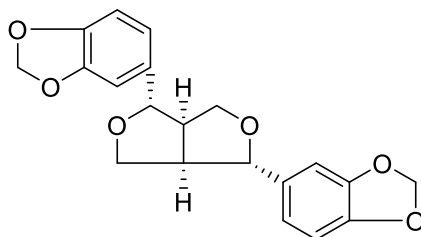
<p>Apogeissoschizin</p>	
<p>Geissoschizin</p>	
<p>Geissovellin</p>	
<p>Pausperadin</p>	
<p>Vellosimin</p>	

Tabulka 2: Alkaloidy *Geissospermum vellosii* Allemão [35]

3.3.2 Látky nepříslušící do skupiny alkaloidů

Také další látky nacházející se v GV vykazují zajímavou biologickou aktivitu. Názornými příklady je sesamin, který spadá do skupiny lignanů a lupeol patřící mezi triterpeny. [35, 48, 49]

3.3.2.1 Sesamin

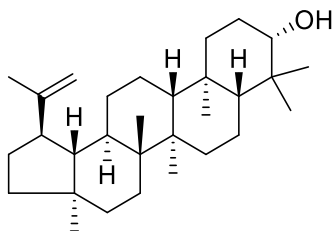


Obrázek 11: Sesamin [35]

Lignan sesamin (Obr.11) se vyznačuje řadou významných farmakologických účinků. Jeden z nich představuje cytotoxické působení této látky. Na nádorové buněčné linii HepG2 sesamin zprostředkoval zastavení buněčného cyklu a indukoval apoptózu, čímž se stal potenciálním kandidátem na vývoj nového léčiva proti rakovině jater. [48] Také u něj byla zaznamenána určitá protizánětlivá a antioxidační aktivita [50, 51].

Některé studie se zabývaly antiosteoporotickými účinky sesaminu. Byla u něj zjištěna osteogenetická aktivita vlivem up-regulace Wnt/ β -kateninu a vlivem down-regulace NF- κ B signalizace také potlačení osteoklastogeneze. [52, 53]

3.3.2.2 Lupeol



Obrázek 12: Lupeol [35]

Lupeol (Obr.12) lze chemicky zařadit mezi triterpeny lupanového typu [49]. Tato látka je zastoupena v některé zelenině a ovoci, jako je například okurka, rajče, bílé zelí, mango, fík, jahoda atd. Lze se s ním však setkat i v mnoha léčivých rostlinách jako je *Tamarindus indica*, *Himatanthus sucuuba*, *Bombax ceiba* nebo *Sebastiania adenophora* a mnoha dalších. [54]

Lupeol se vyznačuje řadou farmakologických účinků a stal se středem zájmu mnoha studií. Projevil v nich například svůj protizánětlivý efekt, kdy bylo zaznamenáno snížení prozánětlivých cytokinů jako je TNF α nebo IL β u lipopolysacharidy aktivovaných makrofágů. Protizánětlivá aktivita byla také zkoušena na myších subjektech k léčbě bronchiálního astmatu. Výsledky ukázaly snížení hladin eozinofilů v bronchoalveolární tekutině, redukcí množství hlenu a celkově snížení zánětu v plicích postižených jedinců s protizánětlivým účinkem rovným léčbě dexamethasonem. [54]

Lupeol byl rovněž testován na různých druzích nádorových buněčných linií, a následně byla potvrzena jeho protinádorová aktivita. Aratanechemuge et al. provedli studii na myeloidní buněčné linii promyelocytární leukémie HL-60, kdy vlivem tohoto triterpenu byla indukovaná apoptóza nádorových buněk [54]. Cmoch et al. testovali *in-vitro* aktivitu lupeolu, která byla měřena po 72hodinové expozici nádorových buněčných linií této sloučenině. Bylo provedeno 6 sériových ředění lupeolu s faktorem ředění 4 a následně byla vyhodnocena jeho IC₅₀. Z testovaných buněčných linií: T-lymfoblastické leukémie CEM, karcinomu prsu MCF-7, karcinomu plic A-549, mnohočetného myelomu RPMI 8226 a dalších, byla nejvýznamnější protinádorová aktivita zaznamenána vůči buněčné linii CEM (IC₅₀ = 27,6 \pm 1,4 μ M) a RPMI 8226 ((IC₅₀ = 37,5 \pm 5,6 μ M) [55]. Budoucí uplatnění lupeolu v této problematice tak není nereálné, avšak je nutné podrobit tuto látku dalším studiím. [54]

3.4 Alzheimerova choroba

Alzheimerova choroba je nejrozšířenějším typem demence a z hlediska mortality je jednou z chorob na vrcholu žebříčku ve stárnoucí populaci. Samotná nemoc časem postupně zbavuje postiženou osobu soběstačnosti a ta je tak odkázána na své okolí. Díky své chronické a progresivní povaze má toto neurodegenerativní onemocnění fyzický, psychologický, sociální a ekonomický vliv nejen na nemocného, ale i na jeho okolí a na společnost jako celek. Bohužel, prozatím neexistuje efektivní a bezpečná léčba na tento typ demence, přesto jsme však schopni využít doposud získané informace k tlumení symptomů a zpomalení progresu tohoto typu onemocnění. [2]

3.4.1 Epidemiologie

3.4.1.1 Svět

Alzheimer's Disease International ve World Alzheimer Report 2021 uvádí, že na světě trpí demencí kolem 55 miliónů lidí a z tohoto množství tvoří nemocní s Alzheimerovou chorobou přibližně 60-80 % [56]. Dle Světové zdravotnické organizace počet lidí s tímto typem demence neustále roste s tím, že v roce 2050 by se mohl počet nemocných vyšplhat přibližně k číslu 135,5 miliónů. Předpoklad dožití u lidí s diagnostikovanou demencí se odhaduje mezi sedmi až deseti lety. [57]

3.4.1.2 Česká republika

Podle České alzheimerovské společnosti v České republice tvořil v roce 2015 podíl nemocných s demencí 1,48 %, což řadí Českou republiku do evropského průměru. Reálný počet lidí s demencí, včetně Alzheimerovy choroby, je však neznámý a zůstává pouhým odhadem. Na základě zahraničních prevalenčních studií byl stanoven odhad, který v roce 2015 předpokládal 155,9 tisíc lidí trpících demencí, z čehož dle výpočtů České alzheimerovské společnosti dvě třetiny (105 tisíc) tvoří zástupci ženského pohlaví a jednu třetinu (50,9 tisíc) tvoří zástupci pohlaví mužského. Demence, a obzvláště Alzheimerova choroba, je těžce diagnostikovatelný syndrom a bývá také často poddiagnostikován. Podle Alzheimer's Disease International se odhalí pouze přibližně 50 % nemocných v nejvyspělejších státech, v ostatních pak i méně než 10 %. Z důvodu této skutečnosti lze jen těžce určit, kolik nemocných se v České republice i ve světě reálně nachází. [57]

Riziko rozvoje demence je pevně spojeno se stářím. Věk v tomto ohledu hraje významnou roli, kdy nad 65 let křivka prevalence prudce stoupá a ve věku nad 80 let trpí demencí přibližně každý pátý člověk. [57]

3.4.2 Rizikové faktory

Existuje mnoho obecných předpokladů, co může za vznik nebo progresi Alzheimerovy choroby, bohužel jen málu z nich se dá v současné době předcházet. Například stárnutí organismu a pohlaví, jako první a zároveň jedny z nejpodstatnějších rizikových faktorů ovlivnit nelze. Mezi další faktory lze zařadit infekce, úrazy hlavy, genetické faktory, environmentální faktory, kardiovaskulární choroby, diabetes a další. To, co lze výrazně ovlivnit, je nezdravý životní styl a ve většině případů obezita. Otázkou však zůstává, do jaké míry tyto faktory přispívají k rozvoji a progresi daného typu demence. Po objasnění tohoto problému by bylo možné podniknout cílené kroky k zajištění včasné prevence. [58]

3.4.3 Příznaky a stádia onemocnění

U Alzheimerovy choroby lze zaznamenat 2 hlavní typy příznaků: kognitivní poruchy a nekognitivní poruchy. [59]

„Mezi poruchy kognitivních funkcí řadíme poruchy paměti a učení, poruchy vizuospatiálních funkcí, orientace, úsudku, korových symbolických funkcí (afázie, agnozie, apraxie), exekutivních (výkonných) funkcí (plánování, organizování, následnosti, abstrakce)“. [59]

Pro bližší objasnění odborných termínů:

1. **Afázie** – ztráta symbolické funkce řeči, vztahující se k chápání a vyjadřování myšlenek prostřednictvím slov
2. **Apraxie** – neschopnost provádět motorické aktivity, navzdory neporušeným motorickým funkcím,
3. **Agnozie** – neschopnost rozpoznávat nebo identifikovat věci navzdory nepoškozeným sensorickým funkcím“. [60]

Do poruch nekognitivních patří poruchy behaviorální a psychologické, do kterých můžeme zařadit například agresivitu, apatii, depresi, anxiету, mánii, halucinace, bludy, atd., které zneprůjemňují život nejen nemocné osobě, ale i jejímu okolí [59].

Jako každou nemoc i Alzheimerovu chorobu lze dělit do jednotlivých fází.

1. První období, **pre-klinické** nebo **pre-symptomatické stádium**, se vyskytuje ještě bez klinicky významných projevů nemoci a bez znatelného zasažení do denních aktivit postiženého. Navzdory tomu se již objevují ranné patologické změny v mozkové kůře a hipokampu a lze zaznamenat lehké snížení paměti. [58]
2. Po této fázi, která může trvat i několik let, přichází **počáteční stádium**, kde se již setkáváme s detekovatelnými symptomy, jako je snížení koncentrace a paměti, dezorientace v čase a prostoru [58]. U dané osoby lze zaznamenat sníženou schopnost plánovat, vytvářet si úsudek a organizovat, snížena je taky schopnost vyjadřování, kdy se slovní zásoba stává znatelně omezenou. Kromě toho se mohou objevit změny nálad, které někdy přerostou až v depresi [61].
3. Ve **středním stádiu** dochází k rozšíření postižených oblastí v mozkové kůře, paměť je velmi poškozena, objevuje se problém s psaním, čtením, řečí. Daná osoba navíc může mít problém rozpoznat své přátele, a dokonce i svou rodinu [58]. Také snížená schopnost logického uvažování, plánování a vyjadřování omezuje danou osobu v zařazení se do společnosti a je nutné, aby někdo v denních činnostech na nemocného dohlížel [61].
4. V průběhu **pozdního stádia** může být již postižena celá oblast mozkové kůry, nemocný není schopen poznat své blízké a může skončit upoutaný na lůžko [58]. Nemocný se vyjadřuje pouze krátkými větami nebo dokonce jen slovy a jeho agresivita či apatie stoupá [61]. Mohou se objevit problémy s polykáním, močením, defekací a dalšími fyziologickými funkcemi [58, 59]. Tuto fázi doprovází výskyt řady komplikací, jako jsou například různé interkurentní infekce, úrazy, zápal plic a do pár let proto nemocný s Alzheimerovou chorobou umírá [59, 61].

3.4.4 Etiopatogeneze

Industrializované i rozvojové země se potýkají s rapidním nárustem demence jako je Alzheimerova choroba. Rychlost, s jakou tato nemoc postihuje lidstvo, nutí vědeckou obec přicházet s novými alternativami, jak objasnit její etiologii a definovat tak konkrétní cíle, na které se v průběhu prevence a léčby zaměřit. [62] Ohledně prevence nebylo dosaženo takového pokroku, jako u brzdění progresu. Neustále se vyvíjející zdravotnictví dnes dokáže poskytnout molekuly léčiv, které zpomalí průběh tohoto onemocnění a prodlouží

tak pacientovi a jeho okolí kvalitu života o pár let. Tato léčiva jsou symbolem reálného a nadějného úspěchu a vznikla tak snaha o objevení dalších molekul, které by účinkovaly na stejný cíl, ale přinášely by méně nežádoucích účinků nebo by svými pozitivními vlastnostmi již používané molekuly přesahovaly. [3]

Alzheimerova choroba, jakožto neurodegenerativní onemocnění postihuje různé oblasti mozku. Dochází k akumulaci β -amyloidních plaků a hyperfosforylaci Tau proteinu v neurofibrilární shluky v částech mozku jako je nucleus basalis Meynerti, pars basalis telencephali, lobus frontalis, hipokampus, gyrus cinguli, amygdala, substantia nigra, v mnoha jádrech v truncus cerebri a v cortex cerebri. Objevuje se také změna v komunikaci neuronů, ztráta synapsí a degenerace, až zánik neuronů. [63] Navíc se v mozkové kůře a limbických strukturách snižuje množství cholinacetyltransferasy a v mozkové kůře osob s Alzheimerovu chorobou se prokázal úbytek syntézy ACh [62]. Setkáváme se tak s poškozením jak na podkladě akumulace (vyskytuje se zvýšené množství dystrofických neuritů, $A\beta$ tvoří amyloidní plaky, tau protein zase neurofibrilární klubka a neuropilová vlákna), tak na podkladě úbytku a atrofie (neuronů, neuropilu a neuronálních drah, díky ztrátě synapsí) [58, 62].

