

UNIVERZITA KARLOVA  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ  
KATEDRA FARMAKOGNOZIE A FARMACEUTICKÉ BOTANIKY

## **Alkaloidy *Vinca minor* L. a jejich biologická aktivita**

Alkaloids from *Vinca minor* L. and their biological activity



DISERTAČNÍ PRÁCE

**Mgr. Rudolf Vrabec**

školitel: prof. RNDr. Lubomír Opletal, CSc.

konzultant: PharmDr. Marcela Šafratová, Ph.D.

studijní obor: Farmakognosie a nutraceutika

## **PROHLÁŠENÍ**

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

Hradec Králové, duben 2022

Mgr. Rudolf Vrabec

## PODĚKOVÁNÍ

Tato práce vznikla za finanční podpory grantů Univerzity Karlovy SVV 260 548 a Progres/UK Q42, za dotace EU při projektu „Modernizace a rozšíření doktorského studijního oboru Farmakognosie a toxikologie přírodních látek“ studijního programu Farmacie (č. CZ.02.2.69/0.0/0.0/16\_018/0002736).

Rád bych poděkoval svému školiteli, prof. RNDr. Lubomíru Opletalovi, CSc., a konzultantce PharmDr. Marcele Šafratové, Ph.D., za cenné rady a odborné vedení během mé doktorské práce. Stejně tak děkuji i PharmDr. Daniele Hulcové, Ph.D. nejen za významný podíl při změření inhibičních aktivit izolovaných látek vůči cholinesterasám, ale i odborné rady. V neposlední řadě děkuji prof. Ing. Lucii Cahlíkové, Ph.D., vedoucí výzkumné skupiny ADINACO a Katedry farmakognosie a farmaceutické botaniky za pomoc při studiu a rady k sepisování práce.

Dále bych chtěl poděkovat kolegům, kteří se na vzniku této práce podíleli v rámci spolupráce: PharmDr. Janě Křoustkové, Ph.D. a doc. PharmDr. Jiřímu Kunešovi, CSc. za změření a interpretaci NMR spekter; prof. PharmDr. Lucii Novákové, Ph.D. za změření HRMS spekter; RNDr. Radimu Havelkovi, Ph.D. za zhodnocení cytotoxicity; prof. Vincenze Andrisano, Ph.D. za změření inhibice GSK-3 $\beta$ ; kpt. Mgr. et Mgr. Tomáši Kučerovi, Ph.D. a doc. PharmDr. Janu Korábečnému, Ph.D. za provedení dockingové studie; doc. PharmDr. Danielu Junovi, Ph.D., doc. PharmDr. Ondřeji Soukupovi, Ph.D. a Mgr. Martině Hrabínové, Ph.D. za změření inhibice POP, farmakokinetických parametrů, a PAMPA testu.

Chtěl bych také poděkovat Ing. Miroslavu Ločárkovi za pomoc při počátečním zpracování rostlinného materiálu a sloupcové chromatografii, i PharmDr. Anně Hošťálkové, Ph.D. a doc. PharmDr. Jakubovi Chlebkovi, Ph.D. za rady poskytnuté při izolaci alkaloidů.

Poděkování patří i všem pracovníkům katedry za materiální i psychickou podporu a vytvoření příjemného pracovního prostředí. Děkuji rovněž svým přátelům a rodině za oporu v těžkých chvílích nezdařených pokusů.

# OBSAH

OBSAH .....	4
SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK .....	7
1 ÚVOD .....	10
2 CÍL PRÁCE.....	13
3 TEORETICKÁ ČÁST.....	14
3.1 Rod <i>Vinca</i> L. ....	14
3.1.1 <i>Vinca minor</i> L.....	14
3.1.2 <i>Vinca major</i> L.....	15
3.1.3 <i>Vinca herbacea</i> Waldst. et Kit. ....	16
3.1.4 <i>Vinca erecta</i> Regel et Schmalh. ....	17
3.1.5 <i>Vinca difformis</i> Pourr. ....	18
3.1.6 <i>Vinca soneri</i> Koyuncu.....	18
3.1.7 <i>Vinca ispartensis</i> Koyuncu et Ekşi.....	19
3.1.8 Obsahové látky rodu <i>Vinca</i> L.....	20
3.1.9 Biologická aktivita indolových alkaloidů <i>Vinca minor</i> L. ....	34
3.2 Alzheimerova choroba .....	39
3.2.1 Stručný přehled patofyziologie .....	39
3.2.2 Farmakoterapie.....	40
3.2.3 Vybrané enzymy patofyziologie jako cílové struktury léčiv.....	43
4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	49
4.1 Materiální vybavení.....	49
4.1.1 Chemikálie pro izolaci a určení struktury alkaloidů .....	49
4.1.2 Pomocný materiál pro izolaci alkaloidů a určení struktury.....	50
4.1.3 Chemikálie a enzymy pro měření inhibice cholinesteras.....	50
4.1.4 Rostlinný materiál .....	50
4.1.5 Přístroje a software.....	51
4.2 Obecné postupy .....	51
4.2.1 Příprava Dragendorffova činidla pro detekci alkaloidů .....	51
4.2.2 Příprava litých desek pro preparativní TLC .....	51
4.2.3 Preparativní TLC.....	52
4.2.4 Analytická TLC.....	52
4.2.5 Analytická HPLC/MS-ESI.....	52
4.2.6 Preparativní HPLC .....	53
4.2.7 GC/MS-EI analýza .....	53
4.2.8 HRMS analýza .....	53

4.2.9 NMR analýza.....	53
4.2.10 Optická otáčivost.....	54
4.2.11 Příprava činidel a enzymů pro měření biologických aktivit.....	54
4.3 Izolace alkaloidů z nati <i>Vinca minor</i> L. ....	55
4.3.1 Vytvářecí soustavy pro preparativní a analytickou TLC.....	55
4.3.2 Příprava přečištěného alkaloidního extraktu .....	56
4.3.3 Izolace alkaloidů .....	57
4.3.5. Určení struktury alkaloidů.....	65
4.4 Biologická aktivita izolovaných alkaloidů.....	66
4.4.1 Stanovení inhibiční aktivity vůči cholinesterasám.....	66
4.4.2 Stanovení inhibiční aktivity vůči prolyl oligopeptidase.....	66
4.4.3 Stanovení inhibiční aktivity vůči glykogen syntase kinase-3 $\beta$ .....	66
4.4.4 Stanovení cytotoxicity na panelu nádorových buněk.....	67
4.4.5 Výpočet logBB.....	67
4.4.6 PAMPA .....	67
4.4.7 Stanovení farmakokinetických parametrů.....	68
4.5 Dockingová studie nejaktivnější látky vůči butyrylcholinesterase .....	68
5 VÝSLEDKY .....	69
5.1 Izolované alkaloidy a jejich strukturní analýza.....	69
5.1.1 VR-1: (+)-Vinkaminorin .....	69
5.1.2 VR-2: (+)-Vinkaminorein.....	70
5.1.3 VR-3: (-)-Eburnamonin .....	72
5.1.4 VR-4: (-)-Minovin .....	73
5.1.5 VR-5: (-)-16-Methoxyminovin.....	74
5.1.6 VR-6: Vinkatin (směs diastereomerů 2 : 3) .....	76
5.1.7 VR-7: (-)-Minovincin .....	77
5.1.8 VR-8: (-)-16-Methoxyminovincin.....	78
5.1.9 VR-9: (+)-Vinkaminorudein.....	80
5.1.10 VR-10: (-)-Demethoxyalstonamid.....	82
5.1.11 VR-11: (-)-Vinkorin .....	83
5.1.12 VR-12: (-)-Minovincinin .....	84
5.1.13 VR-13: (+)-Aspidospermidin .....	85
5.1.14 VR-14: (-)-19-Oxoeburnamonin .....	86
5.1.15 VR-15: (-)-Akuammicin.....	87
5.1.16 VR-16: (+)-Tubotaiwin .....	88
5.1.17 VR-17: (-)-Raukubainin .....	89

5.1.18 VR-18: (-)-Aspidofraktinin .....	91
5.1.19 VR-19: (-)-2-Ethyl-3[2-(3-ethylpiperidiny)-ethyl]-1 <i>H</i> -indol.....	92
5.1.20 VR-20: (-)-14,15-Dihydrovindolinin.....	93
5.1.21 VR-21: (+)-Striktamin.....	94
5.1.22 VR-22: (-)-5-Oxoaspidofraktinin .....	95
5.1.23 VR-23: (-)-Raukubain .....	96
5.2 Inhibiční aktivita alkaloidů vůči vybraným enzymům.....	98
5.3 Cytotoxicita izolovaných alkaloidů.....	99
5.4 Hodnoty logBB izolovaných alkaloidů .....	100
5.5 PAMPA pro látku VR-19 .....	101
5.6 Farmakokinetické parametry látky VR-19 .....	102
5.7 Dockingová studie látky VR-19 .....	103
6 DISKUZE.....	106
7 ABSTRAKT.....	111
8 ABSTRACT .....	112
9 LITERATURA.....	113
10 PŘEHLED PUBLIKACÍ, KONFERENCÍ A STÁŽÍ.....	131
10.1 Původní práce.....	131
10.2 Konference .....	131
10.2.1 Krátké ústní přednášky.....	131
10.2.2 Krátké online přednášky.....	132
10.2.3 Postery.....	132
10.3 Stáž.....	132

# SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

5-LOX	5-lipoxygenasa
A2780	buněčná linie karcinomu vaječníku
A375	buněčná linie lidského melanomu
A549	buněčná linie adenokarcinomu plic
ACS	„American Chemical Society“
AD	Alzheimerova choroba
ACh	acetylcholin
AChE, hAChE,	acetylcholinesterasa, lidská acetylcholinesterasa
APP	amyloidní prekurzorový protein
AMK	aminokyselina
ATCh	acetylthiocholin jodid
A $\beta$	$\beta$ -amyloid
BACE1	$\beta$ -sekretasa 1
BuChE, hBuChE	butyrylcholinesterasa, lidská butyrylcholinesterasa
BuTCh	butyrylthiocholin jodid
CAS	„Chemical Abstracts Service“
CDK5	cyklin-dependentní kinasa 5
CNS	centrální nervová soustava
COX-2	cyklooxygenasa 2
CREB	„cAMP response element-binding protein“
cv.	pěstovaná odrůda
CYP2D6	cytochrom P450 2D6
DPPH	2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl
EC	klasifikační číslo enzymu
EEG	elektroencefalografie
eelAChE	AChE z <i>Electrophorus electricus</i>
EI	elektronová ionizace
eqBuChE	BuChE z koňského séra
ERK	extracelulárně regulovaná kinasa
ESI	ionizace elektrosprejem
EtOH	ethanol
FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv Spojených států amerických
GC	plynová chromatografie

gCOSY	„gradient corelation spectroscopy“
GSK-3 $\beta$	glykogen syntasa kinasa-3 $\beta$
H1299	buněčná linie lidského plicního karcinomu
HaCaT	buněčná linie keratinocytů
HCT-116	buněčná linie kolorektálního karcinomu
HDP	hrubý domácí produkt
HEB	hematoencefalická bariéra
HeLa	buněčná linie adenokarcinomu děložního čípku
HepG2	buněčná linie hepatokarcinomu
HL-60	buněčná linie myeloidní leukémie
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HRMS	hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením
HT-29	buněčná linie kolorektálního adenokarcinomu
ChAT	cholinacetyltransferasa
ChEIs	inhibitory cholinesteras
IC <sub>50</sub>	inhibiční koncentrace látky při které je inhibováno 50 % enzymu
IL	interleukin
Jurkat	buněčná linie akutní leukémie T-lymfocytů
KB	buněčná linie lidského epiteliálního karcinomu
LC	kapalinová chromatografie
LMTM	leukomethylthionin bis(hydromethansulfonát)
LogBB	logaritmická hodnota koncentrace látky v mozku ku koncentraci v krvi
LRP	„low-density lipoprotein“ receptory
<i>m/z</i>	poměr hmotnosti ku náboji
MAO	monoaminoxidasa
MCF-7	buněčná linie adenokarcinomu prsu
MeCN	acetonitril
MeOH	methanol
MIC	minimální inhibiční koncentrace
NIST	„National Institute of Standards and Technology Library“
MOLT-4	buněčná linie akutní lymfoblastické leukémie
MRC-5	buněčná linie zdravých plicních fibroblastů
MS	hmotnostní spektrometrie
MTT	tetrazoliový test buněčné viability
NF- $\kappa$ B	nukleární faktor kappa B



NFTs	neurofibrilární klubka
NGF	nervový růstový faktor
NMDA	<i>N</i> -methyl-D-aspartát
NMDARs	<i>N</i> -methyl-D-aspartátové receptory
NMR	nukleární magnetická rezonance
NOESY	„nuclear overhauser effect spectroscopy“
p. a.	pro analýzu
P388	myší buněčná linie leukémie
PAMPA	„parallel artificial membrane permeability assay“
PANC-1	buněčná linie epitelálního karcinomu slinivky
PC12	buněčná linie feochromocytomu
PC-3	buněčná linie karcinomu prostaty
PDA	detektor s diodovým polem
POP	prolyl oligopeptidasa
Q-TOF	„quadrupole-time-of-flight“
RAGEs	receptory pro glykované produkty
R <sub>F</sub>	retenční faktor
RNS	reaktivní formy dusíku
ROS	reaktivní formy kyslíku
SAOS-2	buněčná linie osteosarkomu
sAPP	solubilní APP fragment
SK-BR-3	buněčná linie karcinomu prsu
SMMC-7721	buněčná linie hepatokarcinomu
SW480	buněčná linie adenokarcinomu tlustého střeva
T2DM	„type 2 diabetes mellitus“, cukrovka typu 2
<i>TcAChE</i>	AChE z <i>Torpedo californica</i>
TFA	kyselina trifluoroctová
TLC	tenkovrstvá chromatografie
TMS	tetramethylsilan
TNF- $\alpha$	tumor nekrotizující faktor $\alpha$
U87	buněčná linie glioblastomu
v/v	objemový poměr
VSO	výběrová směrodatná odchylka

# 1 ÚVOD

Přírodní látky provází existenci člověka od nepaměti, ať už šlo o otravy, léčbu, či náboženské rituály. Jako samotné izolované látky, či rostlinné extrakty, přírodní léčiva spolu s jejich semisyntetickými deriváty a syntetickými látkami snaží se napodobit jejich strukturu, představují až dvě třetiny všech „malých“ molekul schválených FDA v letech 1981–2014<sup>1</sup>. Mnohé přírodní látky jsou také součástí doplňků stravy a nutraceutik, ať už ve formě extraktů z matečných rostlin, nebo samostatně<sup>2</sup>. Toto široké zastoupení dokazuje, že přírodní látky jsou stále nejvýznamnějším zdrojem pro vývoj nových léčivých molekul<sup>1</sup>, za což vděčí své bohaté strukturní rozmanitosti a širokému spektru biologických účinků<sup>3</sup>. Jejich nejvýznamnější skupinou jsou sekundární metabolity rostlin, z nichž nejvíce léčiv najdeme ve skupině alkaloidů, které patří k nejlákavějším přírodním předlohovým strukturám<sup>4</sup>. Mezi léčiva vycházející z alkaloidů patří například morfin a jeho řada analog pro léčbu bolesti, atropin jako mydriatikum, vinkristin a vinblastin jako antineoplastika, nebo například stimulační kofein. Dalším významným alkaloidním léčivem je galantamin, uplatňující se při léčbě Alzheimerovy choroby (AD). Při léčbě této nemoci se rovněž uplatňuje i syntetický rivastigmin, jehož předlohová struktura fysostigmin je také přírodního původu<sup>5</sup>.