3.4.4.1 β AMYLOIDNÍ PLAKY

Pro objasnění etiologie Alzheimerovy choroby bylo vzneseno mnoho hypotéz. Jedna z nejznámějších se týká β -amyloidních plaků (β AP) a je tedy nazvána „Amyloidní hypotézou“. Ta vznikla na podkladě objevení abnormálního množství β AP v centrální nervové soustavě (CNS) nemocných s Alzheimerovou chorobou. [58]

Ve zdravých neuronech je amyloid prekurzorový protein (APP) štěpen α a γ sekretasou na solubilní polypeptidy. To znamená, že pak mohou být rozloženy a produkty degradace tak mohou být použity znovu jako stavební kameny pro další buněčné pochody. Avšak tento transmembránový protein může být štěpen také pomocí β a γ sekretasy. Touto cestou pak vznikají nerozpustné peptidy, $A\beta$, jejichž následné spojení pak může dát za vznik β AP. Tyto patologické útvary se mohou vmezeřit mezi zdravé neurony a přerušovat tak signály, které mezi nimi probíhají. Další problém nastává, pokud je β AP zaznamenán imunitním systémem, který svou odpovědí rozpoutá zánět, jenž také může poškodit zdravé neurony v okolí. Navíc se mohou depozity plaků hromadit na stěnách cév a tato angiopatie pak může být podkladem ke vzniku ruptury cévy s následkem intracerebrálního krvácení. Všechny tyto fenomény vedou

ke ztrátě neuronů nebo mezi nimi probíhajícími signály, což může mít negativní vliv na kognitivní a jiné mozkové funkce. [58, 64]

Protože se β AP nacházejí i v mozcích stárnoucích, avšak jinak zdravých jedinců, vznikají určité pochybnosti, zda právě ony mají zásadní vliv na propuknutí tohoto onemocnění. Nicméně, i přes tento fakt zůstává tato hypotéza nejvíce akceptovanou pro objasnění mechanismu dědičné Alzheimerovy choroby a má nepochybně na její progresi vliv. [58]

3.4.4.2 TAU PROTEIN

Cytoskelet je složitý útvar uvnitř buňky, který představuje jak oporu buňky, tak i její transportní systém, jenž dopravuje potřebné látky do různých buněčných segmentů. Částečně je tvořen z mikrotubulů, na jejichž povrchu jsou umístěny Tau proteiny, které podporují jejich strukturální stabilitu. Je zdokumentováno, že β AP mohou být spouštěči aktivity určitých kinas, které pak mohou hyperfosforylovat tento protein, a tak způsobit jeho oddělení od mikrotubulů [64]. Navíc se tyto separované proteiny mohou párovat, obtáčet kolem sebe a také se shlukovat do takzvaných neurofibrilárních klubek uvnitř buňky. [58] To vše má za následek destabilizaci buněčné oporné sítě a negativní změnu v transportním systému buňky, což může vést až k apoptóze postiženého neuronu. Pokud tedy předpokládáme postižení více nervových buněk, dochází tak k úbytku mozkové tkáně, a tedy k adekvátnímu poškození funkcí CNS. [64]

3.4.4.3 CHOLINERGNÍ SYSTÉM

Ovlivnění cholinergního systému v terapii Alzheimerovy nemoci se zakládá na dvou hlavních principech. První z nich se zaměřuje na stimulování cholinergních receptorů pomocí selektivních agonistů. Druhý z nich spočívá ve snížení hydrolýzy tzn. degradace ACh cholinesterasami, zvýšení jeho přítomnosti v synaptické štěrbině, a tudíž k zachování dostatečné neurotransmise pomocí tohoto neurotransmiteru, která je z důvodu jeho deplece výrazně omezena. [62]

3.4.4.3.1 Acetylcholin

ACh je jedním z hlavních neuromediátorů, které je možné v lidském organismu najít. Ovlivňuje jak periferní systém, tak i CNS, kde hraje velmi důležitou roli pro zachování kognitivních funkcí ve fyziologických mezích. [63] Paměť, učení, myšlení, pozornost, vnímání,

odpověď na stres atd. jsou funkce organismu, které jsou spjaté s působením této látky na příslušné receptory, nacházející se v různých částech mozku [63, 65].

Na jeho vzniku se podílí enzym cholinacetyltransferasa, který je přítomen v cytoplazmě cholinergních neuronů. Zde se ACh syntetizuje z cholinu a acetyl koenzymu A (acetyl-CoA). Vesikulární transporter acetylcholinu dále přenesení vzniklý neurotransmitter do synaptických vezikul a ten je poté vlivem depolarizace neuronu vypuštěn do synaptické štěrbině. Zde se může navázat na muskarinové (M) či nikotinové (N) receptory, pomocí kterých je signál přenášen dál. ACh je však velmi rychle v synaptické štěrbině degradován na cholin a acetát pomocí enzymu AChE, jednoho z kineticky nejefektivnějších enzymů, který je schopen hydrolyzovat až 5000 molekul ACh za sekundu. [65]

3.4.4.3.2 Acetylcholinesterasa a butyrylcholinesterasa a jejich role v patogenezi

Alzheimerovy choroby

AChE je specifická esterasa, tedy enzym řadící se do skupiny karboxyesteras. Nachází se hlavně v erythrocytech, v neuromuskulárních ploténkách a cholinergních synapsích v mozku. Naproti tomu BuChE je nespecifická cholineseterasa, což znamená, že hydrolyzuje různé typy esterů cholinu. V těle je tento enzym všudypřítomný, ale nejvíce je zastoupen v krevním séru, játrech a slinivce břišní. Také ho hojně nacházíme v CNS, kde je asociován především s gliovými buňkami a endoteliálními buňkami. BuChE v mozku zastává podpůrnou funkci. Stejně jako AChE se podílí na hydrolýze ACh a koreguje tak jeho hladinu v mozku. [66]

V případě nízké koncentrace ACh je účinnost AChE mnohonásobně vyšší než účinnost BuChE. V případě zvýšeného přílivu ACh však dochází k inhibici AChE substrátem a hydrolýza ACh BuChE výrazně stoupá. V případě Alzheimerovy choroby, hladina AChE v mozku klesá, a to v určitých mozkových segmentech až o 85 %. Naopak množství BuChE s progredující nemocí stoupá, a tento fakt zvyšuje důležitost tohoto enzymu v rámci redukce hladiny ACh. Tak z něj činí další možný cíl farmakoterapie Alzheimerovy choroby. [66]

AChE však není cílem inhibitorů AChE jen pro její schopnost snižovat množství ACh v synaptické štěrbině. C-konec lidské AChE je slabě homologní k N-konci A β . *In-vitro* studie dokazují vysokou stimulaci shromažďování fibril A β , a to právě na podkladě této esterasy. Existují fyzikální, biochemická i morfologická data, která dokládají, že AChE zvyšuje shromažďování A β v A β - AChE komplexy, které jsou v mozku více toxické než

pouhá přítomnost fibril A β . Tento fakt přispívá k patologickému ubývání neuronů v mozkové tkáni v průběhu tohoto typu demence. [66]

Také BuChE zastává určitou roli při tvorbě amyloidních plaků a neurofibrilárních shluků v mozkové kůře, a to převážně G1 forma BuChE, která se v těchto strukturách shromažďuje. Ukázalo se, že BuChE se objevuje již v počátcích tvorby β AP a zpevňuje jeho konformaci β -skládaného listu. Předpokládá se tak výrazná role tohoto enzymu v rámci tvorby maligní formy β AP. [66]

3.4.4.3.3 Acetylcholinové receptory

ACh, jako neurotransmitter, aktivuje v CNS různé typy receptorů a moduluje tak její funkce. V závislosti na lokalizaci a typu receptorů způsobuje jejich obsazením aktivační či inhibiční procesy. V lidském organismu lze pozorovat 2 typy acetylcholinových receptorů, a to N a M. [65]

a) Muskarinové receptory

M receptory jsou receptory spřažené s G proteinem a existuje 5 izoform těchto receptorů: M1-M5. M1, M3 a M5 jsou receptory spřažené s G $_{\alpha q}$ a jsou zodpovědné za excitabilitu buněk, naopak M2 a M4 spřažené s G $_{\alpha i}$ buněčnou excitabilitu snižují. M1 a M3 jsou lokalizovány hlavně postsynapticky. Oproti tomu M2 a M4 jsou receptory presynaptické a stávají se tak autoreceptory, které ovlivňují hladinu ACh v synaptické štěrbině. [65] Poslední zmíněné M5 receptory se vyskytují v mozku pouze v malých hladinách a hrají roli například při uvolňování dopaminu [67].

Ovšem nejen druh receptoru, ale i jeho lokalizace v mozku určuje jeho funkce. M receptory umístěné v hipokampu a mozkové kůře ovlivňují kognitivní procesy a paměť, naproti tomu M receptory ve striatu a motorické oblasti mozkové kůry ovlivňují motorické funkce organismu. [67]

Při Alzheimerově chorobě dochází k poklesu hladin hlavně M1 a M2 receptorů v hipokampu a mozkové kůře a M4 receptorů v mozkové kůře. Snížené množství těchto receptorů přispívá ke kognitivnímu deficitu. [67]

Bylo zjištěno, že aktivací M1/M3 receptorů dochází ke spuštění štěpení APP neamyloidogenní cestou, a tedy k poklesu tvorby A β v hipokampu a mozkové kůře [67]. Navíc

aktivace M1 receptoru snižuje Tau hyperfosforylaci tím, že aktivuje protein kinasu C (PKC) a inhibuje GSK-3 [65]. Úbytek těchto receptorů tak přispívá k opačnému účinku. Kromě toho snížení počtu M2/M4 receptorů má vliv na snížení uvolňování ACh do synaptické štěrbině, čímž vzniká další faktor, který přispívá k negativnímu ovlivňování kognitivních funkcí organismu. [67]

b) Nikotinové receptory

N receptory patří mezi iontově řízené kanály selektivní pro kationty (K^+ , Na^+ a Ca^{2+}) a jejich aktivace vede k rychlé buněčné odpovědi. Mohou být tvořeny z 5 různých subjednotek (α , β , δ , γ , ϵ) v rozdílných kombinacích, to znamená, že mohou vzniknout N receptory s rozdílnými vlastnostmi a funkcemi. V periferním nervovém systému vede aktivace těchto receptorů k rychlé synaptické transmisi. Avšak v CNS mají tyto receptory spíše funkci modulační než excitační nebo inhibiční. Presynapticky umístěné receptory tak regulují následné uvolňování neurotransmiterů jako je glutamát, kyselina γ -aminomáselná (GABA), dopamin, serotonin, noradrenalin a ACh. Agonisté těchto receptorů tak pozitivně ovlivňují kognitivní funkce, naproti tomu antagonisté na ně mají vliv negativní. [65]

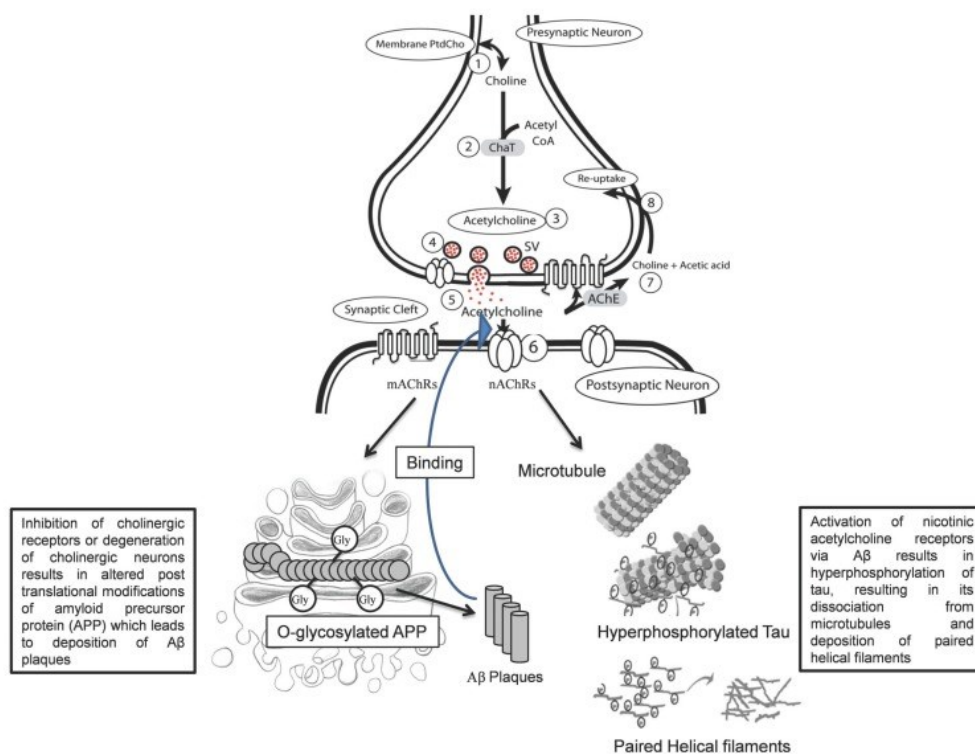
Nejvíce zastoupená subjednotka v CNS je $\alpha 7$, která se hojně nachází ve striatu, thalamu, mozkové kůře a limbickém systému. Bylo zjištěno, že $\alpha 7$ N acetylcholinový receptory reagují s $A\beta$, později může dojít i k aktivaci $\beta 2$ subjednotky a ty se mohou spojit a vytvořit $\alpha 7\beta 2$ N receptory. Takto vzniklý komplex N acetylcholinový receptor- $A\beta$ negativně ovlivňuje cholinergní transmisi a kognitivní funkce. Navíc toto spojení vyvede v aktivaci $\alpha 7$ N receptoru, a následně pomocí signalizačních kaskád, ke zvýšení hyperfosforylace Tau proteinu. [63, 65, 67]

Další význam $\alpha 7$ N receptoru však spočívá v aktivaci mikroglíí, které hrají důležitou funkci v protizánětlivých procesech a dále jsou regulátory oxidativního stresu [63].

Přes tato zjištění, se však agonisté těchto receptorů jeví jako lepší volba, přestože z objevů vyplývá, že i antagonistické působení by mělo v určitém směru na kognitivní funkce pozitivní vliv [67].

Avšak nejen $\alpha 7$ N receptory, ale i $\alpha 4\beta 2$ N receptory jsou hojně zastoupeny v CNS a podílí se na ovlivnění kognitivních funkcí. Po smrti pacientů s Alzheimerovou chorobou, byla v jejich mozcích zjištěna významná redukce těchto receptorů [63].

V souhrnu lze tedy říct, že i ovlivnění M i N receptorů, může přinášet určité benefice v léčbě Alzheimerovy choroby (obr.13).



Obrázek 13: Role cholinergních receptorů v rámci patogeneze Alzheimerovy choroby [67]

3.4.4.4 GLYKOGEN SYNTASA KINASA 3

GSK 3 je jednou ze serin-threonin protein kinas, která je hojně zastoupena v CNS. Jde tedy o enzym, který fosforyluje serin a threonin místa na svých substrátech. [68, 69] Jeho jméno je odvozeno od jeho činnosti, tedy fosforylace a inhibice glykogen syntasy, avšak kromě role v metabolismu glukosy má i svůj význam v regulaci jiných buněčných funkcí [68].