V současnosti trpí nějakou formou demence zhruba 50 miliónů lidí. Nejčastější demencí je Alzheimerova choroba, zodpovědná za 60 až 70 % případů. Současně se jedná i o pátou nejčastější příčinou úmrtí u lidí starších 65 let. Je odhadováno, že množství osob s touto chorobou se může během příštích 30 let až ztrojnásobit<sup>6,7</sup>. Kromě komplikací u pacientů, nemoc významně snižuje kvalitu života i jejich příbuzným a okolí, jež se o postižené musejí starat, pečovat, a zároveň sledovat nezvratný rozklad osobnosti. V konečném důsledku je znatelná újma i na celosvětové ekonomice, neboť až 1 % světového HDP připadne právě na léčbu a péči o pacienty s demencí<sup>8</sup>. Tato nemoc způsobuje nevratné, degenerativní poškození mozku, které se navenek projevuje snížením kognitivních schopností a paměti. Poznatky medicíny bohužel nejsou zatím schopny poskytnout kauzální léčbu nemoci, ačkoliv je jedním ze svatých grálů mnoha výzkumů. V červnu 2021 byla americkou FDA schválena nová monoklonální protilátka aducanumab (Aduhelm<sup>TM</sup>)<sup>9</sup>, která se zdá být schopna léčit příčinu nemoci odstraňováním  $\beta$ -amyloidních plaků<sup>10,11</sup>, ale kvůli nedostatku kvalitních důkazů vyvolalo toto urychlené schválení značnou kontroverzi a vedlo k rezignaci tří členů poradního výboru<sup>12</sup>. Standardní léčbou AD stále zůstává podávání léčiv, které napomáhají zpomalení postupu choroby a dočasnému zlepšení mentálních schopností. V současnosti se u nás jedná o antagonistu *N*-methyl-D-aspartátových receptorů memantin a inhibitory cholinesteras donepezil,

rivastigmin a galantamin<sup>13</sup>. V Číně je dalším schváleným inhibítozem cholinesteras huperzin A, alkaloid z vrance *Huperzia serrata* (Thunb.) Trevis. (Lycopodiaceae)<sup>14</sup>, který byl ale zatím FDA klasifikován pouze jako doplněk stravy; v současnosti je stále ve 3. fázi klinického testování<sup>15</sup>. Je zřejmé, že uspokojivých látek je k léčbě této devastující choroby stále nedostatek, a je potřeba hledat nové a lepší účinné struktury.

Množství inhibitorů acetyl- a butyrylcholinesterasy bylo izolováno z nejrůznějších přírodních zdrojů. Mezi těmito inhibitory jsou nejslibnějšími kandidátními látkami pro léčbu AD právě alkaloidy díky bohatému množství různých dusíkatých struktur<sup>4</sup>. Monoterpenové indolové alkaloidy přitahují zájem díky jejich všeobecně známému léčebnému významu, strukturní rozmanitosti, a komplexní biosyntéze<sup>16,17</sup>. V rámci celé řady studií byly intenzivně studovány pro širokou škálu farmakologických aktivit jako protizánětlivé účinky<sup>18</sup>, cytotoxicita<sup>19</sup>, a inhibice cholinesteras<sup>20</sup>.

Jedním z rostlinných rodů, bohatých na skupinu indolových alkaloidů, je rod *Vinca* L. z čeledi Apocynaceae, který se skládá ze sedmi druhů vyskytujících se v Evropě, severozápadní Africe a jihozápadní Asii<sup>21</sup>. Fytochemicky nejvýznamnějším druhem je *Vinca minor* L., česky barvínek menší, vytrvalá rostlina polokeřovitého charakteru, vyskytující se volně v přírodě od severního Španělska, přes západní Francii, na východ přes střední a jižní Evropu až na Kavkaz<sup>5</sup>. V lidovém léčitelství je vnitřně užívána na problémy s oběhovým systémem mozku, a na podporu jeho metabolismu. Dále bylo prokázáno, že zlepšuje i další potíže, jako hypertenzi, záněty (cystitidy, gastritidy, enteritidy), průjem, a zvýšený krevní cukr. Zevně se používá na bolavý krk, krvácení z nosu, modřiny, abscesy, ekzémy a krvácení<sup>22</sup>. *Vinca minor* L. obsahuje hlavně eburnaminový typ alkaloidů zahrnující vinkamin, který je schopný modulovat mozkový krevní oběh a neuronovou homeostázu<sup>23</sup>. V minulosti bylo ve *V. minor* L. celkově objeveno přes 50 indolových alkaloidů, které jsou stále předmětem zájmu biologických studií. Například v nedávné době byl zkoumán vliv vystavení listů působení methyl-jasmonátu a sledován vliv na produkci alkaloidů, kde se zjistilo, že tento rostlinný hormon způsobuje změny v produkci a obsahu, včetně výskytu i nových struktur<sup>24</sup>. V roce 2012 turecký tým vědců zjistil silnou anticholinesterasovou a antioxidační aktivitu alkaloidního extraktu z *V. minor* L. a *V. major* L.<sup>25</sup> Jako léčivý přípravek na předpis je u nás registrován semisyntetický derivát vinkaminu vinpocetin (obchodní název např. CAVINTON®). Jeho indikací je symptomatická léčba cerebrovaskulárních poruch jako např. ischemická hypoperfuze a vaskulární demence včetně snížení jejich psychických a neurologických následků<sup>26</sup>. V jiných zemích je k podpůrné léčbě poruch prokrvení mozku a demence registrován jako doplněk stravy i samotný vinkamin

(např. Oxybral<sup>TM</sup>), jež je vnímán jako relativně bezpečná látka. Studie publikovaná v minulém roce poukazuje na jeho významný antineoplastický potenciál<sup>27</sup>.

Výzkumným cílem skupiny ADINACO je hledání nových zajímavých látek z přírodních zdrojů, které by byly využitelné v terapii neurodegenerativních, onkologických a invazivních onemocnění přímo jako takové, nebo ve formě „lead-structure“ pro jejich další vývoj<sup>28</sup>. V rámci standardního screeningu extraktů rostlin proti inhibici cholinesteras bylo zjištěno, že alkaloidní extrakt z nati *Vinca minor* L. vykazuje zajímavou inhibiční aktivitu, především proti lidské butyrylcholinesterase. Spolu s nedostatkem aktuálních fytochemicko-farmakologických studií, vedla tato skutečnost k výběru této rostliny pro detailní fytochemickou a biologickou studii. Izolované alkaloidy byly následně studovány z pohledu jejich inhibičního potenciálu vůči enzymům souvisejících s možnou terapií AD.

## 2 CÍL PRÁCE

Cílem této disertační práce byla izolace alkaloidů z natě *Vinca minor* L. z čeledi Apocynaceae za účelem testování jejich biologických aktivit ve vztahu k významným chorobám.

Dílčí cíle byly:

- zpracování literární rešerše týkající se výskytu indolových alkaloidů v rodě *Vinca* L. a jejich biologické aktivity,
- izolace alkaloidů z extraktu natě *Vinca minor* L.,
- určení struktury izolovaných látek na základě jejich fyzikálně-chemických vlastností (NMR, MS, optická otáčivost a další),
- stanovení biologických aktivit jednotlivých alkaloidů vůči enzymům patofyziologie Alzheimerovy choroby (inhibiční aktivita vůči lidským cholinesterasám, prolyl oligopeptidase a glykogen syntase kinase 3- $\beta$ ),
- zhodnocení cytotoxicity alkaloidů na panelu nádorových a zdravých buněčných linií,
- objasnění strukturních aspektů nejaktivnějších látek metodami molekulárního dockingu.

## 3 TEORETICKÁ ČÁST

### 3.1 Rod *Vinca* L.

**Říše:** Rostliny (Plantae)

**Podříše:** Cévnaté rostliny (Tracheophyta)

**Oddělení:** Krytosemenné (Angiospermae)

**Třída:** Dvouděložné (Magnoliopsida)

**Řád:** Hořcotvaré (Gentianales)

**Čeleď:** Toješťovité (Apocynaceae)

Rostliny rodu *Vinca* L. jsou domácí v Evropě, severozápadní Africe a jihozápadní Asii. Jedná se o plazivé stálezelené, nebo opadavé vytrvalé polokeře řadící se do sedmi druhů<sup>21</sup>. Plazivé stonky mohou mít 1 až 2 m dlouhé, ale nedosahují do výšky více jak 70 cm nad zem. Stonky často koření při styku se zemí, což přispívá k jejich šíření. Listy mají vstřícné, jednoduché, kopinaté až oválné, 1 až 9 cm dlouhé a 0,5 až 6 cm široké. Květy jsou trubkovité, na konci roztažené do pěti okvětních lístků, které mají obvykle nafialovělou až bílou barvu. Plodem je měchýřek; suché plody praskají podél jednoho místa a uvolňují tím semena<sup>29</sup>. Druhy lze rozlišit podle makroskopických znaků i morfologických rozdílů pylových zrn<sup>21</sup>. Z hlediska počtu fytochemických studií zaměřujících se na biologicky aktivní indolové alkaloidy jsou nejvíce probádanými druhy *Vinca minor* L. a *Vinca major* L. (Tab. 1).

#### 3.1.1 *Vinca minor* L.

##### 3.1.1.1 Botanický popis

*Vinca minor* L. (barvínek menší) patří mezi jediné volně rostoucí zástupce čeledi u nás. Jedná se o vytrvalou a plazivou rostlinu, 15–20 cm vysokou, která při bázi dřevnatí. Plazivé prýty jsou nekvetoucí a kořenují, zatímco vystoupavé prýty jsou krátké a kvetou. Charakterické jsou pětičetné dlouze stopkaté modrofialové květy a kožovité vstřícné elipticky kopinaté neopadavé listy, které jsou na vrchu lesklé a tmavší než na rubu<sup>30</sup> (Obr. 1). Květy lze spatřit v období od března do června, plodem je potom dvojitý měchýřek<sup>31</sup>. Tento stále zelený polokeř je rozšířený v západní, střední i jižní Evropě<sup>5</sup>. Rostlina se vyskytuje v lesích, luzích, skalách, v oblasti nížin až podhůří. Často je u nás pěstována jako okrasná rostlina mnohých zahrad a parků<sup>31</sup>.



Obr. 1 *Vinca minor* L. porost a květ, autor: R. Vrabc

### 3.1.1.2 Farmakognostické a lidové použití

Drogou je sušená nať sbíraná před rozkvetem. V minulosti se v lidovém léčitelství užívala proti vysokému krevnímu tlaku, cukrovce, na uklidnění<sup>5</sup>, při problémech s oběhovým systémem mozku a na podporu jeho metabolismu. Bylo také prokázáno, že zlepšuje i další potíže jako záněty (cystitidy, gastritidy, enteritidy) a průjem. Zevně se používá na bolavý krk, krvácení z nosu, modřiny, abscesy, ekzémy a krvácení<sup>22</sup>. Dnes se droga oficiálně používá jenom k izolaci indolového alkaloidu vinkaminu<sup>5</sup>. Vzhledem k obsahu toxických alkaloidů je barvínek menší u nás považován za jedovatou rostlinu<sup>30</sup>, i když dosud nebyl zaregistrován žádný případ otravy<sup>31</sup>. Při intoxikaci lze předpokládat hypotenzi, bradykardii, paralýzu kosterních svalů a křeče. Při dlouhodobém užívání jsou obsažené alkaloidy neurotoxické. Za jedovatou je považována celá rostlina<sup>31</sup>.