Existuje předpoklad, že GSK-3 fosforyluje více substrátů než jakákoliv jiná kinasa, a přesto, že se z velké části vyskytuje převážně v cytosolu, její zastoupení lze pozorovat i v mitochondriích a jádru buněk [68]. Její substráty tvoří jak metabolické proteiny, transkripční faktory, translační faktory, tak i proteiny cytoskeletu. Díky tomu slouží jako regulátor mnoha procesů buňky, ovlivňuje neurogenезi, růst axonů, vývoj dendritů, synaptogenezi a celkově vývoj a přežití neuronů. Na myších modelech pak byla doložena

důležitost tohoto enzymu při vývoji mozku, učení a paměti, vliv na emoce, depresivní chování a senzomotorické funkce. [70]

3.4.4.4.1 Izoformy GSK-3

U savců se vyskytují 2 izoformy, a to GSK-3 α a GSK-3 β , které navzdory jejich podobnosti působí na odlišné substráty [70]. Na myších modelech vedlo celkové vyřazení GSK-3 β z funkce k embryonální letalitě subjektů. Naproti tomu myši, u kterých byla komplexně ukončena funkce GSK-3 α , vykazovaly „pouze“ zkrácení délky života a rozvinutí věkově-závislých patologických funkcí. [68] I přesto, že je větší pozornost ve výzkumech věnována GSK-3 β než GSK-3 α , obě tyto izoformy hrají zásadní roli v procesech odehrávajících se v mozku [70].

3.4.4.4.2 Role GSK-3 při tvorbě amyloidu β

Role GSK-3 v rámci β -amyloidní hypotézy, jako jedné z podstaty patogeneze Alzheimerovy choroby, byla prokázána jak v *in-vitro*, tak i v *in-vivo* studiích. Jak již bylo dříve zmíněno, tvorba β AP vzniká na podkladě štěpení APP β a γ sekretasou, což zapříčiňuje produkci A β , které vytváří fibrily, oligomery a tvoří depozity A β v mozku. [69] Zjistilo se, že GSK-3 β stimuluje přeměnu APP právě na A β , protože při inhibici enzymu GSK-3 byl zaznamenán pokles tvorby A β v CNS [68].

Další studie prokázaly, že při zvýšené aktivaci GSK-3 β se zvýší i funkce presenilinu 1, jedné z katalytických komponent γ sekretasového komplexu, a také jeho lokalizace v CNS. Také zvýšená aktivace BACE 1, tedy β -sekretasy 1, je ovlivněna zvýšeným množstvím GSK-3 β a zvyšuje tak pravděpodobnost štěpení APP právě pomocí BACE-1. [69]

Objevil se však i další negativní fakt, a to pozitivní zpětnovazebná smyčka. Zvýšené množství A β aktivuje GSK-3, z toho důvodu je větší množství APP podrobena štěpení na nerozpustné A β a cyklus se opět opakuje. [68]

3.4.4.4.3 Role GSK-3 a tau proteinu

Tau je protein asociovaný s mikrotubuly. Mikrotubuly stabilizuje a napomáhá jejich vzniku, zabezpečením shlukování tubulinu. Funkce a afinita Tau k mikrotubulům závisí převážně na jeho stupni fosforylace. [69] Při Alzheimerově chorobě lze zaznamenat zvýšené množství hyperfosforylovaného tau proteinu, což vede k rozložení mikrotubulů, ztrátě neuronální integrity a vlivem disociace tau proteinu z mikrotubulů, k tvorbě fibril a neurofibrilárních shluků. [68] Obě izoformy GSK-3 hrají v tomto procesu roli, přestože

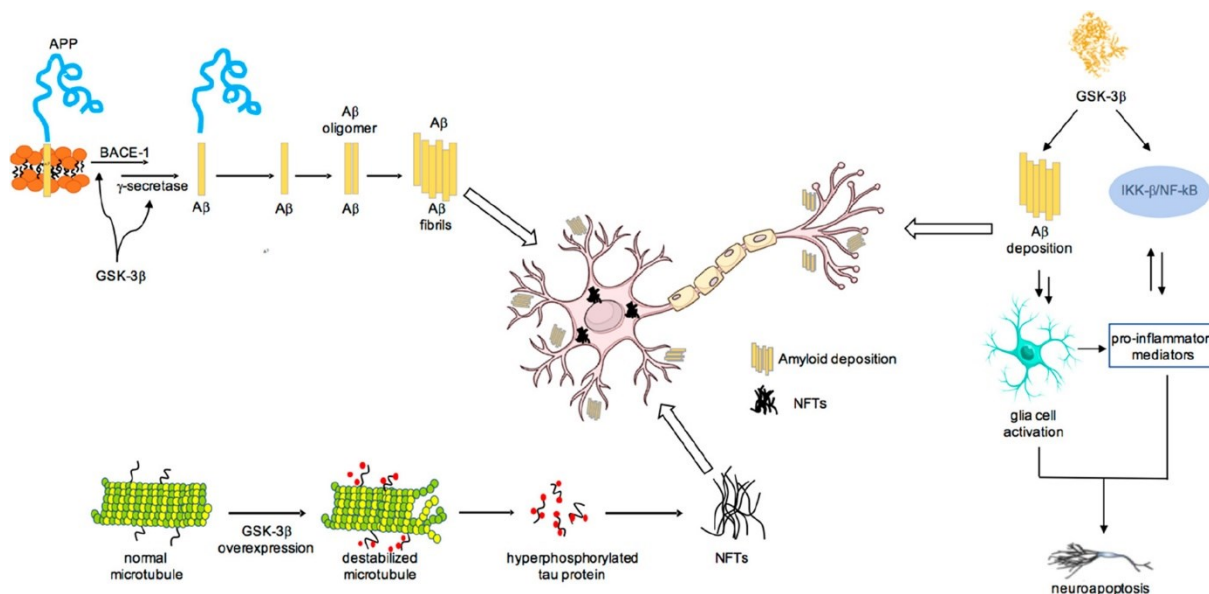
komplex Tau-GSK-3 β se vyskytuje častěji a považuje se za hlavní Tau-kinasu, která je s největší pravděpodobností zahrnuta v patologii tohoto onemocnění [70].

3.4.4.4 GSK-3 a cholinerní systém

V Alzheimerově chorobě se objevuje snížená cholinerní transmise na podkladě mnoha faktorů. Dochází ke snížení hladin ACh, snížení aktivity cholin acetyltransferasy a ztrátě cholinerních neuronů v určitých segmentech mozku. GSK-3 zastává svou roli i v rámci regulace cholinerních funkcí. Snižuje množství vzniklého ACh ve striatu, nucleus basalis Meynerti, a frontální kůře mozku. GSK-3 fosforyluje a inaktivuje pyruvát dehydrogenasu, enzym zodpovědný za přeměnu pyruvátu na acetyl-CoA v mitochondriích, což zapříčiní nedostatek acetyl-CoA pro syntézu ACh. Cholin acetyl transferasa pak nemá dostatek substrátu na tvorbu ACh z acetyl-CoA a cholinu a hromadí se v tělech buněk, což zapříčiňuje, poruchy v transportu signálů pomocí cholinerních neuronů. [70]

3.4.4.5 GSK-3 a neuroinflamace

Kolem β -amyloidních plaků a dystrofických neuritů lze pozorovat neuroinflamaci. Ta je zapříčiněna zvýšenou aktivací mikroglíí a astrocytů, které v daném místě vypouštějí zánětlivé cytokiny. GSK-3 je důležitý regulátor zánětlivé odpovědi v mikroglíích a aktivace této kinasy podporuje uvolňování interleukinu-1 (IL-1), IL-6, TNF- α , ale také přispívá k aktivaci určitých transkripčních faktorů, jako je například nukleární faktor kappa B (NF- κ B), což vede k dalšímu uvolňování prozánětlivých cytokinů a chemokinů. Přestože jejich hlavním cílem, je eliminace daných patologických struktur, dlouhotrvající zánět může vygradovat i v poškození struktur fyziologických. Dochází tak jak k úbytku synapsí, a tedy neuronálních drah, tak i k celkovému poškození a smrti neuronů (obr.14). [68, 69]



Obrázek 14: Souhrn působení GSK-3 v rámci patogeneze Alzheimerovy choroby [71]

3.4.4.5 CYKLIN-DEPENDENTNÍ KINASY (CDK)

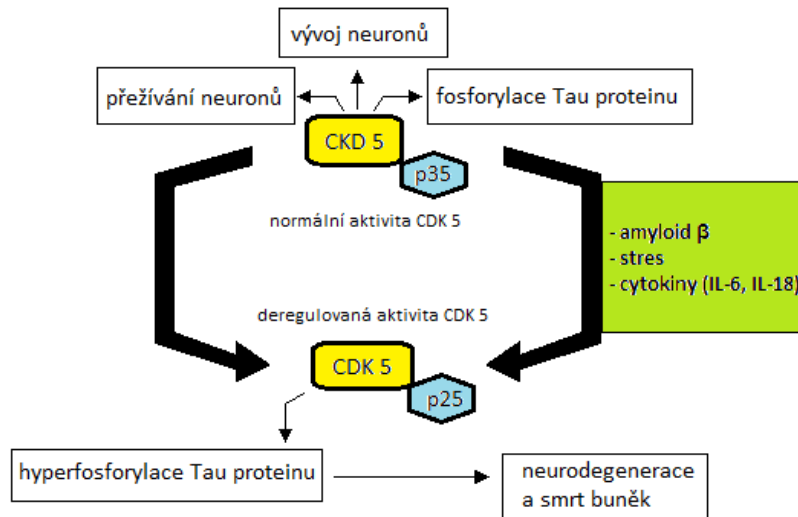
CDK jsou enzymy, patřící mezi serin-threonin kiny a hrají velmi důležitou roli při regulaci transkripce a buněčného cyklu. Existuje více typů CDK. Například CDK-5 významně ovlivňuje synaptickou plasticitu, učení, paměť a při *in-vitro* testování byla prokázána její role v ochraně neuronů před apoptózou. V patogenezi Alzheimerovy choroby se CDK-5 ukázala jako nejvlivnější z cyklin-dependentních kinas a spolu s GSK-3 patří mezi hlavní kiny zodpovědné za neurodegenerativní onemocnění. [68, 72]

Zvýšená aktivita CDK-5 přispívá k vyšší tvorbě β AP několika mechanismy. Vlivem zvýšené aktivity CDK-5, dochází k transkripční upregulaci BACE1 i stimulaci aktivity BACE1 a presenilinu 1. [68, 73] Zvýšené množství A β však může vyústit v další aktivaci CDK-5, a tak můžeme pozorovat, stejně jako u GSK-3, zpětnovazebnou pozitivní smyčku, kdy dochází k neustálé elevaci hladin A β [74].

Zvýšená aktivita CDK-5 působí i na podpůrné buňky neuronů. Uvnitř gliových buněk způsobují neuroinflamaci, která vyvodí k dalšímu uvolňování zánětlivých působků a tento proces pak také přispívá k celkové neurodegeneraci. [68]

Kromě předešlých mechanismů, přispívá deregulovaná CDK-5 i k odloučení tau proteinu z mikrotubulů. Tento jev je následován shlukováním tau do agregátů, jejichž vznik vede k neuronální smrti. p25 jako patologický aktivátor hraje významnou roli při přeměně

CDK-5 na „hyperreaktivní CDK-5“ a tak spolu vytváří stabilnější komplex, který přispívá k hyperfosforylaci tau v mozku. [74] Nicméně nejen CDK-5, ale i jiné podtypy CDK, jako je CDK-1 a CDK-2, se na hyperfosforylaci tau podílejí (Obr.15) [68].



Obrázek 15: Patologická aktivita CDK-5 při konverzi p35 na p25 [72]

Další patologický mechanismus, ve kterém hraje CDK-5 roli, je inaktivace peroxiredoxinu-1 a peroxiredoxinu-2. Tato akce vyústí v oxidativní stres a mitochondriální dysfunkci v neuronech mozkové kůry. Tyto procesy pak zapříčiní smrt nervových buněk a způsobí tak snížení hustoty mozkové tkáně. [74]

Z výše uvedeného vyplývá, že i inaktivace CDK, a to hlavně CDK-5 může přispět k deaktivaci určitých patologických procesů, které se na progresi Alzheimerovy choroby podílí [74].

3.4.5 Terapie Alzheimerovy choroby

Alzheimerova choroba představuje multifaktoriální onemocnění, z čehož vyplývá, že pro zacílení farmakoterapie existuje mnoho možností. Může jimi být modulace funkce či inhibice β a γ -sekretasy, snížení tvorby β -amyloidních plaků nebo jejich eliminace z mozku, snížení agregace Tau proteinu, redukce oxidativního stresu nebo také zvýšení cholinergní transmise atd. [3, 75] Přestože výzkum etiopatogeneze a patologie této neurodegenerativní

choroby odhalil mnoho mechanismů, které přispívají ke vzniku či progresi poruch s ní spojených, současná terapie se zaměřuje především na dva hlavní cíle. Prvním z nich je zvýšení hladiny ACh v mozku inhibováním jeho degradačních enzymů, cholinesteras (léčivé látky: donepezil, rivastigmin, galantamin). Druhým pak snížení glutamátovou navozenou neurotoxicitou prostřednictvím antagonizace N-methyl-D-aspartátových (NMDA) receptorů (léčivá látka: memantin).[3]

Inhibitory cholinesteras se využívají především v lehčích až středně těžkých stádiích této demence a mohou vést k přechodnému zlepšení symptomů a prodloužení doby setrvání v mírnějších fázích onemocnění. [76] Piperidinový derivát, donepezil, představuje reverzibilní nekompetitivní a vysoce selektivní centrálně působící inhibitor AChE, který existuje ve formě perorálního léčivého přípravku. Ze tří zmíněných inhibitorů cholinesteras má nejdelší biologický poločas eliminace (70 hodin), což umožňuje podání 1x za den a v organismu podléhá metabolizaci cytochromem P450, což může vést ke zvýšení množství interakcí s dalšími léčivy. [3] Léčba se kvůli snížení či eliminování výskytu nežádoucích účinků zahajuje nižší dávkou, která se v případě dobré tolerance po 4-8 týdnech terapie navyšuje na dávku 10 mg/den. [3, 76] Další látkou je karbamátový derivát rivastigmin, který je jak reverzibilním inhibitorem AChE, tak rovněž inhibitorem BuChE. Jako jediný z této skupiny látek může být, kromě perorální formy, aplikován také ve formě transdermální náplasti. Transdermální podání představuje významnou výhodu oproti perorálnímu podání, protože snižuje výskyt gastrointestinálních potíží, které jsou s rivastigminem spojeny. [3] Posledním zástupcem je isochinolinový alkaloid galantamin, dříve získávaný především z *Galanthus woronovii* (sněžěnka woronova), v současné době z cibulí druhů *Narcissus* spp. [33]. Ten, kromě reverzibilní kompetitivní inhibice AChE, dokáže alostericky modifikovat N receptory a tím usnadnit cholinergní transmissi [3]. Také podléhá metabolizaci cytochromem P450 a pacientům je jeho dávka většinou titrována ve třech stupních do maximální dávky 24 mg/den, kdy lze podávat buď 2x za den nebo alternativně 1x denně ve formě retardované [3, 77].