### 3.1.2 *Vinca major* L.

Mezi další významný druh rodu *Vinca* L. patří *Vinca major* L. (barvínek větší). Jedná se o až 60 cm vysoký vytrvalý polokeř rostoucí především ve Středomoří. Má vstřícné vejčité listy, které jsou 3–9 cm dlouhé<sup>32</sup> (Obr. 2). Na rozdíl od *V. minor* L. má okraje listů pokryté trichomy a jako jediný z druhů zůstává přes zimu zelený bez odumření nadzemní části<sup>33</sup>. Osamocené květy jsou modrofialové a obvykle 3–5 cm široké<sup>32</sup>, u středu bělavé, kvetoucí od března do července<sup>34</sup>. Může být nalezen po celém světě, kam byl z Evropy zavlečen, hojně ho můžeme najít v USA, Střední Americe, na jižním cípu Austrálie, Novém Zélandě, či Jižní Africe<sup>32</sup>. U nás ho můžeme nalézt v zahradách či parcích. Roste volně např. na okrajích lesů, březích a

v křovinách. Občas se vyskytuje v kultivaru se žlutobíle panašovanými listy<sup>34</sup>. *V. major* L. v některých částech světa bývá považována za invazivní druh, neboť svým hustým porostem může blokovat přísun světla sazenicím místních rostlin a velice snadno se šíří<sup>35</sup>. V lidovém léčitelství byla např. ve Francii používána jako abortivum, adstringens a tonikum<sup>36</sup>.



Obr. 2 *Vinca major* L., autoři: J. Kok ©Nova-Photo-Graphik GmbH (vlevo) dostupné z <https://www.rostlinky.cz> 17.2.2022, L. Kovář (vpravo)<sup>34</sup>

### 3.1.3 *Vinca herbacea* Waldst. et Kit.

*Vinca herbacea* Waldst. et Kit., synonymem *Vinca libanotica* Zucc., je vytrvalý polokeř dorůstající 60–80 cm, domácí v jižní Evropě skrz Střední Východ a jižní Rusko až po kazachstánský Turkistan<sup>36</sup>. Listy má úzce eliptické až kopinaté, na bázi klínovité s nepatrně brvitými okraji. Květy má modrofialvé, na okrajích brvité, rozmístěné podél stonků, kvetoucí od dubna do května (Obr. 3). Tento druh nejčastěji roste ve stepních oblastech a nemá velkou toleranci vůči ekologickým stresorům. *V. herbacea* Waldst. et Kit. je proto vzhledem ke svému vzácnějšímu výskytu v některých oblastech chráněná<sup>37</sup>.





Obr. 3 *Vinca herbacea* Waldst. et Kit., autor: A. Fateryga © 2012, dostupné z <https://www.plantarium.ru> 21.3.2022

### 3.1.4 *Vinca erecta* Regel et Schmalh.

*Vinca erecta* Regel et Schmalh., jakožto další zástupce rodu *Vinca* L., je až 40 cm vysoká trvalá rostlina s eliptickými až oválnými listy 4–5 cm dlouhými a 2–2,5 cm širokými, brvitými a zúženými na obou koncích. Květy má bledě azurové, nebo uvnitř bílé a zvnějšku růžové, trubka je světle fialová (Obr. 4). Roste hlavně ve střední Asii na černozemi a jemných až hrubozrných půdách. Vyskytuje se vzácně a po malých množstvích<sup>38</sup>. V místě jejího výskytu se lidově používají odvary z nadzemních částí k léčbě horečky, a odvary z kořenů jako emetikum. Listy se jako čaj používají k léčbě průjmu, bolesti hlavy, závratí, gastrointestinálních potíží a pro výplach úst při bolesti zubů. Obklad z čerstvých listů se používá na rány<sup>38</sup>.



Obr. 4 *Vinca erecta* Regel et Schmalh., autor: A. Naumenko, dostupné z <https://www.plantarium.ru> 17.2.2022

### 3.1.5 *Vinca difformis* Pourr.

Dalším, avšak méně fytochemicky probádaným druhem, je *Vinca difformis* Pourr. (synonymum *Vinca media* Hoffmanns. et Link). Je to bujný, stálezelený polokeř dorůstající až 50 cm do výšky s vejčitými listy a krátkými vzpřímenými listovými stonky s bledě modrými květy o průměru 4 cm (Obr. 5). Může tvořit porost až do šířky 1,5 m. Vyskytuje se v jihozápadní Evropě i severní Africe. Kvete brzy – na přelomu zimy a jara. Snadno se pěstuje skoro na všech půdách a ve stinných místech, může proto být až invazivní<sup>39</sup>.



Obr. 5 *Vinca difformis* Pourr., autor: Lucio De Lucia – Alliste, dostupné z <http://luirig.altervista.org> 1.18.2022

### 3.1.6 *Vinca soneri* Koyuncu

Dalším, spíše okrajovým zástupcem, je nověji (2011) popsáný druh *Vinca soneri* Koyuncu (Obr. 6) z území Turecka. Jde opět o vytvalý polokeř až 60 cm vysoký, lodyha je vzpřímená s temně zelenými listy, které jsou jednoduché, eliptické, a s jemným okrajem. Květy má modro-bílé. Tento druh je značně podobný *Vinca herbacea* Waldst. et Kit., ale vykazuje jisté odlišnosti jako např. chybějící plazivé výhonky, větší a širší listy, které nejsou tolik protáhlé, dvojnásobně delší pestíky a měchýřky; typická je i pozdější doba květení (květen až červen). Tento druh roste na suchých kamenitých svazích v nadmořské výšce 1200–2800 m. Vzhledem k malé specifické oblasti výskytu v turecké provincii Erzincan, přírodním vlivům a lidské činnosti, navrhuji botanici, kteří tento druh popsali, zařadit ho do kriticky ohrožených<sup>40</sup>. Navzdory této studii a popsáním odlišností podle serveru World Flora Online není však zatím *Vinca soneri* Koyuncu zaregistrovaným druhem<sup>41</sup>, ačkoliv na serveru Plants of the World Online provozovaném Royal Botanic Gardens, Kew přijatým druhem je<sup>42</sup>.



Obr. 6 *Vinca soneri* Koyuncu, autoři: M. Koyuncu<sup>40</sup> (habitat) a M. Ünlü (květ), dostupné z <https://turkiyebitkileri.com> 11.2.2022

### 3.1.7 *Vinca ispartensis* Koyuncu et Ekşi

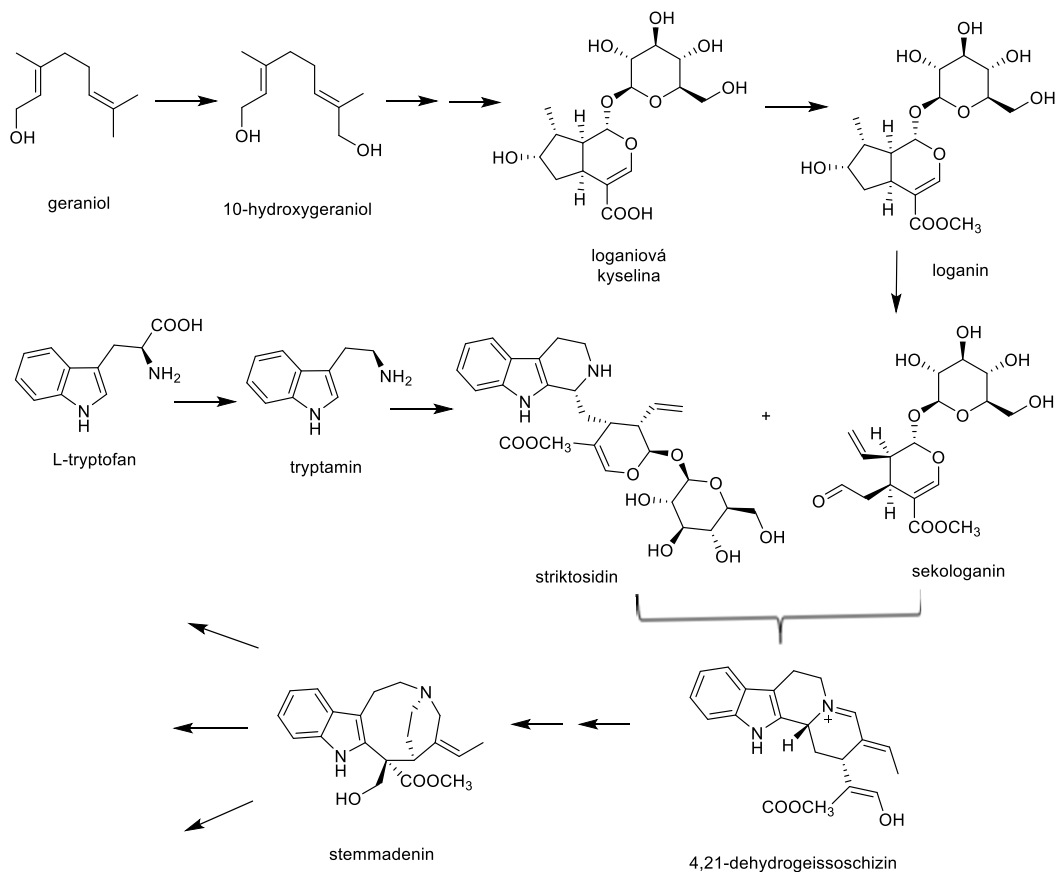
Posledním druhem z rodu *Vinca* L., popsaným v roce 2015, je *Vinca ispartensis* Koyuncu et Ekşi (Obr. 7), opět se vykytující na území Turecka. Stonky dorůstají až 50 cm s koncovými plazivými výhonky. Listy jsou podsedlé nebo krátce řapíkaté, čepel je celokrajná, eliptická až vejčitá. Květy s hustě plstnatými laloky má modré až světle modré. Roste na kamenitých svazích a vápnitých skalních místech ve výšce 1300–1700 m n. m., kde kvete v dubnu až květnu<sup>43</sup>. Podle morfologických znaků pylových zrn, má tento druh blíže k *V. herbacea* Waldst. et Kit., než k *V. soneri* Koyuncu<sup>21</sup>. Podle serveru World Flora Online není zatím *Vinca ispartensis* Koyuncu et Ekşi registrovaným druhem<sup>41</sup>, zatímco na serveru Plants of the World Online už je<sup>42</sup>.



Obr. 7 *Vinca ispartensis* Koyuncu et Ekşi, autoři: M. Çiçek (habitat), K. Terzioğlu (květ), dostupné z <https://turkiyebitkileri.com> 11.2.2022

### 3.1.8 Obsahové látky rodu *Vinca* L.

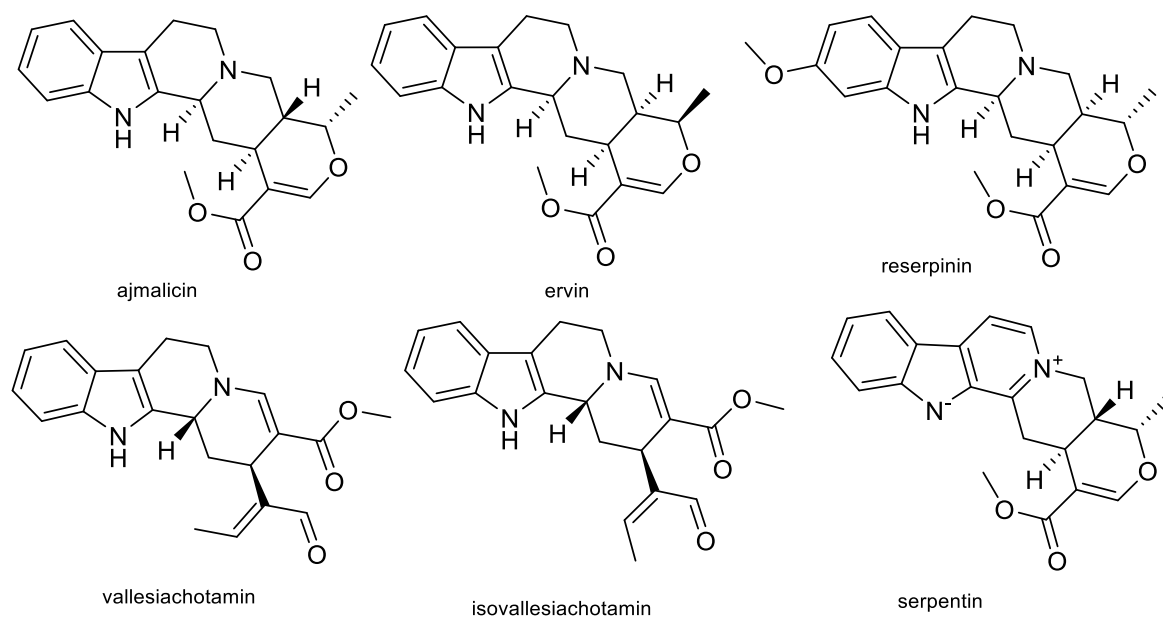
Kromě flavonoidních glykosidů a tríslovin, hlavní podíl bioaktivních sekundárních metabolitů představují monoterpenové indolové alkaloidy<sup>5</sup>. Biosyntéza těchto alkaloidů vychází z aminokyseliny tryptofanu<sup>44</sup>. Její dekarboxylací vzniká významný meziprodukt tryptamin. Dalším meziproduktem klíčovým k biosyntéze monoterpenových indolových alkaloidů je iridoidní glykosid sekologanin, vznikající hydroxylací geraniolu a následnou přeměnou loganiové kyseliny na loganin, u kterého je cyklopentanový kruh oxidačně rozštěpen. Pictet-Spenglerovou kondenzací tryptaminu a sekologaninu vzniká striktosidin, který je prekurzorem všech monoterpenových indolových alkaloidů. Z něho postupně přes 4,21-dehydrogeissoschizin vzniká další meziprodukt stammadenin, u kterého se biosyntetické cesty dále větví<sup>45</sup> (Obr. 8). Podle uspořádání uhlíkového skeletu se monoterpenové indolové alkaloidy dělí do tří základních strukturálních typů – *Corynanthe*, *Iboga* a *Aspidosperma*<sup>46</sup>. Indolové alkaloidy rodu *Vinca* L. vycházejí z indolinu, indolu, hydroxyindolu a 3*H*-indolu<sup>47</sup>. Tyto základní typy mohou být podle různých autorů děleny do dalších podtypů. Studie z roku 2019 zjistila, že alkaloidy nejsou lokalizovány v apoplastickém prostoru, jak se dříve předpokládalo, nýbrž se výhradně vyskytují symplasticky uvnitř buněk listů<sup>48</sup>. U některých alkaloidů bylo zjištěno, že jsou sekretovány i na povrch listů<sup>49</sup>.



Obr. 8 Zjednodušené schéma biosyntézy monoterpenových indolových alkaloidů<sup>45</sup>.

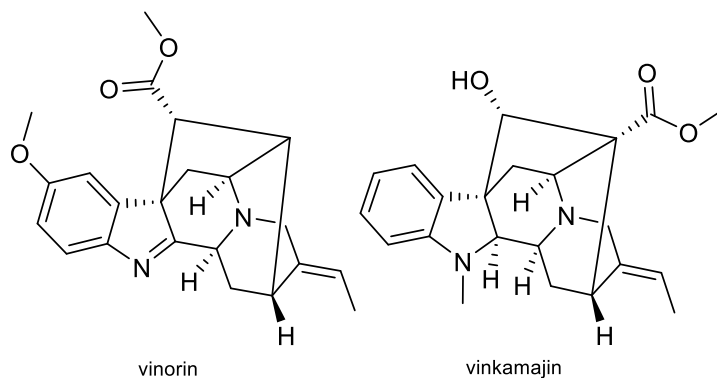
První fytochemická studie na rodu *Vinca* L. byla publikována v roce 1859, kdy francouzský doktor Prosper Lucas izoloval z tohoto rodu nespecifikovanou látku alkaloidní povahy<sup>36</sup>. Většina fytochemických prací na rodě *Vinca* L. však pochází hlavně z 60. a 70. let minulého století. V této době ještě ale nebyly plně rozvinuté některé významné analytické metody jako např. NMR, což vedlo k občasnému chybnému určení struktury, jež se ukázalo až později. V literatuře proto u některých alkaloidů dochází k nepřesnostem a nepořádku. Problematické je rovněž tradiční číslování podle biogeneze, které neodpovídá směrnícím IUPAC<sup>50</sup>. Přesto se Tab. 1 snaží podat ucelený přehled všech dosud zjištěných alkaloidů rodu *Vinca* L. a jejich druhích (kromě výsledků této disertace a s ní souvisejících diplomových prací výzkumné skupiny ADINACO, viz kapitola 6 Diskuze). Nejznámější a prvně popsany alkaloid tohoto rodu byl vinkamin, izolován z listů *V. minor* L. na počátku 50. let v Rusku, který byl strukturně rozluštěn až o několik let později<sup>23</sup>. Nově popsané druhy *V. soneri* Koyuncu a *V. ispartensis* Koyuncu et Ekşi vzhledem ke svému omezenému výskytu na území Turecka nebyly zatím fytochemicky studovány. Mezi strukturní podtypy indolových alkaloidů doposud indentifikovaných v rostlinách rodu *Vinca* L. patří:

**Ajmalicinový** podtyp spadá pod základní skupinu *Corynanthe* alkaloidů a ve *V. minor* L. ho zastupuje šest látek (Obr. 9). Charakteristický pětičlenný cyklus indolo[2,3-*a*]pyrano[3,4-*g*]chinolizidinu je v případě vallesiachotaminu a isovallesiachotaminu v místě heterocyklického kyslíku rozštěpen<sup>25</sup>.



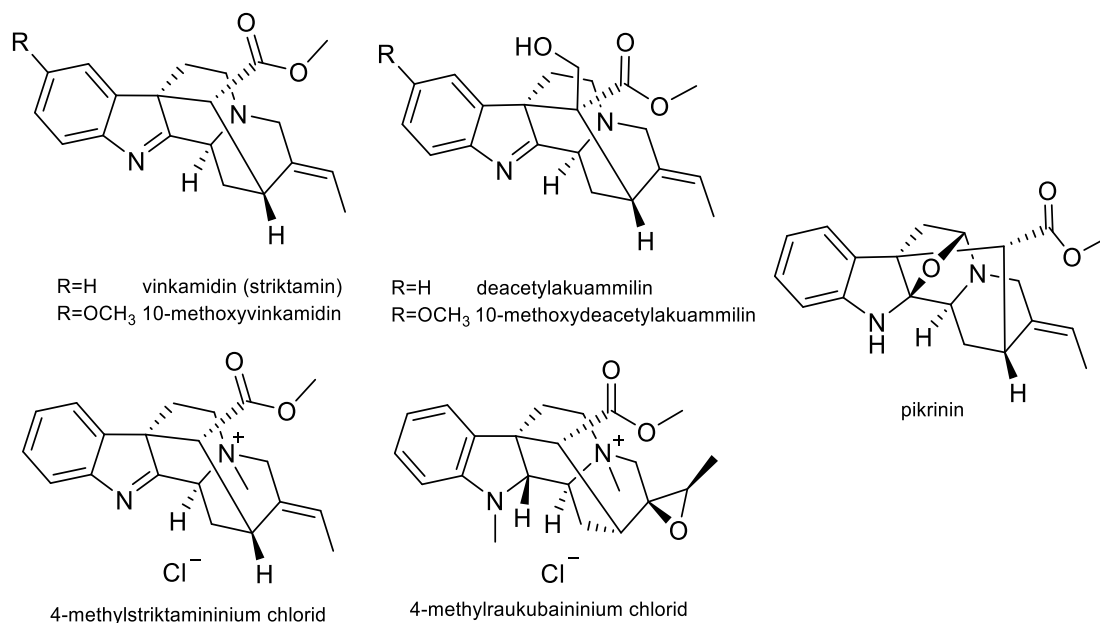
Obr. 9 Alkaloidy *V. minor* ajmalicinového typu.

**Ajmalinový** podtyp, rovněž patřící pod typ *Corynanthe*, je charakteristický hlavně pro druh *V. major* L., ve *V. minor* L. je reprezentován pouze vinkamajinem a vinorinem (Obr. 10). Má indolochinolizidinové jádro s ethylenovým můstkem, a je rovněž strukturně zařaditelný pod skupinu 3*H*-indolů<sup>47</sup>.



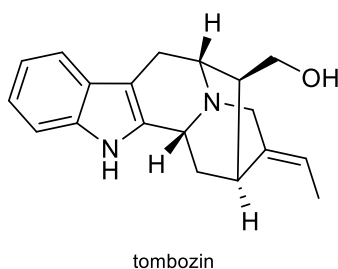
Obr. 10 Alkaloidy *V. minor* L. ajmalinového typu.

**Akuammilinový** podtyp je také charakteristický indolochinolizidinovým skeletem, který je ale propojený methylenovým můstkem, jako je např. u vinkamidinu, nebo deacetylakuammilinu (Obr. 10). Strukturní podvariantou akuammilinového skeletu s etherovým můstkem jsou alkaloidy pikralinového typu, např. pikrinin (Obr. 11) a akuammin. Informace o alkaloidech patřící do této skupiny byly v nedávné době shrnuty v publikovaném článku<sup>51</sup>.



Obr. 11 Alkaloidy *V. minor* L. akuammilinového typu.

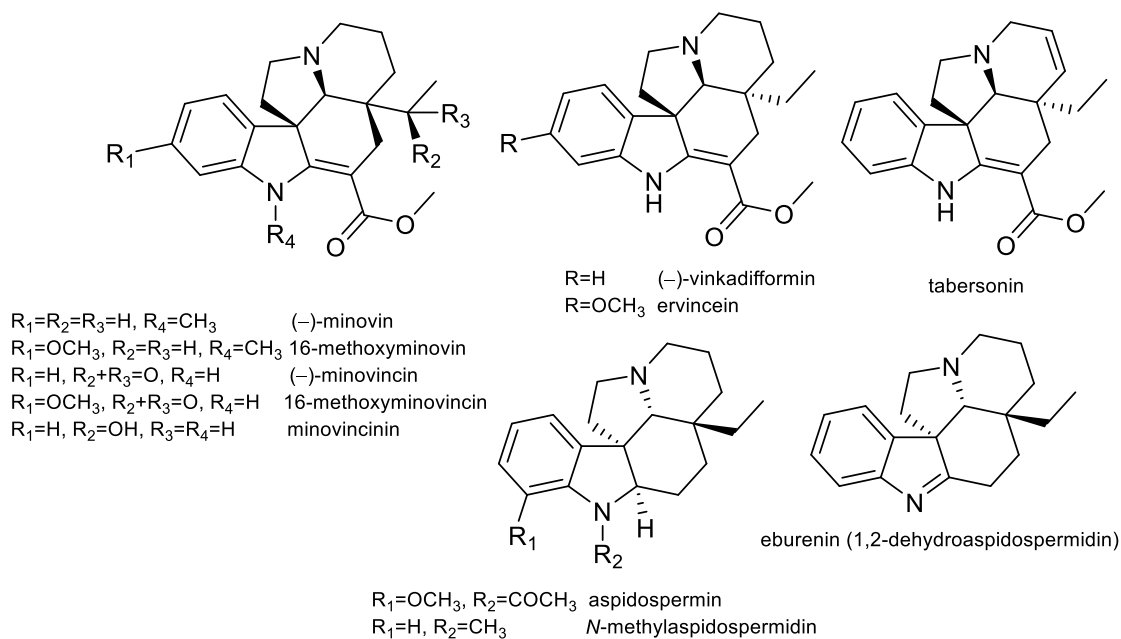
Stejně jako akuammilinový typ, **sarpaginové** alkaloidy mají indolochinolizidinové jádro s methylenovým můstkem, který ale vychází z jiných uhlíků. Ve *V. minor* L. je jediným příkladem těchto sloučenin tombozin<sup>52</sup> (Obr. 12).



tombozin

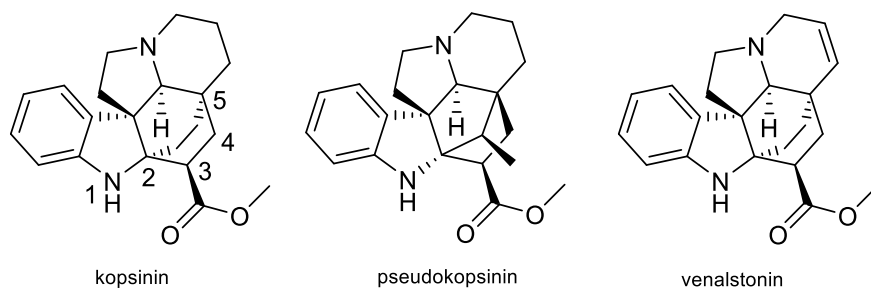
Obr. 12 Alkaloid *V. minor* L. sarpaginového typu.

Nejpočetnějším typem indolových alkaloidů v rodě *Vinca* je **aspidosperminový** typ (základní typ *Aspidosperma*), který má indolizino[8,1-*cd*]karbazolový pentacyklický skelet. Ve *V. minor* L. je reprezentován rovněž širší řadou alkaloidů<sup>135</sup> (Obr. 13).



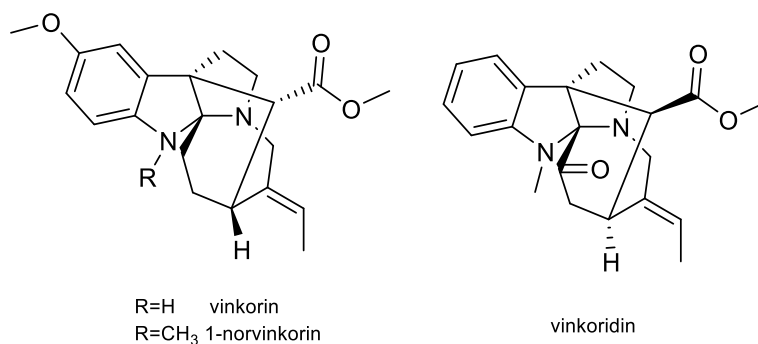
Obr. 13 Alkaloidy *V. minor* L. aspidosperminového typu.

Za podskupinu aspidosperminového typu lze považovat **aspidofraktininový** typ, který byl v rodě *Vinca* L. nalezen pouze v druzích *V. herbacea* Waldst. et Kit. a *V. erecta* Regel et Schmalh. (např. kopsinin, pseudokopsinin, a venalstonin – Obr. 14). Kromě svého aspidosperminového skeletu má uhlíky C2 a C5 spojené ethylenovým můstkem, který je v případě pseudokopsininu zaměněn za methylmethylenovým můstek<sup>53</sup> (Obr. 14).



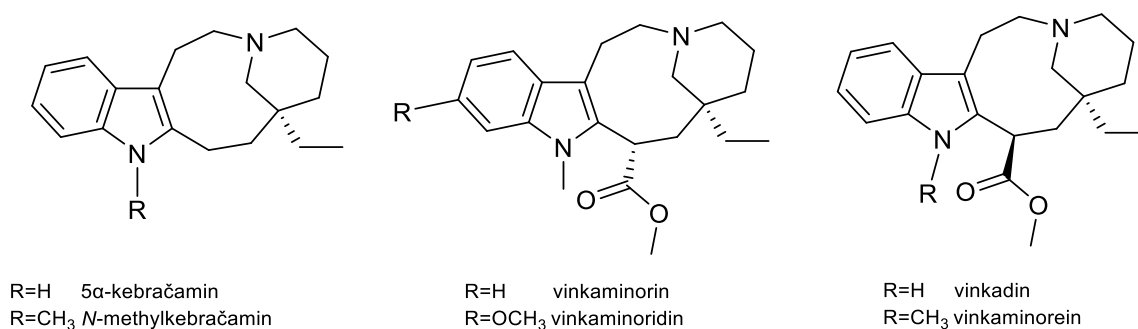
Obr. 14 Příklady alkaloidů aspidofraktininového typu v rodě *Vinca* L.

S pyrrolo[1,3-ab]azepinovým uspořádání uhlíkového skeletu bývá označován **vinkoranový** typ, reprezentovaný ve *V. minor* L. vinkorinem<sup>54</sup>, 1-norvinkorinem<sup>55</sup> a vinkoridinem<sup>56,57</sup> (Obr. 15).