Jak již bylo zmíněno, druhou možností léčby Alzheimerovy choroby, je použití antagonisty NMDA receptorů, memantinu [78]. Během tohoto onemocnění dochází k hyperexcitaci NMDA receptorů, z důvodu zvýšené hladiny glutamátu a aspartátu v prostoru synaptické štěrby. Tato skutečnost vzniká na podkladě zvýšeného uvolňování, tak v případě

glutamátu i díky snížení jeho re-uptaku v některých oblastech mozku, jako je například hipokampus. Zvýšená aktivace NMDA receptorů způsobí zvýšený tok Ca^{2+} do neuronů a následnou aktivaci příslušných enzymů, což zvýší expresi některých genů. [77] Také se objevuje nadměrná tvorba kyslíkových radikálů a celý proces je následován poškozením až apoptózou jak glutamatergních, tak i cholinergních neuronů. Memantin dokáže blokovat vstup Ca^{2+} iontů do neuronálních buněk a tím snížit excitotoxické působení excitačního neurotransmiteru, glutamátu. Přesto však působení memantinu v terapeutické dávce cílí pouze na patologickou aktivitu receptorů a jejich fyziologická aktivita tak zůstává zachována. Navíc se u této léčivé látky projevuje i určité inhibiční působení na proteinkinasy, GSK3- β a na 5-HT₃ receptory. [77, 78] Antagonizace 5-HT₃ serotoninových receptorů dokáže potlačit nauzeu a narušenou gastrointestinální motilitu, což například zvyhodňuje kombináční terapii s donepezilem, u kterého se nežádoucí účinky spojené s gastrointestinálním traktem občas vyskytují [78]. Zvýše zmíněného vyplývá, že memantin je možné podat jak v monoterapii, tak i v kombinaci s inhibitory cholinesteras. Všeobecně se však doporučuje léčbu memantinem preskribovat až v případě výskytu střední až těžké demence. [76]

Aducanumab je nejnovější léčivo, které bylo v USA schváleno Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv. Jedná se o humánní IgG1 monoklonární protilátku, která se váže na N-konec A β . [79] Tento lék je podáván 1x za měsíc ve formě intravenózní infúze. Bohužel, v průběhu léčby se mohou vyskytnout nežádoucí účinky, jako je otok nebo krvácení do mozku [80]. V České republice, podle informací ze zasedání Výboru pro humánní léčivé přípravky Evropské agentury pro léčivé přípravky z prosince 2021, zatím Aduhelm, léčivý přípravek obsahující léčivou látku aducanumab, pro léčbu Alzheimerovy choroby registrován nebyl [81].

Jak již bylo dříve uvedeno, portfolio léčiv k farmakoterapii Alzheimerovy choroby není příliš rozsáhlé, přestože výzkum v oblasti léčby tohoto onemocnění neustále posouvá hranice dosavadního zjištění. Vzdávající počet lidí s demencí je však následován neustávající poptávkou po nových léčivých látkách. Tato skutečnost tedy dává obrovský prostor pro výzkum v této oblasti. Díky moderním metodám a novým technologiím se tak snad v blízké budoucnosti dočkáme nových léčivých přípravků k terapii této choroby. [77]

4 Experimentální část

4.1 Materiál a vybavení

4.1.1 Rozpouštědla a chemikálie

- | | | |
|---------------------------------|---|--------------------------------------|
| • Acetonitril HPLC gradient | (CH ₃ CN) | (Lach-Ner, Neratovice) |
| • Amoniak vodný roztok 25-29% | (NH ₃) | (Penta a.s., Praha) |
| • Cyklohexan č. | (cHex) | (Penta a.s., Praha) |
| • Diethylamin p. a. | (Et ₂ NH) | (Penta a.s., Praha) |
| • Ethanol 95% | (EtOH) | (Penta a.s., Praha) |
| • Ethylester kyseliny octové č. | (EtOAc) | (Penta a.s., Praha) |
| • Chloroform č. | (CHCl ₃) | (Penta a.s., Praha) |
| • Isopropylalkohol p. a. | (IPA) | (Penta a.s., Praha) |
| • Methanol HPLC gradient | (MeOH) | (J. T. Baker, Deventer, Netherlands) |
| • n-Propanol p. a. | (n-Prop) | (Penta a.s., Praha) |
| • Toulén p. a. | (To) | (Penta a.s., Praha) |
| • Chlorid rtuťnatý p. a. | (HgCl ₂) | (Penta a.s., Praha) |
| • Dusičnan bismutitý zásaditý | [Bi(NO ₃) ₃] | (Penta a.s., Praha) |
| • Jodid draselný č. | (KI) | (Lach-Ner, Neratovice) |
| • Kyselina vinná p. a. | (C ₄ H ₆ O ₆) | (Penta a.s., Praha) |
| • Voda destilovaná | (H ₂ O) | |

4.1.2 Chromatografické adsorbenty

- Pro přípravu preparativních litých desek pro TLC byl použit: Silica gel 60 GF₂₅₄ (Merck Millipore, Praha)
- Komerční analytické desky pro tenkovrstvou chromatografii Silica gel 60 GF₂₅₄ (Merck Millipore, Praha)

4.1.3 Pomocný materiál

- Křemelina Celite C 535 John's Manville (Sigma Aldrich, Praha)
- Sušící perly silikagelu (Penta a.s., Praha)
- Vata

4.1.4 Mobilní fáze pro tenkovrstvou chromatografii

Soustava (S x)	Rozpouštědla	Poměr
S 1	cHex + IPA + Et ₂ NH	90:5:5
S 2	cHex + Et ₂ NH	9:1
S 3	cHex + To + Et ₂ NH	2:7:1
S 4	To + EtOAc + MeOH (0,1% NH ₃)	10:3:1
S 5	IPA + nProp + ACN + NH ₃	5:85:10:0,05
S 6	cHex + To + Et ₂ NH	4:3:1
S 7	nProp + ACN + NH ₃	90:10:0,05
S 8	To + Et ₂ NH	9:1

Tabulka 3: Mobilní fáze pro tenkovrstvou chromatografii

4.1.5 Přístroje

- Vakuová rotační odparka Heidolph HEI-VAP Advantage (Heidolph Instruments GmbH & CO)
- Magnetická míchačka Heidolph MR3001 K (Heidolph Instruments GmbH & CO)
- Analytická váha KERN ABJ (KERN & SOHN GmbH)
- Ultrazvuková lázeň Sonorex Super 110P (Bandelin, Germany)
- GC-MS systém s GC zařízením typu 5975 inert MSD a MS detektorem typu Agilent Technologies 7890 (Agilent Technologies Inc.)
- Spektrometr Varian INOVA–500 NMR (Varian Inc.)
- Polarimetr P3000 (A. Krüss Optronic, Hamburg, Germany)

4.1.6 Detekční čidla

- **Dragendorffovo čidlo**

Slouží k detekci alkaloidů a sloučenin, které ve své struktuře obsahují navázaný dusík.

Zásobní roztok čidla: vznikne smícháním roztoku A a roztoku B v poměru 1:1

- **Roztok A:** vznikne rozpuštěním 1,7 g bazického $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$ a 20 g $\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_6$ v 80 ml H_2O
- **Roztok B:** vznikne rozpuštěním 16 g KI ve 40 ml H_2O

Dragendorffovo činidlo detekční: vznikne přidáním 10 g $\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_6$ a 50 ml H_2O k 5 ml zásobního roztoku

4.2 Obecné postupy

4.2.1 Příprava a uchování rozpouštědel

Veškerá rozpouštědla byla před vlastním použitím predestilována a pro zachování požadované kvality byla dále uchována v obalech z tmavého skla (chráněna před světlem).

4.2.2 Příprava litých desek pro preparativní TLC

Skleněné desky použité pro preparativní TLC byly před nanášením důkladně zbaveny za použití chloroformu nečistot a mastnoty. Na skleněné desky, o rozměru 15 x 15 cm, byla nanesena v tenké rovnoměrné vrstvě suspenze silikagelu (6,5 g silikagelu ve 20,5 ml vody), která se nechala schnout po dobu minimálně 24 hodin.

4.2.3 Nános vzorku a preparativní tenkovrstvá chromatografie

Obsah baňky s příslušnou směsí alkaloidů byl rozpuštěn v malém množství chloroformu, ethanolu, ethylacetátu nebo methanolu, případně kombinací rozpouštědel.

Roztok byl nanesen pomocí pera ve vodorovné linii na komerční nebo lité TLC desky tak, aby byla linie nánosů alespoň 1 cm od krajů a aby množství nepřesahovalo $3 \text{ mg}\cdot\text{cm}^{-3}$ u desek litých a $1 \text{ mg}\cdot\text{cm}^{-3}$ u komerčních desek. Po nanesení se roztok nechal zaschnout a následně se lité desky vyvíjely v komorách nasycených mobilní fází. Po ukončení vyvíjení se desky vyjmuly z komory a nechaly odstát nebo se sušily pod proudem teplého vzduchu. K vyvíjení mohlo docházet i opakovaně za použití stejné či jiné mobilní fáze, tak aby byla zajištěna dostatečná separace jednotlivých zón alkaloidů.

4.2.4 Detekce alkaloidů pod UV lampou

Po vytěkání mobilní fáze byly chromatogramy detekovány pod UV při vlnové délce 254 nm, oblast výskytu alkaloidu byla tmavá (docházelo k pohlcení vlnové délky a nedocházelo

k fluorescenci přísady v silikagelu). Zóny o stejném R_f byly poté seškrábány a spojeny v kádinkách.

4.2.5 Eluce

Po seškrábání daných zón bylo nutné oddělit alkaloid od silikagelu. Nejprve byl vyškrábáný silikagel smísen s křemelinou v poměru 1:1 a následně byla tato směs umístěna na vrstvičku vaty do eluční trubice. Materiál byl vymýván směsí rozpouštědel EtOH + CHCl₃ 1:1, případně čistým methanolem. V průběhu eluce byla detekována přítomnost alkaloidu kapilárou a nanesením na malý kousek TLC hliníkové desky pomocí Dragendorffova činidla.

4.2.6 Odpařování

K odpaření rozpouštědel z různých fází zpracování frakce byla použita vakuová odparka, kde za sníženého tlaku při teplotě 30–40 °C. Menší objemy byly odpařovány v digestoři na vodní lázni při teplotě 50°C.

4.2.7 Sušení a skladování

Alkaloidy a jejich směsi byly skladovány v lednici za teploty 2–8 °C, případně pak v mrazáku, pokud byl detekován jejich rozklad (viditelná změna barvy z bílé do žluto-oranžova).

Sušení pak probíhalo v exsikátoru po minimální dobu 24 hodin.

4.2.8 Strukturní analýza

4.2.8.1 GS-MS analýza

Pro analýzu daných alkaloidů byl použit plynový chromatograf Agilent 7890A GC 5975 s hmotnostním detektorem při elektronové ionizaci 70 eV. Pro tento proces byl nastaven teplotní program 100 °C (1 min), 100–180 °C (15 °C/min), 180 °C (1 min), 180–300 °C (10 °C/min) 300 °C (12 min) a separace proběhla na koloně HP-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm, Agilent Technologies, USA). Helium, které zde zastupovalo funkci nosného plynu mělo průtokovou rychlost 1 ml/min. Nástřik 1 μl methanolického alkaloidního roztoku (zředěný v poměru 1:10) proběhl při teplotě 270 °C ve split módu. Alkaloidy byly detekovány na základě porovnání výstupních spekter s již známými spektry, která byla dostupná v komerční knihovně spekter NIST 11 (National Institute of Standards and Technology Library, USA).

4.2.8.2 NMR analýza

Pro měření NMR spekter byl použit spektrometr VNMR S500, měření probíhalo za teploty 25 °C. Přístroj pracoval při frekvenci 499,87 MHz pro jádra ^1H a 125,70 MHz pro jádra ^{13}C . Chemické posuny byly zaznamenávány jako hodnoty δ vyjádřené v pars per milion (ppm) a byly vztaženy na hodnoty vnitřního standardu (TMS). Spektra byla měřena v různých prostředích. V CDCl_3 byly hodnoty chemického posunu pro atomy ^1H $\delta = 7,26$ ppm a pro ^{13}C $\delta = 77,0$ ppm. Naměřená data jsou ve výsledcích uváděna v pořadí: chemický posun (δ), integrovaná intenzita ^1H NMR spekter, multiplicita (s = singlet, d = dublet, t = triplet, q = kvartet, dd = dublet dubletů, m = multiplet, bs = široký singlet) a interakční konstanta J (v Hz).