Obr. 15 Alkaloidy *V. minor* L. vinkoranového typu.

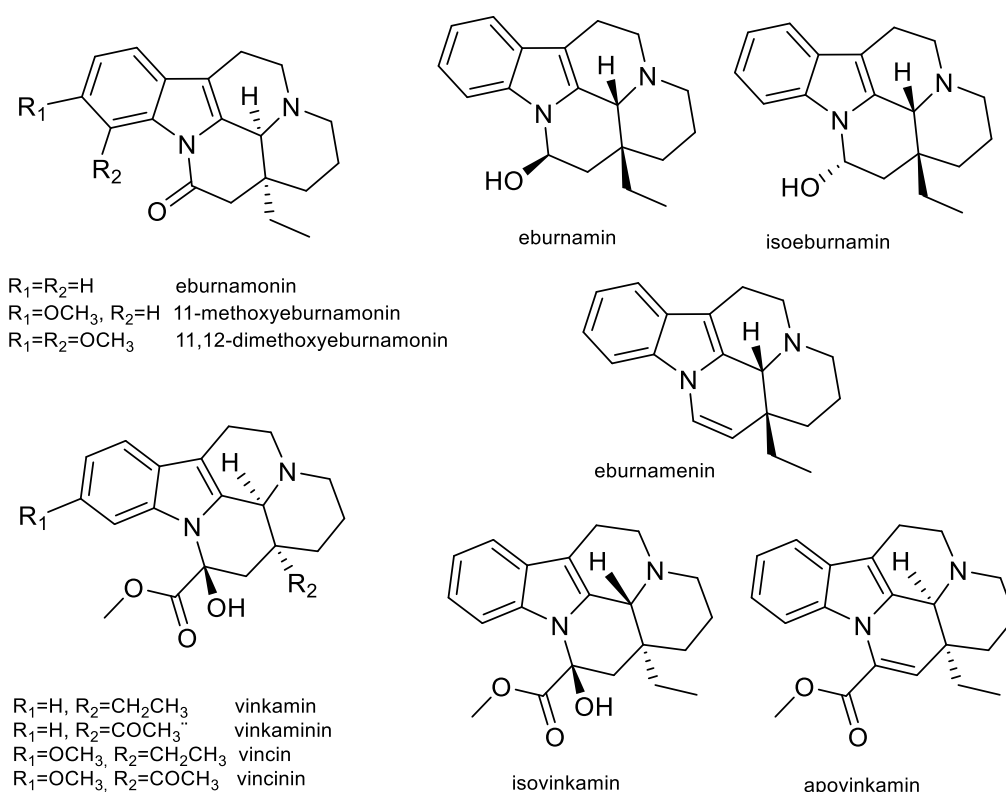
**Kebračaminový** typ bývá některými autory řazen pod aspidosperminový typ<sup>58</sup>, ale pentacyklický skelet aspidosperminu je zaměněn za methanoazacykloundecino[5,4-*b*]indol. Většina alkaloidů tohoto typu byla identifikována v druhu *V. minor* L. (Obr. 16).



Obr. 16 Alkaloidy *V. minor* L. kebračaminového typu.

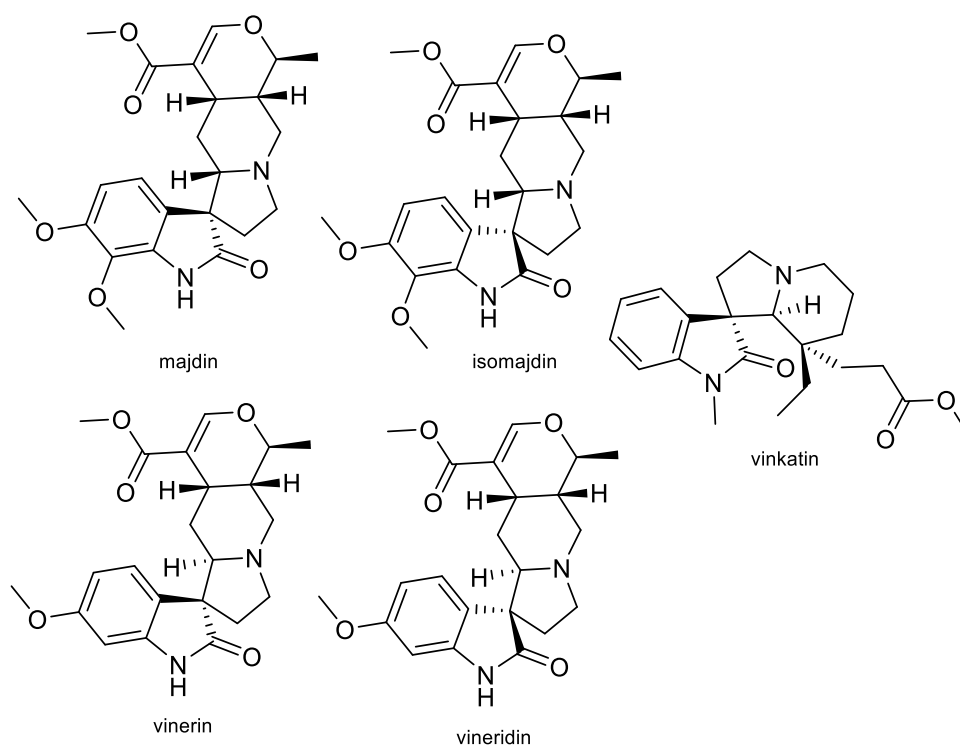


Nejznámějším podtypem *Aspidosmera* alkaloidů je **eburnamoninový**, který je charakteristický hlavně pro *V. minor* L. (Obr. 17). – v ostatních druzích je reprezentován jen pár zástupci (Tab. 1). Nejznámějším alkaloidem tohoto typu je vinkamin, který byl identifikován i ve všech fytochemicky studovaných druzích *Vinca* L. (Tab. 1). Pentacyklický skelet této skupiny je tvořen indolo[3,2,1-*de*]pyrido[3,2,1-*ij*][1,5]naftyridinem<sup>50</sup>.



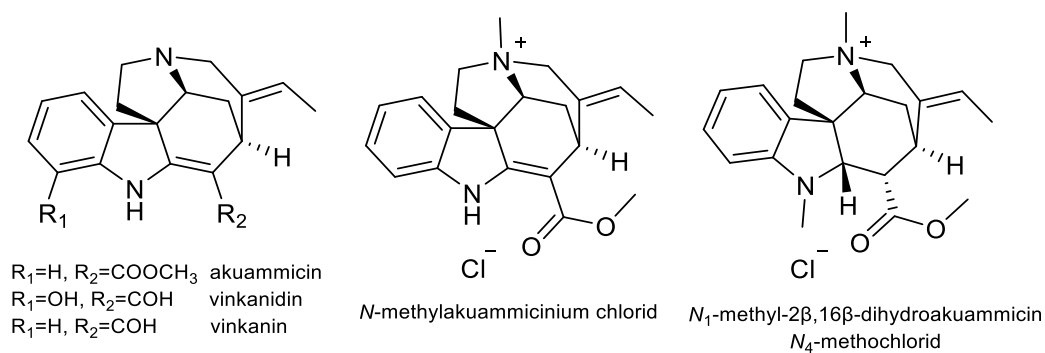
Obr. 17 Alkaloidy *V. minor* L. eburnamoninového typu.

Z derivátů hydroxyindolu vychází **oxindolový** strukturní typ, který byl identifikován ve všech fytochemicky zkoumaných druzích kromě *V. difformis* Pourr. V druhu *V. minor* L. se jedná o vinerin, vineridin, vinkatin, majdin a isomajdin (Tab. 1) (Obr. 18). Obsahuje heterocyklický systém spiro[pyrrolidin-7,7'-oxindolu]<sup>47</sup>.



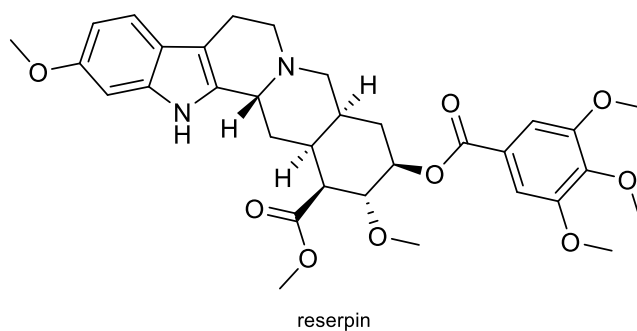
Obr. 18 Alkaloidy *V. minor* L. oxindolového typu.

Ačkoliv rod *Vinca* L. alkaloid strychnin neobsahuje, jemu strukturně podobné alkaloidy **strychninového** podtypu (základní typ *Corynanthe*) se v rodě vyskytují. Ve *V. minor* L. se jedná zejména o akuammicin a další podobné metabolity<sup>52</sup> (Obr. 19).



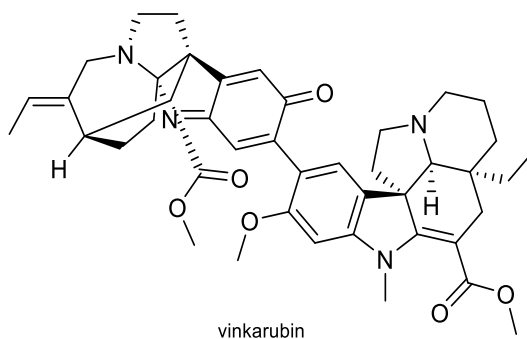
Obr. 19 Alkaloidy *V. minor* L. strychninového typu.

Jediným **yohimbanovým** podtypem z rodu *Vinca* L. je reserpin (Obr. 20), který byl identifikován v druzích *V. minor* L.<sup>56</sup>, *V. major* L.<sup>91</sup>, a *V. herbacea* Waldst. et Kit.<sup>67</sup>.



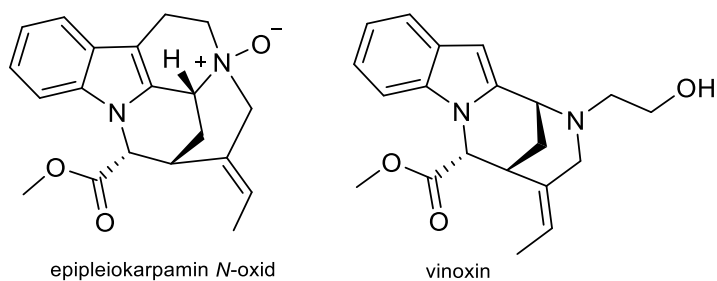
Obr. 20 Alkaloid *V. minor* L. yohimbinového typu.

Z dimerních **bisindolových** alkaloidů byl dosud v rodu *Vinca* L. objeven pouze vinkarubin (Obr. 21), složený z modifikovaného 1-norvinkorinu a 16-methoxyminovinu<sup>59</sup>.



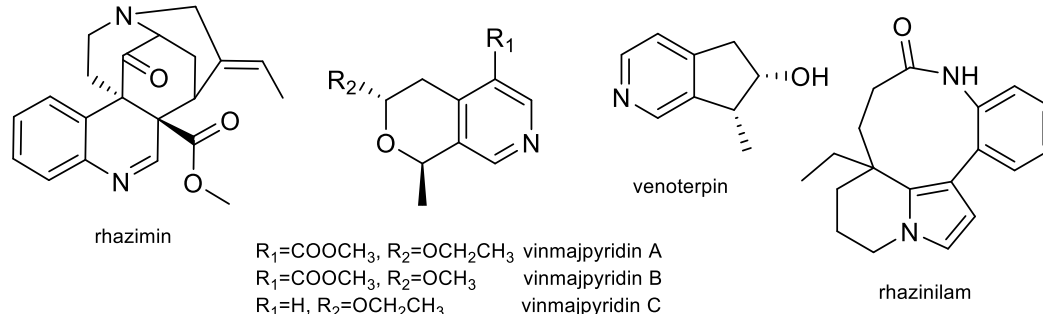
Obr. 21 Alkaloid *V. minor* L. bisindolového typu.

Mezi indolové alkaloidy, které nepatří ani do jedné z uvedených skupin a mají svůj unikátní skelet, patří epipleiokarpamin vyskytující se ve formě *N*-oxidu a vinoxin (Obr. 22), které byly z nati *V. minor* L. izolovány a identifikovány<sup>60,228</sup>. V ostatních druzích byly nalezeny jadiffin<sup>61</sup>, difforlemenin<sup>62</sup> a herbarinin<sup>63</sup>.



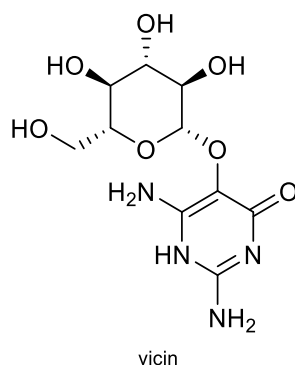
Obr. 22 Alkaloidy *V. minor* L. nezařazeného indolového typu.

Kromě hlavního podílu indolových alkaloidů, rod *Vinca* L. obsahuje i několik chinolinových<sup>64</sup>, pyridinových<sup>65</sup>, a jednoho zástupce specifického rhazinilamového typu<sup>64</sup> (Tab. 2) (Obr. 23).



Obr. 23 Vybrané neindolové alkaloidy z rodu *Vinca* L.

V rodu *Vinca* L. se vyskytuje několik glykosidických alkaloidů jako indolový 5β-karboxyvinkosid a striktosamid ve *V. major* L.<sup>66</sup> Ve *V. minor* L. se nachází i pyrimidinový glykosid vicin (Obr. 24), u kterého je ale z hlediska biosyntézy zařazení mezi alkaloidy diskutabilní<sup>67</sup> (Tab. 2).



Obr. 24 Dusíkatý glykosid z *V. minor* L.

Pro úplnost uvádí Tab. 1 i čtyři názvy alkaloidů jež jsou v literatuře zmíněny, ale nelze k nim dohledat strukturu.

Z primárních metabolitů stojí za zmínku obsah mastných kyselin, kde nadzemní části druhů *V. minor* L. a *V. herbacea* Waldst. et Kit. obsahují kvalitativně stejné složení s převahou stearové, linoleové a olejové kyseliny (obsah v sušině cca 2 %)<sup>68</sup>. Z hlediska obsahu fenolických látek, v porovnání s *V. minor* L. a *V. herbacea* Waldst. et Kit. má *V. major* L. jejich obsah nejvyšší<sup>69</sup>.

Tab. 1 Indolové alkaloidy identifikované v rodu *Vinca* L.

Alkaloid	<i>V. minor</i> L.	<i>V. major</i> L.	<i>V. herbacea</i> Waldst. et Kit.	<i>V. erecta</i> Regel et Schmalh.	<i>V. difformis</i> Poupp.
<b>Ajmalicinový typ</b>					
11-hydroxyajmalicin		64			
ajmalicin	70	64,71			
dihydrositsirikin		64			
ervin	52	72	73,74	75,76	
herbacein			77-82		
herbain			77,78,80,81,83		
hervin			80,84		
isoreserpinin			85,86		
isositsirikin		64			
isovallesiachotamin	25	71			
reserpinin (pubescin)	52,87	64,71,88-94	80,85,95,96	76,97	
serpentin	98,99				
sitsirikin		64			
tetrafyllin pseudoindoxyl		71			
vallesiachotamin	25	64,71			
vallesiachotamin lakton		71			
<b>Ajmalinový typ</b>					
10-methoxyperakin		71,100			
10-methoxyraucaffrinolin		71	101		
10-methoxyvinorin		71,100,102			
19,21 $\alpha$ -dihydroxyl-10-methoxy-19,20-dihydrovinorin		102			
19-hydroxyl-10-methoxy-19,20-dihydrovinorin		102			
19-O-acetyl-10-methoxy-19,20-dihydrovinorin		102			
herbadin			53,95,103-105		
herbamin			53,73,95,104,105		
majoridin		71,90,102,106-108			
majorinin		72,91			
perakin		71			
kebračidin			95		
vinkamajin	52	71,72,89,91,93,106,109-111	53,78,95		112
vinkamajinin		113			
vinkamajorein		65,71,72,89,90,92,109			
vinkamajorin A		114			
vinkamedin		71,93,102,106			112,115,116
vinkarin		110	104,117	76,97,118	
vinkawajin		100			
vinmajin A		71			
vinmajin B		71			
vinmajin C		71			
vinmajin D		71			
vinorin	119	71,102			
<b>Akuammilinový typ</b>					
10-hydroxydeacetylakuammilin		64		120	
10-hydroxykathafolin		88			

Tab. 1 Indolové alkaloidy identifikované v rodu *Vinca* L. (pokračování).

Alkaloid	<i>V. minor</i> L.	<i>V. major</i> L.	<i>V. herbacea</i> Waldst. et Kit.	<i>V. erecta</i> Regel et Schmalh.	<i>V. difformis</i> Pourr.
10-hydroxystriktamin		71		120	
10-methoxydeacetylakuammilin	121				
10-methoxyvinkamidin	122				
11-hydroxystriktamin				120,123	
11-methoxyburnamin			101		
17-hydroxypseudoakuammigin		71			
17-methoxypseudoakuammigin		71			
4-methylraukubaininium chlorid	124,125				
4-methylstriktaminium chlorid	124,125				
burnamin (deacetylpikralin)			101		
deacetylakuammilin	121			120	
ervincin				126	
katafolin		71,127			
lanceomigin		71,128			
pikrinin	129,130		95,101		
pseudoakuammigin		64,71,88			
vinkamajoridin (akuammin)		64,71,88,89,91,92,102,108,110,131	132,133	123,134	
vinkamidin (striktamin)	130,135-138		95		
vinkaricin				139,140	
vinkaridin				140,141	
vinkarinin				142	
<b>Aspidofraktininový typ</b>					
6,7-didehydro-8-oxokopsinin				143	
6,7-didehydro-8-oxokopsinin <i>N</i> -oxid				144	
kopsanon				145	
kopsinilam			53	126	
kopsinin (ervinin)			53,146	134,147,148	
kopsinin <i>N</i> -oxid				149	
pseudokopsinin			53	134,147	
pseudokopsinin chloromethylát				150	
pseudokopsinin <i>N</i> -oxid				149	
venalstonin			95	144	
<b>Aspidosperminový typ</b>					
1,2-dehydroaspidospermidin				145	
11-methoxyvinkadiformin			74		
16-methoxyminovincin (minoricein)	151-153				
16-methoxyminovincinin	154				
16-methoxytabersonin			53,77,80,155	156,157	
3-oxolochnericin		71			
3-oxotabersonin		71			
aspidospermin	158				
eburenin	130,135				
ervamin				123	
ervincein	67,159		53,146	156,160	
ervincinin				156,161	
ervinidinin				162	
lochnericin		71			

Tab. 1 Indolové alkaloidy identifikované v rodu *Vinca* L. (pokračování).

Alkaloid	<i>V. minor</i> L.	<i>V. major</i> L.	<i>V. herbacea</i> Waldst. et Kit.	<i>V. erecta</i> Regel et Schmalh.	<i>V. difformis</i> Pourr.
lochnerinin			80,155		
(-)-minovin	130,151,153,163				
(±)-minovin	54,164				
(-)-minovincin	151,152,165				
(+)-minovincin	163,166				
minovincinin	151,152,165,167			150	
<i>N</i> -methyl-6,7- dehydroaspidospermidin			168		
<i>N</i> -methylaspidosperimidin	135				
tabersonin	87,98,99		77,80,95,117,146,155		
(-)-vinkadiformin	130,151		53		
(±)-vinkadiformin	67,164	64,71,169	74		112
vinkolin			95		
<b>Bisindolový typ</b>					
vinkrarubin	130,170,171				
<b>Eburnamoninový typ</b>					
11,12- dimethoxyeburnamonin	172				
11-methoxyeburnamonin	173				
14,15-dehydrovinkamin		71			
apovinkamin	67,87			145	
eburnamenin	135,174				
(-)-eburnamonin	130,135,174,175				
(±)-eburnamonin	135,174,176,177				
eburnamin	130,135,174			145	
epivinkamin	130,135,174,178				
isoeburnamin	130,135				
isovinkamin	136,179-183				
vincin	165,184-191	89		118,192	
vincinin	185,189,193				
vinkamin	24,52,98,130,136,137,151,163,165,178- 186,188,189,191,194-203	64,71,89,110	204,205	118,123	116
vinkaminin	177,183,185,189,193				
<b>Oxindolový typ</b>					
16-karboxyherbavin			85,206		
erycinin				207	
herbalin			80,208		
herbavin			85,209		
herboxin		71	53,210		
isoherbavin			85		
isomajdin	211	71	53,80,101,212		
kaboxin A			101		
majdin	52	64,71,88,106,109	53,80,212	213	
<i>N</i> -acetylvinerin				192	
reserpinin oxindol		71			
vineridin	52	71		134,148	
vineridin <i>N</i> -oxid				213	
vinerin	52	71		134,148	
vinerin <i>N</i> -oxid				143	

Tab. 1 Indolové alkaloidy identifikované v rodu *Vinca* L. (pokračování).

Alkaloid	<i>V. minor</i> L.	<i>V. major</i> L.	<i>V. herbacea</i> Waldst. et Kit.	<i>V. erecta</i> Regel et Schmalh.	<i>V. difformis</i> Pourr.
vinerinin				214	
vinkatin	175,215				
vinmajin G		71			
<b>Pyridino-indolo- chinolizidonový typ</b>					
19- <i>O</i> -methylangustolin		71			
angustidin		71			
nauklefin		65			
vinmajin H		71			
vinmajin I		71			
<b>Kebračaminový typ</b>					
5 $\alpha$ -kebračamin	135			145	
ervinidin				76,162	
( $\pm$ )- <i>N</i> -methylkebračamin	216				
vinkadin	54,130				
vinkaminorein	130,136,138,153,163,217				
vinkaminoridin	56,57				
vinkaminorin	130,136- 138,153,163,182,217				
<b>Sarpaginový typ</b>					
10-methoxyvellosimin		71,89,90,127			
11-hydroxypolyneuridin		25			
akuammidin				75,147	112
difforin					218
ervincidin				145	
lochvinerin		90			
majvinin		219			
<i>O</i> -benzoyltombozin				149	
sarpagin					116
tombozin	52			76	218
vellosimin					220
vinkadiffin					220
vinkamajorin B		114			
vinmajin E		71			
vinmajin F		71			
vinmajorin C		64			
vinmajorin D		64			
vinmajorin E		64			
<b>Strychninový typ</b>					
akuammicin	52,211	72,88	205,221	118,123	
akuammicin <i>N</i> -oxid		71			
<i>N</i> <sup>1</sup> -methyl-2 $\beta$ ,16 $\beta$ - dihydroakuammicin	60				
<i>N</i> <sup>4</sup> -methochlorid					
<i>N</i> -methylakuammicinium chlorid	124,125				
vinervin				76,118,134,147,222	
vinervinin				76,123	
vinkanicin				223	
vinkanidin	52				



Tab. 1 Indolové alkaloidy identifikované v rodu *Vinca* L. (pokračování).

Alkaloid	<i>V. minor</i> L.	<i>V. major</i> L.	<i>V. herbacea</i> Waldst. et Kit.	<i>V. erecta</i> Regel et Schmalh.	<i>V. difformis</i> Pourr.
vinkanin	52				
vinkanin <i>N</i> -oxid				144	
<b>Vinkoranový typ</b>					
1-norvinkorin	55				
vinkoridin	56,57				
vinkorin	54				
<b>Yohimbinový typ</b>					
reserpin	52,224	106,109,225	53,83,146,226		
<b>Nezařazené indolové alk.</b>					
difforlemenin					62
epipleiokarpamin <i>N</i> -oxid	60				
herbarinin			63		
jadiffin					61
vinoxin	130,135,227,228				
<b>Glykosidické indolové alkaloidy</b>					
5β-karboxyvinkosid		66			
striktosamid		64,66,71,88			

Tab. 2 Ostatní alkaloidy identifikované v rodu *Vinca* L.

Alkaloid	<i>V. minor</i> L.	<i>V. major</i> L.	<i>V. herbacea</i> Waldst. et Kit.	<i>V. erecta</i> Regel et Schmalh.	<i>V. difformis</i> Pourr.
<b>Chinolinové alkaloidy</b>					
rhazimin		64			
skimmianin			229		
tetrahydromeloscin		64			
<b>Pyridinové alkaloidy</b>					
venoterpín		230			
vinmajpyridin A		65			
vinmajpyridin B		65			
vinmajpyridin C		65			
<b>Pyrimidinový glykosid</b>					
vicin	67				
<b>Rhazinilamový typ</b>					
rhazinilam		64			
<b>Bez struktury</b>					
maidinin				143	
vincésin	175				
vinomin	231				
vintsin	136				

### 3.1.9 Biologická aktivita indolových alkaloidů *Vinca minor* L.

K izolaci a zkoumání biologických aktivit čistých látek často vede analýza a zajímavé biologické aktivity sumárních extraktů rostlin. V tomto ohledu např. alkaloidní extrakt z *V. minor* L. a *V. major* L. vykázal silnou anticholinesterasovou aktivitu, stejně tak jako antioxidační aktivitu zabraňováním peroxidace lipidů a vychytáváním DPPH radikálů<sup>25</sup>. Extrakt z *V. minor* L. (ale i z *V. herbacea* Waldst. et Kit. a *V. major* L.) vykazoval cytotoxickou aktivitu proti buněčným liniím keratinocytů HaCaT a melanomu A375; navíc, extrakt z *V. minor* L. měl i antibakteriální aktivitu<sup>69</sup>. Alkaloidní extrakt z listů *V. herbacea* Waldst. et Kit. rovněž prokázal *in vitro* anticholinesterasový efekt srovnatelný s galantaminem a antioxidační aktivitu<sup>101</sup>, k níž přispívá vysoký obsah flavonoidů (kvercetin, rutin)<sup>232</sup>. Následuje ucelený přehled nejvýznamnějších biologických aktivit všech indolových alkaloidů *Vinca minor* L.

Biologicky nejvýznamějším alkaloidem z *V. minor* L. je **vinkamin**, jehož semisyntetický derivát vinpocetin se používá k podpůrné léčbě poruch prokrvení mozku a demence cerebrovaskulárního původu<sup>26</sup>. Vinkamin je sám o sobě v některých státech registrován jako bezpečný doplněk stravy (viz kapitola 3.2.2)<sup>27</sup>. Byla na něm provedena řada biologických i klinických studií, kde se projevil významnými aktivitami indikujícími jeho použití jako nootropika při degenerativních i cerebrovaskulárních demencích<sup>233-235</sup>. Jeho hlavním účinkem je zvýšení průtoku krve v mozku dilatací cév<sup>236</sup> a zlepšení metabolismu glukosy. Jedním z mechanismů zlepšení glukosové homeostázy je agonismus GPR40 receptorů<sup>237</sup>, což může vysvětlit i jeho antidiabetické působení, které bylo prokázáno u myší hypoglykemickým, hypolipidemickým a antioxidačním účinkem<sup>238</sup>. U mozku stárnoucích myších zvyšoval jeho aktivitu, což bylo sledováno zvýšeným vychytáváním deoxyglukosy<sup>239</sup>. Neuroprotektivní působení bylo rovněž prokázáno v rámci celé řady studií. Vinkamin byl schopný chránit buňky PC12 proti apoptóze navozené peroxidem vodíku<sup>240</sup>, měl protektivní efekt na buněčný metabolismus alveolárních makrofágů při hypoxii<sup>241</sup>, zkracoval čas k objevení neuroelektrického signálu po navození hypoxie v pokusu na myších<sup>242</sup> a zlepšení EEG signálu mozku bylo pozorováno i u několika starších pacientů s chronickým cerebrovaskulárním onemocněním po intravenózní aplikaci<sup>243</sup>. Vinkamin rovněž působí jako blokátor napětově řízených sodíkových kanálů, což naznačuje jeho možné antikonvulzivní a neuroprotektivní působení při ischemickém poškození<sup>244</sup>. Dalším mechanismem je snižování oxidačního stresu snížením koncentrace železa v mozku<sup>245</sup>. Podle studie na buňkách PC12 je vinkamin schopný snižovat oxidační stres navozený toxickým  $\beta$ -amyloidem<sup>246</sup>. V jiných studiích vykázal hypotenzivní účinky<sup>247</sup> a pozitivní hemodynamický efekt na ischemické zóny v mozku<sup>248</sup>.