4.2.8.3 Polarimetrie

Optická otáčivost získaných alkaloidů byla měřena pomocí polarimetru P3000. Alkaloidy byly před vlastním měřením rozpuštěny v CHCl_3 . Následně se podle níže uvedeného vzorce vypočetla specifická otáčivost, která byla poté porovnána s odbornou literaturou

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

t – teplota měření [°C]

D – sodíková čára ($\lambda = 589,3$ nm)

α – naměřená otáčivost [°]

c – koncentrace látky [g × 100ml]

l – délka kyvety [dm]

4.3 Stanovení biologické aktivity

4.3.1 Chemikálie

- Acetylthiocholin jodid p. a. (ATChI) (Sigma Aldrich, Praha)
- Butyrylthiocholin jodid p. a. (BuTChI) (Sigma Aldrich, Praha)
- Dihydrogenfosforečnan draselný bezvodý p. a. (KH_2PO_4) (Lach-Ner, Neratovice)
- Dihydrogenfosforečnan sodný dihydrát p. a. ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (Penta, Praha)
- Dimethylsulfoxid p. a. (DMSO) (Sigma Aldrich, Německo)
- 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina $\geq 98\%$ (DTNB) (Sigma Aldrich, Praha)
- Hydrogenfosforečnan disodný bezvodý p. a. (NaH_2PO_4) (Penta, Praha)
- Chlorid sodný p. a. (NaCl) (Lachema, Brno)
- Galantamin hydrobromid 95% (Chengasha Organic Herb Inc., China)
- Huperzin A 95% (TAZHONGHUI) (Tai'an zhounghui Plant Biochemical Co., Ltd., China)

4.3.2 Přístroje pro stanovení inhibiční aktivity vůči *hAChE* a *hBuChE*

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

4.3.3 Činidla pro stanovení inhibiční aktivity vůči *hAChE* a *hBuChE*

Roztok 5mM DTNB: roztok byl připraven přímým rozpuštěním naváženého množství DTNB v takovém množství 100mM fosfátovém pufru pH 7,4, aby vznikl 5mM roztok. Roztok je slabě nažloutlý. Činidlo bylo uchováváno v chladničce při 4 °C po dobu maximálně 1 týden.

Roztok 10mM ATChI: roztok byl připraven rozpuštěním odpovídajícího množství látky ve vodě, aby bylo dosaženo koncentrace 10 mM a roztok zůstal čirý. Činidlo bylo uchováváno v chladničce při 4 °C po dobu maximálně 1 týdne.

Roztok 10mM BuTChI: roztok byl připraven rozpuštěním odpovídajícího množství látky ve vodě, aby bylo dosaženo koncentrace 10 mM a roztok zůstal čirý. Činidlo bylo uchováváno v chladničce při 4 °C po dobu maximálně 1 týdne.

100mM fosfátový pufr o pH 7,4: pufr byl připraven smísením 57 ml roztoku A, 243 ml roztoku B a 300 ml vody. Zásobní roztok A je 200mM roztokem NaH_2PO_4 (1 litru roztoku

obsahuje 24,0 g NaH₂PO₄). Zásobní roztok B je 200mM roztokem Na₂HPO₄ (1 litru roztoku obsahuje 28,4 g Na₂HPO₄).

4.3.4 Příprava rekombinantních enzymů

Enzymy jsou připravovány rekombinantní technologií na Katedře chemie, Přírodovědné fakulty, Univerzity Hradec Králové. Používá se médium obsahující enzymy, které se v čas potřeby naředí 100mM fosfátovým pufrům o pH 7,4 tak aby hodnota absorbance byla pro AChE 0,08 – 0,15 a pro BuChE 0,15 – 0,20. Médium je rozpipetováno dle potřeby (dle vypočítaného množství potřebného pro následné ředění k měření) do eppendorfek, zamraženo a uchováváno v mrazáku při teplotě -22 °C do doby použití.

4.3.5 Vlastní stanovení inhibiční aktivity izolovaných alkaloidů

Pro stanovení hodnoty IC₅₀ byla použita Ellmanova spektrofotometrická metoda s použitím 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoové kyseliny (DTNB) [$\lambda = 436 \text{ nm}$ (AChE), nebo $\lambda = 412 \text{ nm}$ (BuChE) při použití krve, při použití rekombinantních enzymů se oboje měří při $\lambda = 412 \text{ nm}$]. Během stanovení je sledován nárůst absorbance za 1 min. Hodnoty IC₅₀ jsou vypočítány ze získaných hodnot poklesu aktivity AChE nebo BuChE nelineární regresí v programu GraphPaD Prism (verze pro Windows; výrobce GraphPaD Software, San Diego, CA, USA). Výsledky byly porovnány s hodnotami IC₅₀ známých inhibitorů cholinesteras: galantaminem, huperzinem A a berberinem. Procenta inhibice (% I) jsou počítána podle vzorce:

$$[\%] I = 100 - \frac{\Delta A_{BL}}{\Delta A_{SA}} \times 100$$

% I – procento inhibice

ΔA_{BL} – pokles absorbance slepého vzorku během 1 min

ΔA_{SA} – absorbance testovaného vzorku během 1 min

Stanovení aktivity enzymů: do 6 jamek mikrotitrační destičky je napipetováno 8,3 μl média a přidáno 283 μl 5mM DTNB a 8,3 μl DMSO, vše je po dobu 1 min promícháváno na mikrotřepačce a poté je směs inkubována v komoře readeru při 37 °C po dobu 5 minut.

Po inkubaci je přidáno 33,3 μ l roztoku substrátu (10mM ATChI nebo 10mM BuTChI) a při vlnové délce 412 nm je proměřena absorbance. Způsobem popsaným výše je vypočten rozdíl a stanovena průměrná hodnota inhibice se směrodatnou odchylkou.

Stanovení aktivity látek: do mikrotitrační destičky jsou použity stejné objemy činidel a roztoku substrátu a shodný je též postup měření jako pro stanovení aktivity enzymů, ale místo 8,3 μ l DMSO se pipetuje roztok látky příslušné koncentrace. Pro každou látku je použito 6 jamek (1 řada) a do poslední řady je pipetován DMSO jako slepý vzorek. Nejprve se provádí screeningové měření, kdy se všechny látky měří při 100 μ M. U látek, které vykazují při této koncentraci inhibiční potenciál vyšší než 50 %, je stanovena IC_{50} . Pro měření IC_{50} látky jsou dle zjištěného screeningu vybrány vhodné koncentrace.

Získané inhibiční aktivity IC_{50} hAChE a IC_{50} hBuChE pro jednotlivé látky byly porovnávány s inhibičními aktivitami referenčních látek – galantaminem, huperzinem A a berberinem.

4.4 Izolace

4.4.1 Rostlinný materiál

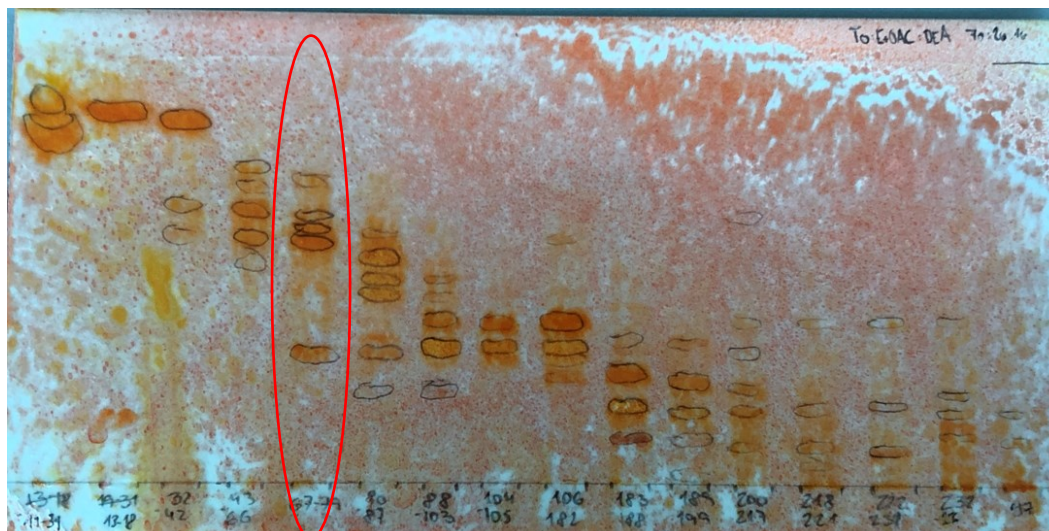
Rostlinný materiál byl objednán u firmy Amazon Herbs Surinam. Drogou byla nařezaná kůra stromu GV Allemão v množství 45,3 kg. Verifikace byla provedena prof. RNDr. Lubomírem Opletalem, CSc. V rámci předchozích diplomových prací na katedře byl proveden prvotní screening v rámci něhož byla zjištěna zajímavá inhibiční aktivita vůči lidským cholinesterásám (IC_{50} AChE = 15,19 \pm 0,96 μ g/ml a IC_{50} BuChE = 0,37 \pm 0,049 μ g/ml). Následně byla provedena sloupcová chromatografie etherového alkaloidního extraktu, kdy došlo k základnímu rozdělení na 16 frakcí. V rámci mé diplomové práce, byla zpracována frakce GV-5.

4.4.2 Preparativní tenkovrstvá chromatografie

4.4.2.1 Zpracování frakce GV-5

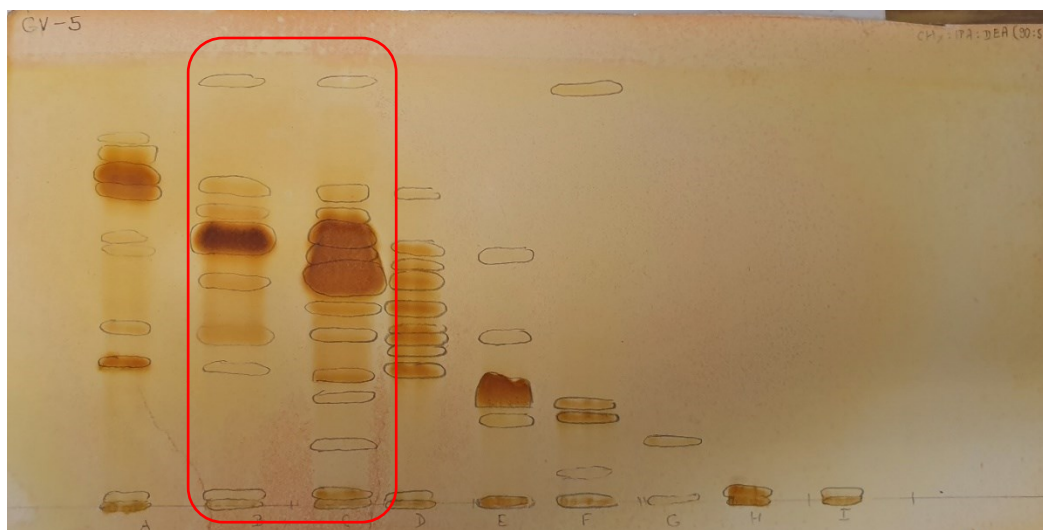
Frakce GV-5 (Obr.16) o hmotnosti 0,85616 g byla podrobena GC/MS analýze, která byla porovnána s TLC destičkou, aby bylo orientačně zjištěno, kolik se ve frakci nachází alkaloidů. V rámci další práce se našla vhodná vyvíjecí směs pro rozdělení této frakce. Jako nejvhodnější

se jevila soustava S1. Frakce GV-5 byla rozpuštěna v 15ml směsi EtOH + CHCl₃ (1:1) a byla nanášena na 24 litých desek. Došlo k rozdělení do 9 podfrakcí, očíslovaných A-I.



Obrázek 16: Souhrnné TLC frakcí GV po detekci Dragendorffovým činidlem vyvíjeno 1x v soustavě To:EtOAc:DEA 70:20:10

Rozdělení jednotlivých podfrakcí bylo detekováno pod UV lampou a následně byly jednotlivé zóny označeny a seškrábány. Vyškrabaný silikagel s alkaloidy byl promísen s křemelinou v poměru 1:1 a alkaloidy byly vylučovány směsí EtOH a CHCl₃ (1:1). Přítomnost alkaloidů v roztoku byla kontrolována pomocí Dragendorffova činidla. Po eluci byly jednotlivé podfrakce odpařeny do sucha a následně zváženy (Tab.4). Pro ověření správné separace alkaloidů bylo provedeno kontrolní TLC, které bylo vyvíjeno ve dvou mobilních soustavách (S 1 a S 2) (Obr.17). Pro další zpracování byly vybrány podfrakce GV-5-B a GV-5-C.



Obrázek 17: TLC všech podfrakcí GV-5 v S 1

Název frakce	Hmotnost (mg)
GV-5-A	37,8
GV-5-B	188,7
GV-5-C	200,6
GV-5-D	181,7
GV-5-E	52,1
GV-5-F	8,8
GV-5-G	21,6
GV-5-H	21,7
GV-5-I	31,0

Tabulka 4: Hmotnosti frakcí GV-5-A až GV-5-I

4.4.2.1.1 Zpracování podfrakce GV-5-B

Podfrakce GV-5-B o hmotnosti 188,7 g byla rozpuštěna ve směsi CHCl_3 a EtOH (1:1) a byla nanášena na 6 litých skleněných desek. Byla vyvíjena ve směsi S 3 jedenkrát. Byly separovány 4 zóny GV-5-B-1, GV-5-B-2, GV-5-B-3 a GV-5-B-4 (Tab.5).

Název frakce	Hmotnost (mg)
GV-5-B-1	5,9
GV-5-B-2	4,0
GV-5-B-3	152,7
GV-5-B-4	7,1

Tabulka 5: Hmotnosti podfrakcí GV-5-B

Z podfrakce GV-5-B-3 byla po rozpuštění v CHCl_3 a EtOH pomocí rekrytalizace získána bílá krystalická látka, která byla označena jako GV-5-B-3-A (45 mg), matečný louh byl uchován pod označením GV-5-B-3-B v mrazáku, protože docházelo k rozkladu směsi alkaloidů.

Látka označená jako GV-5-B-3-A byla podrobena GC-MS analýze a byla zjištěna její molekulová hmotnost $M_r = 266$.

4.4.2.1.2 Zpracování podfrakce GV-5-C

Podfrakce GV-5-C byla rozpuštěna a nanášena na 8 litých skleněných desek. Jako vyvíjecí směs byla použita soustava S 4 a desky v ní byly vyvinuty 2x. Tímto způsobem bylo separováno pět zón, které byly označeny GV-5-C-1 až GV-5-C-5 (Tab.6).

Název frakce	Hmotnost (mg)
GV-5-C-1	44,3
GV-5-C-2	47,5
GV-5-C-3	22,8
GV-5-C-4	16,7
GV-5-C-5	9,1

Tabulka 6: Hmotnosti podfrakcí GV-5-C

Pro další izolaci alkaloidů byla použita podfrakce **GV-5-C-2**, která byla nanášena na 5 komerčních desek o rozměru 10 × 20 cm a byla vyvíjena v soustavě S 5. Po detekci pod UV a pomocí Dragendorffova činidla byly vyškrabány 3 zóny, které byly označeny GV-5-C-2-A, B a C (Tab.7).

Název frakce	Hmotnost (mg)
GV-5-C-2-A	7,7
GV-5-C-2-B	20
GV-5-C-2-C	3,1

Tabulka 7: Hmotnosti podfrakcí GV-5-C-2

Podfrakce GV-5-C-2-B byla nanášena na dvě komerční desky a přečištěna v soustavě S 6 a S 7, která nám oddělila přítomné nečistoty. Byla získána látka GV-5-C-2-B-1 o hmotnosti 15 mg, která měla bílý krystalický charakter. Tato látka byla podrobena GC/MS analýze a bylo zjištěno, že předpokládaná $M_r = 296$.

Dále byla zpracována podfrakce **GV-5-C-4**, která byla rozpuštěna a nanesena na dvě komerční silikagelové desky o rozměru 10 × 20 cm. Pro vyvíjení byla použita soustava S 8, která vedla k rozdělení na 4 dobře separované zóny označené jako GV-5-C-4-A až D (Tab.8).

Název frakce	Hmotnost (mg)
GV-5-C-4-A	4,4
GV-5-C-4-B	1,0
GV-5-C-4-C	9,2
GV-5-C-4-D	1,6

Tabulka 8: Hmotnosti podfrakcí GV-5-C-4

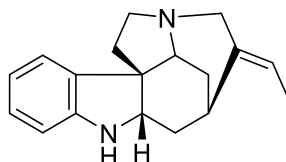
Po vyeluování a odpaření podfrakce GV-5-C-4-C byla získána bílá práškovitá látka, která byla detekovatelná pomocí GC/MS. Z plynové chromatografie byla získána předpokládaná molekulová hmotnost $M_r = 384$.

5 Výsledky

5.1 GV-5-B-3-A — (+)-19,20-dehydrotubifolidin

Sumární vzorec: C₁₈H₂₂N₂

Molekulová hmotnost: 266,39



Obrázek 18: Strukturní vzorec (+)-19,20-dehydrotubifolidinu

5.1.1 NMR analýza

Alkaloid byl identifikován na základě porovnání získaných ¹³C a ¹H spekter s odbornou literaturou [82].

5.1.2 GC-MS analýza

EI-MS m/z (%) M⁺ 267 (15), 266 (73), 144 (20), 143 (25), 137 (10), 136 (100), 130 (31), 122 (17), 81 (11), 77(10)

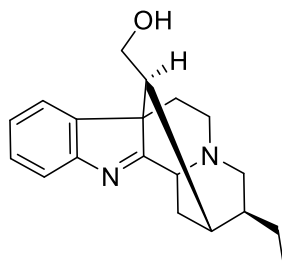
5.1.3 Otická otáčivost

$[\alpha]_D^{25} = + 152^\circ$ (c = 0,38; CHCl₃)

5.2 GV-5-C-2-B-1 — Geissoreticulatin

Sumární vzorec: C₁₉H₂₄N₂O

Molekulová hmotnost: 296,19



Obrázek 19: Strukturní vzorec geissoreticulatinu

5.2.1 NMR analýza

Alkaloid byl identifikován na základě porovnání získaných ¹³C a ¹H spekter s odbornou literaturou [83].

5.2.2 MS analýza

EI-MS m/z (%) M⁺ 296 (68), 278 (34), 265 (24), 236 (42), 222 (31), 194 (100), 180 (55), 167 (35), 135 (68), 123 (68), 94(62)

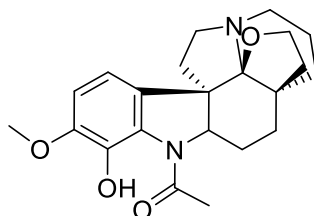
5.2.3 Optická otáčivost

$[\alpha]_D^{25} = -135^\circ$ (c = 0,12; CHCl₃)

5.3 GV-5-C-4-C — Aspidolimidin

Sumární vzorec: C₂₂H₂₈N₂O₄

Molekulová hmotnost: 384,20



Obrázek 20: Strukturální vzorec aspidolimidinu

5.3.1 NMR analýza

Alkaloid byl identifikován na základě porovnání získaných ¹³C a ¹H spekter s odbornou literaturou [83].

5.3.2 GC-MS analýza

EI-MS m/z (%) M+ 385 (7), 384 (25), 356 (27), 341 (11), 340 (37), 339 (22), 161 (13), 160 (25), 139 (10), 138 (100)

5.3.3 Optická otáčivost

$[\alpha]_D^{25} = + 230^\circ$ (c = 0,51; CHCl₃)

5.4 Biologická aktivita izolovaných alkaloidů

U izolovaných alkaloidů byla změřena jejich inhibiční aktivita vůči AChE a BuChE. Pokud alkaloid vykazoval zvýšenou aktivitu, byla dále stanovena IC₅₀ u příslušné enzymatické inhibice (Tab.9).

	% inhibice AChE (100 μM)	IC ₅₀ AChE (μM)	% inhibice BuChE (100 μM)	IC ₅₀ BuChE (μM)
(+)-19,20- dehydrotubifolidin	5,30 ± 3,92	-	54,31 ± 2,12	64,06 ± 7,00
Aspidolimidin	3,24 ± 0,39	-	31,92 ± 5,43	-
Geissoreticulatin	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Galantaminst	-	1,71 ± 0,07	-	42,30 ± 0,07
Huperzin Ast	-	0,03 ± 0,01	-	>500
Berberinst	-	0,71 ± 0,10	-	30,72 ± 3,49

Tabulka 9: Porovnání inhibiční aktivity izolovaných alkaloidů – n.d. – neměřeno, st - standard

6 Diskuze a závěr

Etiopatogeneze Alzheimerovy choroby je velmi komplikovaná a doposud ne plně objasněná. Struktur, které lze při léčbě tohoto typu demence ovlivnit, existuje mnoho a lze u nich pozorovat vzájemné propojení.

Působení AChE a BuChE zapříčiňuje snížení hladin ACh v synaptických štěrbinách, kterého je už i tak, z důvodu poklesu počtu cholinergních neuronů, nedostatek. To vede k menší aktivaci acetylcholinových receptorů. Zároveň dochází vlivem AChE a BuChE k tvorbě více toxického komplexu těchto enzymů a A β . A β tvořící se na podkladě štěpení nevhodnými sekretasami přispívá k porušení neuronálních drah a celých neuronů. K tomu se přidává poškození těchto nervových buněk zevnitř z důvodu poškození vnitřních drah buňky, tedy cytoskeletu na podkladě hyperfosorylovaného Tau proteinu. Na tom se podílejí hlavně GSK-3 a CDK-5, které ještě zhoršují situaci zpětnovazebnou pozitivní smyčkou. GSK-3 zároveň snižuje množství vzniklého ACh blokováním vzniku jeho prekurzorů a způsobuje tak jeho nedostatek. Celkově mají tyto kinasy dopad i na okolí neuronů a způsobují tak zánět, který z dlouhodobého hlediska ještě zesiluje už tak znatelný úbytek mozkové tkáně. Celkové propojení tohoto mechanismu umožňuje zacílením pouze na jeden článek ovlivnit i další, které jsou v patogenezi této demence zahrnuty. [66, 68, 70, 74]

Cílem všech vědeckých pracovníků, kteří se zabývají problematikou Alzheimerovy choroby, tak bude nalézt nejvhodnější cílovou strukturu a léčivo, které bude mít největší dopad na zabránění progresu celého tohoto komplikovaného a opakujícího se procesu. Jedním z kandidátů může být i alkaloid, či alkaloidy izolované z GV, které se mohou stát lékem nesoucím tuto schopnost, nebo alespoň předlohou pro jeho vznik.

Obsahové látky kůry stromu GV byly již v mnoha studiích podrobeny testování jejich biologické aktivity [1]. V rámci prvotního screeningu tohoto rostlinného materiálu provedeného na Farmaceutické fakultě UK, byla zaznamenána zajímavá inhibiční aktivita vůči lidským cholinesterasám ($IC_{50\text{ AChE}} = 15,19 \pm 0,96 \mu\text{g/ml}$ a $IC_{50\text{ BuChE}} = 0,37 \pm 0,049 \mu\text{g/ml}$). Tato skutečnost byla podnětem k hledání a bližšímu zkoumání látky, která by byla nositelem příslušného účinku, a která by nejlépe inhibovala AChE nebo vykazovala významnou inhibici vůči oběma zmíněným enzymům. V předchozích diplomových pracích byl z kůry získán alkaloidní extrakt, který byl pomocí sloupcové chromatografie rozdělen na 16 frakcí.

Téma této diplomové práce tvořila izolace látek z frakce GV-5. Ta byla podrobena dělení pomocí preparativní TLC, se snahou získat alespoň 3 alkaloidy v čisté podobě. Po prvním dělení bylo získáno 9 podfrakcí, ze kterých byly následně vybrány dvě, u nichž byla vyšší pravděpodobnost získání čistých látek v dostatečné hmotnosti pro následné zkoumání. První z nich byla podfrakce GV-5-B, ze které se pomocí preparativní TLC získal alkaloid (+)-19,20-dehydrotubifolidin pod označením GV-5-B-3-A o hmotnosti 45 mg. Druhou představovala podfrakce GV-5-C, která byla rozdělena na 5 podfrakcí, z nichž GV-5-C-2 a GV-5-C-4 byly podrobeny dalšímu dělení. Z podfrakce GV-5-C-2 byla získána látka GV-5-C-2-B-1, identifikována jako alkaloid geissoreticulatin s hmotností 15 mg. Podfrakce GV-5-C-4 byla rozdělena na 4 podfrakce, z nichž podfrakce GV-5-C-4-C představovala indolový alkaloid aspidolimidin s hmotností 9,2 mg. Všechny zmíněné látky byly identifikovány pomocí GC-MS a NMR analýzy, na základě porovnání jejich spekter se spektry z dostupných zdrojů a pomocí polarimetrie, porovnáním vypočtené specifické otáčivosti s odbornou literaturou. V další fázi diplomové práce byly poté dva z izolovaných alkaloidů podrobeny testování na schopnost inhibice rekombinantně připravených cholinesteras.

Stanovení inhibiční aktivity proběhlo pomocí Ellmanovy spektrofotometrické metody a následně byla vypočtena procenta inhibice enzymů danými alkaloidy. Aspidolimidin vykazoval nízké hodnoty inhibice AChE ($3,24 \pm 0,39$ %) BuChE ($31,92 \pm 5,43$ %), takže nebyly u dané látky stanoveny hodnoty IC_{50} . Druhý alkaloid, (+)-19,20-dehydrotubifolidin, nevykazoval dostatečnou procentuální inhibicí vůči AChE ($5,30 \pm 3,92$ %), ale vůči BuChE byla inhibiční aktivita dostatečně vysoká ($54,31 \pm 2,12$ %) pro následné stanovení IC_{50} . Tato hodnota činila $IC_{50} = 64,06 \pm 7,00$ μ M, ale ve srovnání se standardy galantaminem ($IC_{50} = 42,30 \pm 0,07$ μ M) a berberinem ($IC_{50} = 30,72 \pm 3,49$ μ M) se nejeví příliš významnou.

Na základě získaných výsledků lze tedy konstatovat, že izolované alkaloidy aspidolimidin a (+)-19,20-dehydrotubifolidin nepředstavují látky, které by byly vhodnými kandidáty pro potenciální vzor nového léčiva s mechanismem účinku na principu inhibice AChE či BuChE. Nicméně by mohly sloužit jako předloha pro syntézu parciálních derivátů.

U těchto látek by se dále mohla v budoucnu změřit aktivita vůči GSK-3 β , která představuje také jeden z možných farmakoterapeutických cílů v léčbě Alzheimerovy choroby.

Alkaloid aspidolimidin byl již dříve podroben *in-vitro* testování na antimalarickou aktivitu, která u něj byla prokázána [84]. Tato aktivita by mohla být změřena také u dalších izolovaných látek- (+)-19,20-dehydrotubifolidinu a geissoreticulatinu. Extrakt z kůry GV již v dřívějších studiích vykazoval zajímavé inhibiční působení proti nádorovým buňkám [85], dále by tedy alkaloidy mohly být podrobeny testování na cytotoxickou aktivitu.

Jak již bylo zmíněno dříve, spektrum účinků alkaloidů i jiných obsahových látek z kůry GV je široké. Dosud však nebyly objeveny všechny látky, které se v dané rostlině nachází, a tak se nabízí prostor pro pokračování v jejich izolaci a následné testování jejich biologické aktivity.

7 Abstrakt

Lucie Váňová: Izolace alkaloidů druhu *Geissospermum vellosii* Allemão a studium jejich biologické aktivity VI. Diplomová práce, Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra farmakognozie a farmaceutické botaniky, Hradec Králové 2022.

Klíčová slova: kůra, *Geissospermum vellosii* Allemão, alkaloidy, preparativní TLC, GC-MS, NMR, (+)-19,20-dehydrotubifolidin, aspidolimidin, geissoreticulatin, inhibiční aktivita, AChE, BuChE, Alzheimerova choroba

Cílem této diplomové práce byla izolace alespoň tří alkaloidů v čisté formě z frakce GV-5, která pocházela z kůry jihoamerického stromu *Geissospermum vellosii* Allemão. Z této frakce se pomocí preparativní tenkovrstvé chromatografie (TLC) získalo 9 podfrakcí (GV-5-A až GV-5-I). Ty, které se vyznačovaly dostatečnou hmotností, byly následně podrobeny dalšímu dělení. Přečištěním pomocí preparativní TLC byly izolovány tři alkaloidy v čisté formě, a to konkrétně: GV-5-B-3-A, GV-5-C-4-C, GV-5-C-2-B-1.