Při dalším testu na myších rovněž vykázal antihypoxický efekt, kdy zvyšoval schopnost přežití v prostředí bez kyslíku<sup>249</sup>. Nejnovější studie zjistila jeho antineoplastický účinek na buňky lidského plicního karcinomu A549 stimulací na kaspase-3 dependentní apoptózy, včetně jeho schopnosti zhášet radikály<sup>27</sup>.

Jeho 3-epimer **isovinkamin** a derivát **apovinkamin** po intravózním podání psům zlepšovaly krevní mozkový oběh stejně efektivně jako samotný vinkamin<sup>250</sup>.

Dalším významným alkaloidem, který se využíval v minulosti jako antihypertenzivum, je **ajmalicin**, který bývá označován i jako raubasin nebo  $\gamma$ -yohimbin. Mechanismus jeho účinku je blokace  $\alpha_1$ -adrenergických receptorů<sup>251</sup>. Dnes je však obsoletní a dává se přednost novějším léčivům<sup>252</sup>. V jedné studii ajmalicin projevilo schopnost neuroprotektce před  $A\beta_{42}$  a peroxidem vodíku, a rovněž inhiboval MAO-B a BACE1 v závislosti na koncentraci<sup>253</sup>. Kromě toho v další *in vitro* studii indukoval apoptózu u *Trypanosoma brucei*<sup>254</sup>. Ajmalicin je rovněž slabým nekompetitivním reverzibilním antagonistou nikotinových receptorů<sup>255</sup>. Jedná se o silný inhibitor CYP2D6<sup>256</sup>.

**Akuammicin** projevilo mírnou toxicitu proti buněčným liniím karcinomu plic A549<sup>257</sup>. Je schopný zlepšovat využití glukózy adipocyty<sup>258</sup> a na morčatech byl pozorován jeho agonismus opioidních  $\kappa$ -receptorů<sup>259</sup>, což bylo potvrzeno i v nejnovější studii z roku 2021<sup>260</sup>. Při testování inhibice AChE nevykázal významnou aktivitu ( $IC_{50} = 221 \mu M$ )<sup>261</sup>.

**Aspidospermin** vykazuje antiprotozoální účinek na *Trypanosoma cruzii* prostřednictvím inhibice trypanothion reductasy<sup>262</sup>. Na různých urogenitálních tkáních byla studována jeho adrenergně inhibiční aktivita<sup>263</sup>. Jeho analoga (i látka sama o sobě) vykazují antiplasmodiální aktivitu<sup>264</sup>. Byla studována i jeho cytotoxická a genotoxická aktivita na buněčné línii HepG2<sup>265</sup>. Ve studii na morčatech zvyšoval jejich přežití po anafylaktickém šoku, na jejich průdušnici navozoval myorelaxaci<sup>266</sup>. U myších rovněž chránil před arytmií navozenou chloroformem, měl antihypertenzivní účinky a působil bronchodilatačně<sup>267</sup>.

**Eburenin** vykázal střední inhibiční aktivitu proti šesti kmenům kvasinek (amfotericin B jako pozitivní kontrola)<sup>268</sup> a byl mírně cytotoxický proti nádorovým buněčným liniím HCT-116, PC-3 a HepG2<sup>269</sup>.

Intenzivně studovaným alkaloidem byl **eburnamonin**, známý též pod synonymy vinburnin a vinkamon, jež se jako vasodilatans mozkových cév a neuroprotektivum dostal i do klinických studií. Zpočátku byl studován například na psech, kde zlepšoval hemodynamické parametry a metabolickou aktivitu mozku dokonce více než vinkamin<sup>270</sup>. U myši významně zvyšoval vychytávání deoxyglukózy v mozku a snižoval pokles mozkového elektrického náboje po hypoxii; zároveň stimuloval glykolýzu červených krvinek na zdravých dobrovolnících, což

naznačilo jeho potencionální využití jako metabolického stimulantu mozku s antihypoxickým účinkem<sup>271</sup>. Další studie na myších ukázala jeho schopnost snižovat následky edému mozku<sup>272</sup>. U myší rovněž snižoval následky retrográdní amnézie navozené skopolaminem<sup>273</sup>, za což může být odpovědná jeho allosterická modulace muskarinových receptorů a následná stimulace cholinergní transmise<sup>274</sup>. V klinické studii na 129 pacientech s cerebrovaskulárním postižením zlepšoval mozkové funkce<sup>275</sup>; účinnost byla ověřena i v dalších klinických studiích<sup>276</sup>. Eburnamomin prokázal i pozitivní účinky v klinické studii při angiopatii dolních končetin při diabetu<sup>277</sup>. V další malé klinické studii zlepšoval rheologické vlastnosti krve a přenos kyslíku<sup>278</sup>. Vzhledem k účinnějšímu vinpocetinu, který se vyznačuje podobnými účinky, se však v klinickém používání eburnamomin neprosadil<sup>23</sup>. Kromě neuroprotektivních a vasodilatačních vlastností rovněž vykázal i střední aktivitu proti nádorovým bučným liniím A549, HT-29 a HCT-116 (pozitivní kontrolou byl docetaxel)<sup>279</sup>.

**Isomajdin**, někdy označovaný jako elegantin, po intravenózní aplikaci kočkám a psům způsoboval hypertenzi<sup>280</sup>, avšak v jiné studii způsobil u laboratorních zvířat krátkou hypotenzivní odezvu<sup>281</sup>. Studována byla jeho antioxidační aktivita a indukce apoptózy na temporální kortikální tkáni myší<sup>282</sup>.

**Isovallesiachotamin** má významnou cytotoxickou aktivitu proti buněčným liniím plicního karcinomu A549<sup>283</sup> a H1299<sup>284</sup>, glioblastomu U87, karcinomu tlustého střeva HCT-116, a zároveň má protizánětlivý účinek inhibicí produkce NO mikroglií<sup>285</sup>.

U **majdinu** byla po podání laboratorním zvířatům pozorována krátká hypotenzivní odezva<sup>281</sup>. Stejně jako isomajdin měl antioxidační aktivitu a u temporální kortikální tkáně myší indukoval apoptózu<sup>282</sup>.

**N-Methylakuammicinium chlorid** vykázal bronchodilatační účinky při histamin-fosfátem indukované kontrakci izolované hladké svaloviny plicních orgánů morčat<sup>286</sup>.

Mezi biologické aktivity **pikrininu** patří např. antiastmatický a antitusický účinek<sup>287</sup>, dále analgetický a protizánětlivý efekt inhibicí 5-LOX<sup>288</sup>, nebo antibakteriální účinek proti *Enterococcus faecalis* a *Pseudomonas aeruginosa* (MIC = 1,56 µg/ml)<sup>289</sup>. Byl pozorován jeho tlumivý vliv na CNS<sup>290</sup>. Spolu s několika dalšími indolovými alkaloidy se uplatňuje v patentech na přípravky k léčbě zánětu a symptomů respiračních onemocnění<sup>291-294</sup>.

**Reserpin** byl v minulosti používán jako jedno z prvních antihypertenziv díky jeho schopnosti snižovat koncentraci noradrenalinu v adrenergických nervech. Vzhledem k jeho četným nežádoucím účinkům jako sedace, deprese, bradykardie, atd. se ale přestal používat<sup>295</sup>. Byla u něj objevena i významná anticholinesterasová aktivita (AChE IC<sub>50</sub> = 1,7 µM,

BuChE  $IC_{50} = 2,8 \mu M$ ), inhibice agregace  $\beta$ -amyloidu se snížením jeho toxicity, a rovněž inhiboval MAO-B a BACE1 v závislosti na jeho koncentraci<sup>253</sup>.

Alkaloid **reserpinin**, neboli také pubescin, v experimentu na myších snižoval jejich pohybovou aktivitu, měl hypotenzivní účinky a prodlužoval účinek uspávacích prostředků<sup>296</sup>. Existuje patent na přípravek s jeho obsahem, který má pomáhat ke zvýšení pigmentace kůže<sup>297</sup>.

**Serpentin** byl původně studován jako antiarytmikum, kdy v několika studiích intravenózně podaný u psů snižoval ventrikulární tachykardii navozenou ouabainem<sup>298-300</sup>. V pozdější studii vykázal zajímavou selektivní inhibici syntézy DNA kancerogenních buněk vůči zdravým<sup>301</sup>. Byla studována i jeho schopnost inhibice *eel*AChE ( $IC_{50} = 0,78 \mu M$ ), a zároveň se projevil jako reverzibilní kompetitivní antagonist muskarinových receptorů<sup>255</sup>. Disponuje také antioxidační aktivitou za jejímž mechanismem by mohla stát inhibice jaderné translokace nukleárního faktoru kappa B (NF- $\kappa$ B)<sup>302</sup>. Jde o silný inhibitor CYP2D6<sup>256</sup>.

**Tabersonin** je další signifikantně cytotoxickou látkou vůči nádorovým liniím SW480, SMMC-7721, HL-60, MCF-7 a A549<sup>303</sup>. Významnou antitumorovou aktivitu projevil na několika dalších buněčných liniích, což dokládá patent z roku 2017<sup>304</sup>, nebo nová studie z roku 2021<sup>305</sup>. Z těchto důvodů se objevuje v patentech na léčbu karcinomu jícnu<sup>306</sup> i jiné maligní tumory<sup>307</sup>. Tabersonin by mohl být rovněž potenciálně využitelný v léčbě Alzheimerovy nemoci, protože se váže na patologické  $A\beta_{1-42}$  oligomery a zabraňuje jejich agregaci při formování  $\beta$ -amyloidních plaků<sup>308</sup>. V rámci *in vitro* i *in vivo* studií se zjistilo, že má i významnou protizánětlivou aktivitu komplexním mechanismem účinku (inhibice signální kaskády prozánětlivých mediátorů)<sup>309</sup>. Na myších byl studován jeho antiaterosklerotický efekt mechanismem aktivace proteinu CREB<sup>310</sup>. V dalším experimentu na myších chránil před dexametazonem navozenou osteoporózou<sup>311</sup>. V roce 2017 byl registrován patent na přípravek s tabersoninem pro prevenci vypadávání vlasů a podpoření jejich růstu díky jeho údajné inhibici androgenní signální dráhy<sup>312</sup>. Rovněž existuje i patent na přípravek s tabersoninem, který má pomáhat regeneraci kožních buněk<sup>313</sup>.

U **tombozinu** (často zmiňovaném jako normakusin B) byly na myších studovány jeho hypotenzivní a spasmolytické účinky<sup>314</sup>. Rovněž vykázal sedativní efekt projevující se zpomalením reflexů a bioelektrické aktivity mozku<sup>315</sup>.

**Vallesiachotamin** je významně cytotoxickou látkou, což byl prokázáno na buněčných liniích promyelocytické leukémie HL-60, hepatokarcinomu SMMC-7721, plicního adenokarcinomu A549, karcinomu prsu SK-BR-3<sup>316</sup>, karcinomu nosohltanu KB, leukémie P388<sup>317</sup>, melanomu<sup>318</sup> a karcinomu plic H1299<sup>284</sup>. Kromě jeho významných cytotoxických aktivit má i protizánětlivé účinky prokázané na larvách rybek *Danio rerio* snížením produkce

TNF- $\alpha$  a IL-6<sup>319</sup>. V rámci jiné studie *in vitro* inhiboval COX-2<sup>288</sup>. Dále *in vitro* prokázal inhibici epigenetických enzymů uplatňujících se při neurodegenerativních onemocněních (sirtuiny)<sup>320</sup> a je relativně silným inhibitorem BuChE (IC<sub>50</sub> = 7,1  $\mu$ M) a MAO-A (IC<sub>50</sub> = 2,1  $\mu$ M)<sup>321</sup>. Rovněž má antibakteriální aktivitu proti *Enterococcus faecalis* a *Pseudomonas aeruginosa* (MIC = 1,56  $\mu$ g/ml)<sup>289</sup>.

U **vincinu** (11-methoxyvinkaminu) byl pozorován jeho lokálně anestetický a antitusický účinek<sup>322</sup>.

**Vinkadiformin** je cytotoxický alkaloid, u kterého byla tato aktivita zjištěna na buňkách leukémie P388, kde prokázal odlišný mechanismus účinku než dimerní indolové alkaloidy<sup>323</sup>. Cytotoxicitu vykazoval i vůči buněčným liniím plicního karcinomu A549<sup>283</sup>. Byl studován i jako výchozí látka pro přípravu cytotoxických a antiplasmodiálních derivátů<sup>324,325</sup>. Ve studii na kočkách vyvolával pokles krevního tlaku v podobné míře jako reserpin<sup>326,327</sup>.

**Vinkamajin** v *in vivo* studii na kočkách, králících i potkanech prokázal antiarytmické účinky<sup>328</sup>.

**Vinkamidin**, neboli striktamin, je zajímavý pro jeho schopnosti inhibovat MAO *in vitro* i *in vivo* (myši)<sup>329</sup>, má signifikantní antivirové účinky proti *Herpes simplex* a adenoviru<sup>330</sup>, *in vitro* vykazuje protizánětlivý efekt inhibicí cyklooxygenas<sup>288</sup>, a rovněž byl cytotoxický proti nádorovým buněčným liniím HCT-116, PC-3 a HepG2<sup>269</sup>.