Získané obsahové látky byly poté analyzovány prostřednictvím plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií (GC-MS) a nukleární magnetické rezonance (NMR). Pomocí porovnání získaných spekter s dostupnými daty a literaturou, byly získané alkaloidy identifikovány jako: (+)-19,20-dehydrotubifolidin (GV-5-B-3-A), aspidolimidin (GV-5-C-4-C) a geissoreticulatin (GV-5-C-2-B-1).

U identifikovaných indolových alkaloidů (+)-19,20-dehydrotubifolidinu a aspidolimidinu byla následně zkoušena jejich *in-vitro* inhibiční aktivita vůči enzymům acetylcholinesterase (AChE) a bytyrylcholinesterase (BuChE) pomocí Ellmanovy spektrofotometrické metody. Díky nízké aktivitě, v porovnání se standardy galantaminem, huperzinem A a berberinem, nebyla ani u jedné z látek stanovena IC_{50} vůči AChE a pouze u (+)-19,20-dehydrotubifolidinu proběhlo stanovení IC_{50} vůči BuChE ($IC_{50} = 64,06 \pm 7,00 \mu M$). Ze získaných výsledků tak vyplývá, že tyto alkaloidy se nevyznačují příliš velkým potenciálem k využití v terapii Alzheimerovy choroby na principu inhibitorů cholinesteras, které se dnes v léčbě tohoto onemocnění využívají.

8 Abstract

Lucie Váňová: Isolation of alkaloids of the species *Geissospermum vellosii* Allemão and study of their biological activity IV. Diploma thesis, Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Department of Pharmacognosy and Pharmaceutical Botany, Hradec Králové 2022.

Key words: bark, *Geissospermum vellosii* Allemão, alkaloids, preparative TLC, GC-MS, NMR, (+)-19,20-dehydrotubifolidine, aspidolimidine, geissoreticulatine, inhibition activity, AChE, BuChE, Alzheimer's disease

The aim of this diploma thesis was the isolation of at least 3 alkaloids in pure form from the GV-5 fraction, which was extracted from the bark of the South American tree *Geissospermum vellosii* Allemão. By using preparative thin layer chromatography (TLC), 9 subfracions (GV-5-A až GV-5-I) were acquired from this fraction. Those that were of sufficient mass were subsequently subjected to further division. Three alkaloids in pure form were isolated through purification using preparative TLC: GV-5-B-3-A, GV-5-C-4-C, GV-5-C-2-B-1.

Gained active substances from this plant were analyzed by gas chromatography-mass spektrometry (GC-MS) and nuclear magnetic resonance (NMR). By comparing the obtained alkaloid's spectra with available data and literature, those alkaloids were identified as: (+)-19,20-dehydrotubifolidine (GV-5-B-3-A), aspidolimidine (GV-5-C-4-C) and geissoreticulatine (GV-5-C-2-B-1).

The identified indol alkaloids (+)-19,20-dehydrotubifolidine and aspidolimidine were subsequently *in-vitro* tested for their inhibition activity against acetylcholinesterase (AChE) and bytyrylcholinesterase (BuChE) using Elleman's spectrofotometric method. Due to low activity of isolated alkaloids, comparing to standards galanthamine, huperzine A and berberine, there was no IC₅₀ for inhibition of the AChE determined for any of them and only for (+)-19,20-dehydrotubifolidine the IC₅₀ against BuChE was determined (IC₅₀ = 64,06 ± 7,00 μM). The obtained results from this study show that the isolated alkaloids do not have a significant potential for use in the treatment of the Alzheimer's disease on the principle of cholinesterase inhibitors drugs, which are nowadays used to cure this illness.

9 Literatura

1. M. J. S. Vital, A. L. B. Carneiro, L. F. Rocha, R. C. das Neves Amorim, M. R. M. Camargo and A. M. Pohlit, *Chemical composition, ethnopharmacology and biological activity of Geissospermum Allemão species (Apocynaceae juss.)*, Revista Fitos **8** (2013), no. 2, 73-160.
2. WHO, "Dementia,": <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dementia>, staženo 26. 11. 2021.
3. M. Vališ, F. Caisberger, L. Šimůnek and H. Linková, *Farmakoterapie demenci–pokroky v léčbě a aktuální doporučení*, Remedia **23** (2013), no. 6, 396-399.
4. C. A. Coelho, B. S. Amorim, M. R. Pereira, F. N. Cabral, P. M. Albuquerque and J. Morales, *A Novelty from Underexplored Amazon: Mandevilla manicorensis (Apocynaceae)*, Systematic Botany **45** (2020), no. 2, 323-327.
5. J. Luděk, *Farmakobotanika: semenné rostliny*, str. 138-139, Vyd. 3., upr. a dopl. , Charles University in Prague, Karolinum Press, 2011.
6. A. Skiryycz, S. Kierszniowska, M. Méret, L. Willmitzer and G. Tzotzos, *Medicinal Bioprospecting of the Amazon Rainforest: A Modern Eldorado?*, Trends in Biotechnology **34** (2016), no. 10, 781-790.
7. M. B. da Silva, M. P. da Silva, J. D. D. dos Reis Júnior, C. A. C. Lima and A. de Oliveira Souza, *Therapeutics Activities of Amazonian Plant Himatanthus sucuuba (Spruce ex Müll. Arg.) Woodson (apocynaceae): A review*, Journal of Advances in Biology & Biotechnology **24** (2021), 1-14.
8. V. L. de Almeida, C. G. Silva, A. F. Silva, P. R. V. Campana, K. Foubert, J. C. D. Lopes and L. Pieters, *Aspidosperma species: A review of their chemistry and biological activities*, Journal of Ethnopharmacology **231** (2019), 125-140.
9. C. X. Luzuriaga Quichimbo, T. Ruiz Téllez, J. Blanco Salas and C. E. Cerón Martínez, *Scientific validation of the traditional knowledge of Sikta (Tabernaemontana sananho, Apocynaceae) in the Canelo-Kichwa Amazonian community*, Mediterranean Botany **39** (2018), 183-191.

10. D. Castillo, J. Arevalo, F. Herrera, C. Ruiz, R. Rojas, E. Rengifo, A. Vaisberg, O. Lock, J. L. Lemesre, H. Gornitzka and M. Sauvain, *Spirolactone iridoids might be responsible for the antileishmanial activity of a Peruvian traditional remedy made with Himatanthus sucuuba (Apocynaceae)*, Journal of Ethnopharmacology **112** (2007), no. 2, 410-414.
11. J. J. Sajkowska-Kozielewicz, P. Kozielewicz, K. Makarova, M. Stocki, N. M. Barnes and K. Paradowska, *Geissospermiculate, a New Alkaloid from Geissospermum reticulatum Bark*, Molecules **26** (2021), no. 1, 143.
12. "Taxon web," <http://taxonweb.cz/>, staženo: 6. 3. 2022.
13. J. A. Lima, R. S. Costa, R. A. Epifânio, N. G. Castro, M. S. Rocha and A. C. Pinto, *Geissospermum vellosii stem bark: Anticholinesterase activity and improvement of scopolamine-induced memory deficits*, Pharmacology, Biochemistry Behavior **92** (2009), no. 3, 508-513.
14. F. Ken, "Tropical plants database,"
<https://tropical.theferns.info/viewtropical.php?id=Geissospermum+laeve>, staženo 24. 2. 2022.
15. "Plants of the world online ", Royal Botanic Gardens,
Kew: <https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:79123-1>, staženo: 7. 3. 2022.
16. "Pl@ntnet identify," [https://identify.plantnet.org/cs/the-plant-list/species/Geissospermum%20laeve%20\(Vell.\)%20Miers/data](https://identify.plantnet.org/cs/the-plant-list/species/Geissospermum%20laeve%20(Vell.)%20Miers/data), staženo: 6. 3. 2022.
17. F. Mbeunkui, M. H. Grace, C. Lategan, P. J. Smith, I. Raskin and M. A. Lila, *In vitro antiplasmodial activity of indole alkaloids from the stem bark of Geissospermum vellosii*, Journal of Ethnopharmacology **139** (2012), no. 2, 471-477.
18. V. Muñoz, M. Sauvain, G. Bourdy, J. Callapa, S. Bergeron, I. Rojas, J. A. Bravo, L. Balderrama, B. Ortiz, A. Gimenez and E. Deharo, *A search for natural bioactive compounds in Bolivia through a multidisciplinary approach. Part i. Evaluation of the antimalarial activity of plants used by the Chacobo Indians*, Journal of Ethnopharmacology **69** (2000), no. 2, 127-137.

19. P. H. França, D. P. Barbosa, D. L. da Silva, A. Ribeiro Ê, A. E. Santana, B. V. Santos, J. M. Barbosa-Filho, J. S. Quintans, R. S. Barreto, L. J. Quintans-Júnior and J. X. de Araújo-Júnior, *Indole Alkaloids from Marine Sources as Potential Leads against Infectious Diseases*, *BioMed Research International* **12** (2014), 375423.
20. F. Omar, A. M. Tareq, A. M. Alqahtani, K. Dhama, M. A. Sayeed, T. B. Emran and J. Simal-Gandara, *Plant-Based Indole Alkaloids: A Comprehensive Overview from a Pharmacological Perspective*, *Molecules* **26** (2021), no. 8, 2297.
21. E. Brown, "Indoles," *Ring nitrogen and key biomolecules: The biochemistry of N-heterocycles*, p. 192, 1st edition, Springer Science & Business Media, 1998.
22. C. F. Ding, H. X. Ma, J. Yang, X. J. Qin, G. S. S. Njateng, H. F. Yu, X. Wei, Y. P. Liu, W. Y. Huang, Z. F. Yang, X. H. Wang and X. D. Luo, *Antibacterial Indole Alkaloids with Complex Heterocycles from Voacanga africana*, *Organic Letters* **20** (2018), no. 9, 2702-2706.
23. S. P. Gunasekera, P. J. McCarthy and M. Kelly-Borges, *Hamacanthins A and B, new antifungal bis indole alkaloids from the deep-water marine sponge, Hamacantha sp.*, *Journal of Natural Products* **57** (1994), no. 10, 1437-1441.
24. A. P. Macabeo, W. S. Vidar, X. Chen, M. Decker, J. Heilmann, B. Wan, S. G. Franzblau, E. V. Galvez, M. A. Aguinaldo and G. A. Cordell, *Mycobacterium tuberculosis and cholinesterase inhibitors from Voacanga globosa*, *European Journal of Medicinal Chemistry* **46** (2011), no. 7, 3118-3123.
25. L. Zhang, C.-J. Zhang, D.-B. Zhang, J. Wen, X.-W. Zhao, Y. Li and K. Gao, *An unusual indole alkaloid with anti-adenovirus and anti-HSV activities from Alstonia scholaris*, *Tetrahedron letters* **55** (2014), no. 10, 1815-1817.
26. L. F. Rocha e Silva, A. Montoia, R. C. Amorim, M. R. Melo, M. C. Henrique, S. M. Nunomura, M. R. Costa, V. F. Andrade Neto, D. S. Costa, G. Dantas, J. Lavrado, R. Moreira, A. Paulo, A. C. Pinto, W. P. Tadei, R. S. Zacardi, M. N. Eberlin and A. M. Pohlit, *Comparative in vitro and in vivo antimalarial activity of the indole alkaloids ellipticine, olivacine, cryptolepine and a synthetic cryptolepine analog*, *Phytomedicine* **20** (2012), no. 1, 71-76.

27. J. C. Tanaka, C. C. da Silva, I. C. Ferreira, G. M. Machado, L. L. Leon and A. J. de Oliveira, *Antileishmanial activity of indole alkaloids from Aspidosperma ramiflorum*, *Phytomedicine* **14** (2007), no. 6, 377-380.
28. F. L. Both, V. A. Kerber, A. T. Henriques and E. Elisabetsky, *Analgesic Properties of Umbellatine from Psychotria umbellata*, *Pharmaceutical Biology* **40** (2002), vol. 40, no. 5, 336-341.
29. W. Wang, M. H. Cheng and X. H. Wang, *Monoterpenoid Indole Alkaloids from Alstonia rupestris with Cytotoxic, Anti-Inflammatory and Antifungal Activities*, *Molecules* **18** (2013), no. 6, 7309-7322.
30. J. H. Im, Y. R. Jin, J. J. Lee, J. Y. Yu, X. H. Han, S. H. Im, J. T. Hong, H. S. Yoo, M. Y. Pyo and Y. P. Yun, *Antiplatelet activity of β -carboline alkaloids from Perganum harmala: A possible mechanism through inhibiting PLC γ 2 phosphorylation*, *Vascular Pharmacology* **50** (2009), no. 5-6, 147-152.
31. N. M. Cuong, P. N. Khanh, P. T. Huyen, H. V. Duc, T. T. Huong, V. T. Ha, M. Durante, G. Sgaragli and F. Fusi, *Vascular L-Type Ca²⁺ Channel Blocking Activity of Sulfur-Containing Indole Alkaloids from Glycosmis petelotii*, *Journal of Natural Products* **77** (2014), no. 7, 1586-1593.
32. H. S. Nandini and P. R. Naik, *Antidiabetic, antihyperlipidemic and antioxidant effect of Vincamine, in streptozotocin-induced diabetic rats*, *European Journal of Pharmacology* **843** (2019), 233-239.
33. J. Spilková, J. Martin, T. Siatka, L. Tůmová and M. Kašparová, *Farmakognozie*, kap. 6. Charles University in Prague, Karolinum Press, 2016.
34. M. T. El sayed, N. A. Hamdy, D. A. Osman and K. M. Ahmed, *Indoles as anticancer agents*, *Advances in Modern Oncology Research* **1** (2015), no. 1, 20-35.
35. E. S. J. V. da Silva e Silva, H. P. Cordovil Brigido, K. C. Oliveira de Albuquerque, J. Miranda Carvalho, J. Ferreira Reis, L. Vinhal Faria, M. Coelho-Ferreira, F. T. Silveira, A. da Silva Carneiro, S. Percário, A. M. do Rosário Marinho and M. F. Dolabela, *Flavopereirine-An Alkaloid Derived from Geissospermum vellosii-Presents Leishmanicidal Activity In Vitro*, *Molecules* **24** (2019), no. 4.,785
36. B. C. Galarreta, R. Sifuentes, A. K. Carrillo, L. Sanchez, R. Amado Mdel and H. Maruenda, *The use of natural product scaffolds as leads in the search for trypanothione reductase inhibitors*, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **16** (2008), no. 14, 6689-6695.

37. A. C. Mitaine-Offer, M. Sauvain, A. Valentin, J. Callapa, M. Mallié and M. Zèches-Hanrot, *Antiplasmodial activity of Aspidosperma indole alkaloids*, *Phytomedicine* **9** (2002) vol.9, no. 2, 142-145.
38. G. C. Coatti, J. C. Marcarini, D. Sartori, Q. C. Fidelis, D. T. Ferreira and M. S. Mantovani, *Cytotoxicity, genotoxicity and mechanism of action (via gene expression analysis) of the indole alkaloid aspidospermine (antiparasitic) extracted from aspidosperma polyneuron in HepG2 cells*, *Cytotechnology* **68** (2016), no. 4, 1161-1170.
39. J. C. Steele, N. C. Veitch, G. C. Kite, M. S. Simmonds and D. C. Warhurst, *Indole and β -Carboline Alkaloids from Geissospermum sericeum*, *Journal of Natural Product* **65** (2002), no. 1, 85-88.
40. E. Torres-Guerrero, M. R. Quintanilla-Cedillo, J. Ruiz-Esmenjaud and R. Arenas, *Leishmaniasis: a review*, *F1000Research* **6** (2017), 750.
41. J. M. Li, Y. C. Huang, Y. H. Kuo, C. C. Cheng, F. C. Kuan, S. F. Chang, Y. R. Lee, C. C. Chin and C. S. Shi, *Flavopereirine Suppresses the Growth of Colorectal Cancer Cells through P53 Signaling Dependence*, *Cancers* **11** (2019), no. 7, 1034.
42. J. T. Zilfou and S. W. Lowe, *Tumor Suppressive Functions of p53*, *Cold Spring Harbor Perspectives Biology* **1** (2009), no. 5, a001883.
43. J. A. Lima, R. C. TW, A. C. C. da Fonseca, R. F. do Amaral, M. Nascimento, O. A. Santos-Filho, A. L. P. de Miranda, D. C. Ferreira Neto, F. R. S. Lima, L. Hamerski and L. W. Tinoco, *Geissoschizoline, a promising alkaloid for alzheimer's disease: Inhibition of human cholinesterases, anti-inflammatory effects and molecular docking*, *Bioorganic Chemistry* **104** (2020), 104215.
44. J. Q. Araújo, J. A. Lima, C. Pinto Ada, R. B. de Alencastro and M. G. Albuquerque, *Docking of the alkaloid geissospermine into acetylcholinesterase: A natural scaffold targeting the treatment of Alzheimer's disease*, *Journal of Molecular Modeling* **17** (2011), no. 6, 1401-1412.

45. J. A. Werner, S. M. Oliveira, D. F. Martins, L. Mazzardo, F. Dias Jde, A. L. Lordello, O. G. Miguel, L. F. Royes, J. Ferreira and A. R. Santos, *Evidence for a role of 5-HT_{1A} receptor on antinociceptive action from Geissospermum vellosii*, *Journal of Ethnopharmacology* **125** (2009), no. 1, 163-169.
46. J. Liu, T. Fang, M. Li, Y. Song, J. Li, Z. Xue, D. Bu, W. Liu, Q. Zeng, Y. Zhang, S. Yun, R. Huang and J. Yan, *Pao pereira Extract Attenuates Testosterone-Induced Benign Prostatic Hyperplasia in Rats by inhibiting 5 α -Reductase*, *Scientific Reports* **9** (2019), no. 1, 19703.
47. E. J. Oliveira, I. A. Medeiros and R. Mukherjee, *Hypotensive and spasmolytic effects of normacusine B from Strychnos atlantica root*, *Phytomedicine* **3** (1996), no. 1, 45-49.
48. P. Deng, C. Wang, L. Chen, Y. Du, X. Yan, M. Chen, G. Yang and G. He, *Sesamin Induces Cell Cycle Arrest and Apoptosis through the Inhibition of Signal Transducer and Activator of Transcription 3 Signalling in Human Hepatocellular Carcinoma Cell Line HepG2*, *Biological and Pharmaceutical Bulletin* **36** (2013), no. 10, 1540-1548.
49. S. D. Rao, B. N. Rao, P. U. Devi and A. K. Rao, *Isolation of Lupeol, Design and Synthesis of Lupeol Derivatives and their Biological Activity*, *Oriental Journal of Chemistry* **33** (2017), no. 1, 173-180.
50. S. R. Chavali, W. W. Zhong and R. A. Forse, *Dietary α -linolenic acid increases TNF- α , and decreases IL-6, IL-10 in response to LPS: Effects of sesamin on the Δ -5 desaturation of ω 6 and ω 3 fatty acids in mice*, *Prostaglandins Leukotriens and Essential Fatty Acids* **58** (1998), no. 3, 185-191.
51. Y. Kiso, *Antioxidative roles of sesamin, a functional lignan in sesame seed, and its effect on lipid- and alcohol-metabolism in the liver: A DNA microarray study*, *BioFactors* **21** (2004), no. 1-4, 191-196.
52. Z. P. Ma, Z. F. Zhang, Y. F. Yang and Y. Yang, *Sesamin promotes osteoblastic differentiation and protects rats from osteoporosis*, *Medical Science Monitor* **25** (2019), 5312-5320.
53. Z. Yang, L. Feng, H. Wang, Y. Li, J. H. T. Lo, X. Zhang, X. Lu, Y. Wang, S. Lin, M. D. Tortorella and G. Li, *DANCR Mediates the Rescuing Effects of Sesamin on Postmenopausal Osteoporosis Treatment via Orchestrating Osteogenesis and Osteoclastogenesis*, *Nutrients* **13** (2021), no. 12, 4455.
54. M. Saleem, *Lupeol, a novel anti-inflammatory and anti-cancer dietary triterpene*, *Cancer Letters* **285** (2009), no. 2, 109-115.

55. P. Cmoch, Z. Pakulski, J. Swaczynová and M. Strnad, *Synthesis of lupane-type saponins bearing mannosyl and 3,6-branched trimannosyl residues and their evaluation as anticancer agents*, Carbohydrate RESEARCH **343** (2008), no. 6, 995-1003.
56. R.-N. P. Gauthier S, Morais JA, & Webster C., *World alzheimer report 2021: Journey through the diagnosis of dementia*, p. 14, 19, Alzheimer's Disease International, London, England, 2021.
57. O. Mátl and M. Mátlová a. I. Holmerová, *Zpráva o stavu demence 2016*, Vyd. 1, Česká alzheimerovská společnost, o.p.s., Šimůnkova 1600, Praha 8, 2016.
58. Z. Breijyeh and R. Karaman, *Comprehensive Review on Alzheimer's Disease: Causes and Treatment*, Molecules **25** (2020), no. 24, 5789.
59. P. Rössner, *Alzheimerova choroba—diagnostika a léčba*, Neurologie pro praxi **1** (2004), 11-16.
60. L. Čechová, A. Bartoš, D. Doležil and D. Řípková, *Alzheimerova nemoc a mírná kognitivní porucha: Diagnostika a léčba*, Neurologie pro praxi **12** (2011), no. 3, 175-180.
61. H. Förstl and A. Kurz, *Clinical features of Alzheimer's disease*, European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience **249** (1999), no. 6, 288-290.
62. A. STRUNECKÁ, *Acetylcholinesterase: The key to understanding etiology and therapy of Alzheimer's disease?*, VOJENSKÉ ZDRAVOTNICKÉ LISTY - SUPPLEMENTUM, **Vol. LXVII**, no. 2, (1998).
63. R. A. Bekdash, *The Cholinergic System, the Adrenergic System and the Neuropathology of Alzheimer's Disease*, International Journal of Molecular Sciences **22** (2021), no. 3.
64. H. Ashrafian, E. H. Zadeh and R. H. Khan, *Review on Alzheimer's disease: Inhibition of amyloid beta and tau tangle formation*, International Journal of Biological Macromolecules **167** (2021), 382-394.
65. T. H. Ferreira-Vieira, I. M. Guimaraes, F. R. Silva and F. M. Ribeiro, *Alzheimer's Disease: Targeting the Cholinergic System*, Current Neuropharmacology **14** (2016), no. 1, 101-115.

66. G. Mushtaq, N. H. Greig, J. A. Khan and M. A. Kamal, *Status of Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase in Alzheimer's Disease and Type 2 Diabetes Mellitus*, *CNS & Neurological Disorders-Drug Targets* **13** (2014), no. 8, 1432-1439.
67. T. Ahmed, S. Zahid, A. Mahboob and S. M. Farhat, *Cholinergic System and Post-translational Modifications: An Insight on the Role in Alzheimer's Disease*, *Current Neuropharmacology* **15** (2017), no. 4, 480-494.
68. S. R. D'Mello, *When Good Kinases Go Rogue: GSK3, p38 MAPK and CDKs as Therapeutic Targets for Alzheimer's and Huntington's Disease*, *International Journal of Molecular Sciences* **22** (2021), no.11, 5911.
69. E. Lauretti, O. Dincer and D. Praticò, *Glycogen synthase kinase-3 signaling in Alzheimer's disease*, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research* **1867** (2020), no. 5, 118664.
70. C. L. Sayas and J. Ávila, *GSK-3 and Tau: A Key Duet in Alzheimer's Disease*, *Cells* **10** (2021), no.4, 721.
71. A. De Simone, V. Tumiatti, V. Andrisano and A. Milelli, *Glycogen Synthase Kinase 3 β : A New Gold Rush in Anti-Alzheimer's Disease Multitarget Drug Discovery?*, *Journal of Medicinal Chemistry* **64** (2021), no. 1, 26-41.
72. J. Kanungo, Y. L. Zheng, N. D. Amin and H. C. Pant, *Targeting Cdk5 Activity in Neuronal Degeneration and Regeneration*, *Cellular and Molecular Neurobiology* **29** (2009), no. 8, 1073-1080.
73. Y. Wen, W. H. Yu, B. Maloney, J. Bailey, J. Ma, I. Marié, T. Maurin, L. Wang, H. Figueroa, M. Herman, P. Krishnamurthy, L. Liu, E. Planel, L. F. Lau, D. K. Lahiri and K. Duff, *Transcriptional regulation of β -secretase by p25/cdk5 leads to enhanced amyloidogenic processing*, *Neuron* **57** (2008), no. 5, 680-690.
74. S. L. Liu, C. Wang, T. Jiang, L. Tan, A. Xing and J. T. Yu, *The role of Cdk5 in Alzheimer's Disease*, *Molecular Neurobiology* **53** (2016), no. 7, 4328-4342.
75. K. Sharma, *Cholinesterase inhibitors as Alzheimer's therapeutics (review)*, *Molecular Medicine Reports* **20** (2019), no. 2, 1479-1487.

76. V. Franková, *Optimalizace léčby Alzheimerovy choroby*, *Psychiatrie pro praxi* **16** (2015), no. 3, 79-82.
77. R. Jiráček, *Diagnostika a terapie Alzheimerovy choroby*, *Neurologie pro praxi* **9** (2008), no. 4, 240-244.
78. J. Švestka, *Memantin-Necholinergní alternativa léčby Alzheimerovy a vaskulární demence*, *Psychiatrie pro praxi* **9** (2004), no. 3, 162-168.
79. C. Song, J. Shi, P. Zhang, Y. Zhang, J. Xu, L. Zhao, R. Zhang, H. Wang and H. Chen, *Immunotherapy for Alzheimer's disease: targeting β -amyloid and beyond*, *Translational Neurodegeneration* **11** (2022), no.1, 1- 17.
80. J. Cummings, P. Aisen, L. G. Apostolova, A. Atri, S. Salloway and M. Weiner, *Aducanumab: Appropriate Use Recommendations*, *The journal of prevention of Alzheimer's disease* **8** (2021), no. 4, 398-410.
81. SUKL, *Hlavní body zasedání výboru pro humánní léčivé přípravky (CHMP) 13.-16. prosince 2021*, Státní ústav pro kontrolu léčiv, <https://www.sukl.cz/leciva/hlavni-body-zasedani-vyboru-pro-humanni-licive-pripravky-3>, staženo 1. 4. 2022.
82. J. Boonsombat, H. Zhang, M. J. Chughtai, J. Hartung and A. Padwa, *A General Synthetic Entry to the Pentacyclic Strychnos Alkaloid Family, Using a [4 + 2]-Cycloaddition/Rearrangement Cascade Sequence*, *The Journal of Organic Chemistry* **73** (2008), no. 9, 3539-3550.
83. M. Reina, W. Ruiz-Mesia, M. López-Rodríguez, L. Ruiz-Mesia, A. González-Coloma and R. Martínez-Díaz, *Indole Alkaloids from *Geissospermum reticulatum**, *Journal of Natural Products* **75** (2012), no. 5, 928-934.
84. B. Weniger, S. Robledo, G. J. Arango, E. Deharo, R. Aragón, V. Muñoz, J. Callapa, A. Lobstein and R. Anton, *Antiprotozoal activities of Colombian plants*, *Journal of Ethnopharmacology* **78** (2001), no. 2-3, 193-200.

85. C. Chang, W. Zhao, B. Xie, Y. Deng, T. Han, Y. Cui, Y. Dai, Z. Zhang, J. Gao, H. Guo and J. Yan, *Pao Pereira Extract Suppresses Castration-Resistant Prostate Cancer Cell Growth, Survival, and Invasion Through Inhibition of NF κ B signaling*, *Integrative Cancer Therapies* **13** (2014), no. 3, 249-258.