**Vinkaminorein** a jeho stereoizomer **vinkaminorin** byly zatím pouze testovány v jedné studii, která ukázala jejich cytotoxický účinek na buňky leukémie P388<sup>323</sup>.

**Vinkanidin** má spíše toxické účinky, které se projevovaly u psů zvracením<sup>331</sup>, poklesem krevního tlaku a snížením srdečních kontrakcí<sup>332</sup>. Při testování na myších, potkanech i králících vykázal také tlumivé účinky na CNS<sup>333</sup>. Další studie studovala jeho využití proti lamblióze<sup>334</sup>.

**Vinkanin** *in vitro* inhiboval AChE (IC<sub>50</sub> = 26,8  $\mu$ M) a zároveň prokázal analeptický efekt podobný strychninu<sup>335</sup>.

Dimerní alkaloid **vinkarubin** prokázal cytotoxicitu na buňkách leukémie P388<sup>59</sup>.

**Vineridin** v *in vivo* studii na myších vykazoval sedativní a hypotenzivní účinky, jež by mohly být způsobené relaxací hladkých svalů. Jeho intravenózní injekce kočkám však působila uterotonicky<sup>336</sup>.

U **vinerinu** byl ve studii na myších popsán hypotenzivní účinek, který byl způsobený blokací gangliových buněk<sup>337</sup>.

**Vinorin** v *in vitro* studii vykázal inhibiční aktivitu proti cholinesterasám (AChE IC<sub>50</sub> = 35  $\mu$ M, BuChE IC<sub>50</sub> = 36  $\mu$ M)<sup>338</sup>. U myší urychloval regeneraci poškozeného

sedacího nervu regulací nervového růstového faktoru (NGF) a extracelulárně regulované kinasy (ERK)<sup>339</sup>.

Ostatní indolové alkaloidy vykytující se ve *V. minor* L. zatím ve studiích významnou biologickou aktivitu neprokázaly, nebo ještě nebyly studovány.

## 3.2 Alzheimerova choroba

První dokumentovaný případ této nemoci popsal německý lékař Alois Alzheimer v roce 1906 u pětapadesátileté pacientky, u které posléze provedl i pitvu mozku. Jeho poznatky byly ze začátku odbornou veřejností vnímány pouze jako kuriozita, ale po několika letech dalšího výzkumu mozkových tkání bylo toto neurodegenerativní onemocnění po něm pojmenováno<sup>340</sup>. S prevalencí až 1 % v populaci se jedná o čtvrtou až pátou nejčastější příčinu úmrtí u lidí starších 65 let a nejčastější formou demence (zodpovědnou za 50–70 % případů)<sup>340</sup>. Současně se předpokládá, že množství pacientů se za dalších 30 let může až ztrojnásobit na více než 136 miliónů<sup>6</sup>.

### 3.2.1 Stručný přehled patofyziologie

Existuje několik teorií o patofyziologickém vzniku této choroby. Je však jasné, že se jedná o celý komplexní mechanismus biochemických dějů, které v 5–10 % případů jsou podmíněné geneticky<sup>340</sup>. Jedna z nejdůležitějších hypotéz je **cholinergní teorie**, kdy při AD dochází díky destrukci neuronové tkáně k úbytku tvorby acetylcholinu a zvýšení tvorby enzymů, které ho rozkládají, což vede k poruše kognitivních funkcí a paměti<sup>341</sup>. Jak dochází k postupné destrukci neuronové tkáně může vysvětlovat **hypotéza amyloidní kaskády**, kdy se z amyloidního prekursorového proteinu (který je normálně štěpen  $\alpha$ -,  $\beta$ - a  $\gamma$ -sekretasami) tvoří extracelulárně nerozpustné  $\beta$ -amyloidní plaky. Na ně se následně adhezují mikroglie (makrofágy CNS), které potom produkují prozánětlivé cytokiny a ROS/RNS vedoucí ke sterilnímu zánětu<sup>342</sup>. Tím dochází k destrukci tkáně a přispívá to i k produkci dalších plaků<sup>343</sup>. V důsledku zánětu také dochází k poruše HEB a jejich receptorů. Zvyšuje se například aktivita RAGEs, jež rovněž spouští zánětlivou reakci, a snižuje se aktivita LRP-1 receptorů, což zase vede ke snížení clearance amyloidu a opět zvýšené tvorbě plaků<sup>344</sup>. Třetí hlavní uznávanou teorií je **hypotéza mikrotubulární nestability**, kdy uvnitř neuronů dochází k ukládání neurofibrilárních klubek hyperfosforylovaného  $\tau$ -proteinu a ubikvitinu (NFTs).  $\tau$ -Protein se za fyziologických podmínek váže na tubulin a zpevňuje ho, ale vlivem AD a jeho hyperfosforylací je tento proces narušen a dochází k polymerizaci tubulinu na párově spirální vlákna, což vede ke smrti buňky, poruše

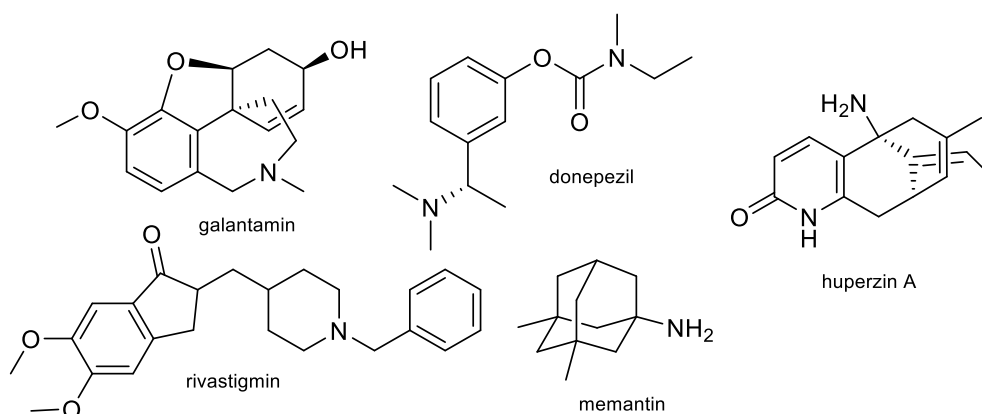
funkce axonálního transportu a další toxicitě<sup>345</sup>. Na tomto procesu se podílí další enzymy jako cyklin-dependentní kinasa 5 (CDK5) a glykogen syntasa kinasa-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ )<sup>346</sup>. Další teorií je **toxicita glutamátu**, kdy vlivem AD dochází ke zvýšenému uvolňování excitačních aminokyselin jako je glutamát a aspartát, které působí na NMDA receptory. Ty jsou zodpovědné za otevření kanálů pro vápníkové ionty. Zvýšený influx vápníkových iontů do buněk vede k patologickým procesům a dochází k apoptóze, čili k dalšímu úbytku neuronové tkáně<sup>347</sup>. Mezi další avšak okrajové teorie vzniku AD patří například **koncepce mírných kognitivních poruch**<sup>348</sup>, **teorie oxidačního stresu a nerovnováhy**<sup>349</sup>, **teorie oxidu dusnatého**<sup>350</sup>, a nověji i **infekční teorie**<sup>351</sup>. V konečném důsledku zmíněnými komplexními mechanismy dochází k úbytku mozkové tkáně, neuromediátorů a k celkové neurodegeneraci, což se projeví postupnou ztrátou kognitivních funkcí, paměti až nakonec smrtí<sup>340</sup>.

### 3.2.2 Farmakoterapie

Současná léčba je zatím hlavně symptomatická a není kauzální, čili snaží se mírnit příznaky a projevy demence a zpomalit postup onemocnění. Používají se převážně inhibitory AChE, které zvyšují hladiny acetylcholinu, jednoho z neuromediátorů zodpovědného za kognici a paměť, kterého je právě při této chorobě nedostatek<sup>352</sup>. Z přírodních léčiv se používá isochinolinový alkaloid **galantamin** (Obr. 26), původně izolovaný z *Galanthus woronowii* Losinsk. (Amaryllidaceae)<sup>14</sup>. Léčivý přípravek s tímto alkaloidem v minulosti vyráběla i česká firma Teva Pharmaceuticals CR, s.r.o., která galantamin získávala izolací z cibulí *Narcissus pseudonarcissus* L. cv. Carlton (Amaryllidaceae)<sup>353</sup>. Další používanou látkou je **rivastigmin** (Obr. 26), jejíž předlohou stukturu byl alkaloid fysostigmin z *Physostigma venenosum* Balf. (Fabaceae). Fysostigmin sám o sobě má inhibiční působení na obě cholinesterasy (AChE, BuChE), ale působí jen krátkodobě a má výrazné nežádoucí účinky<sup>354</sup>. Třetím používaným inhibitorem je **donepezil** (Obr. 26), který byl objeven při hledání derivátů takrinu. Takrin se jako duální inhibitor v minulosti při léčbě také využíval, ale byl biologicky špatně dostupný a hlavně hepatotoxický<sup>355</sup>. V pozdějším stádiu Alzheimerovy choroby (středně těžký až těžký průběh) se používá derivát adamantanu **memantin**<sup>13</sup> (Obr. 26). Memantin je antagonistou glutamátových NMDA receptorů, který tímto omezuje influx vápníkových iontů do buňky a snižuje toxicitu glutamátu<sup>347</sup>. Poslední látkou charakteru „malé molekuly“, která je oficiálně schváleným léčivem zatím jenom v Číně, je **huperzin A** (Obr. 26). Jedná se o chinolizidinový alkaloid z vrance *Huperzia serrata* (Thunb.) Trevis. (Lycopodiaceae), která je používaná v tradiční čínské medicíně jako antiflogistikum a antipyretikum. Huperzin A působí dvěma mechanismy – jako silný selektivní inhibitor AChE isoformy G1 a jako antagonist NMDA



receptorů<sup>14</sup>. Podle americké FDA je zatím klasifikován pouze jako doplněk stravy, protože stále probíhá 3. fáze jeho klinického testování<sup>15</sup>.

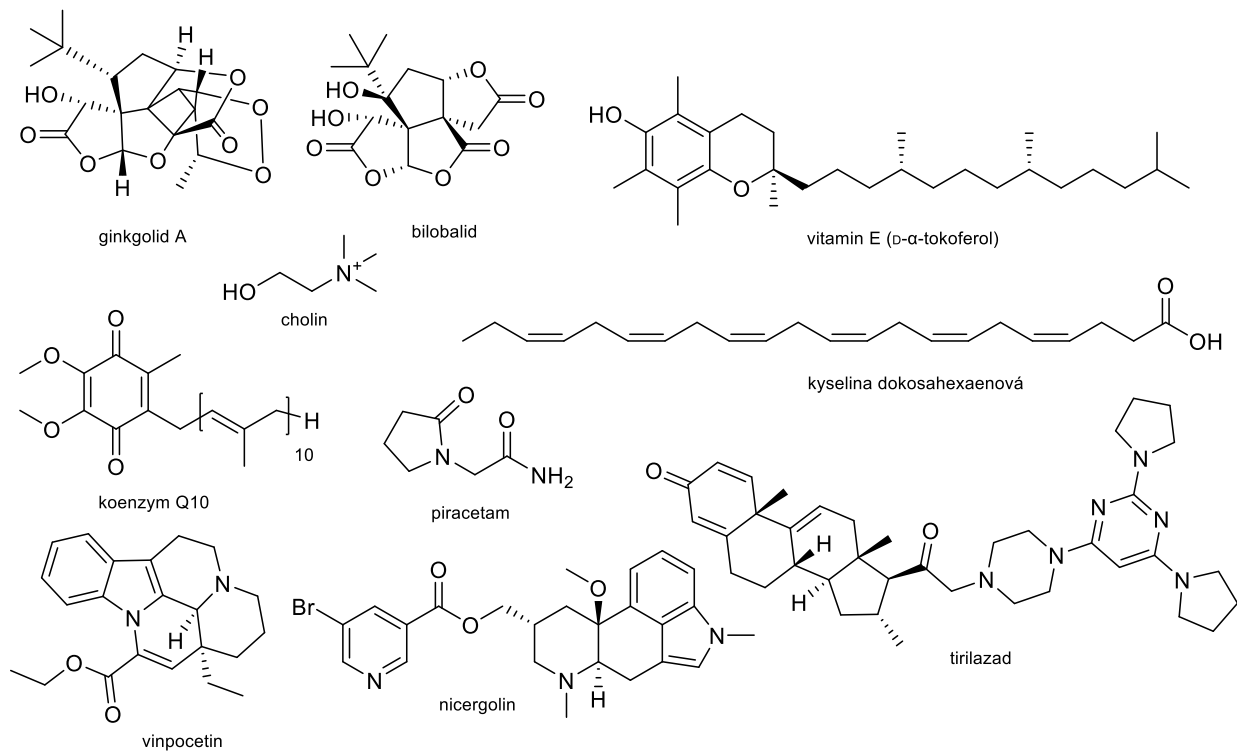


Obr. 25 Struktury používaných konvenčních léčiv při terapii AD.

Současný výzkum nových léčiv proti AD se soustřeďuje i na monoklonální protilátky. V červnu 2021 byla FDA schválena monoklonální protilátka **aducanumab** pod obchodním názvem Aduhelm<sup>TM</sup> <sup>9</sup>. Tato protilátka je schopná vázat se cíleně na plaky nerozpustného i rozpustného  $\beta$ -amyloidu a napomáhat tím k jeho odstraňování. Tímto se jedná o první registrované léčivo jež je schopno léčit kauzální příčinu nemoci<sup>10,11</sup>. V odborných kruzích však toto schválení vyvolalo značnou kontroverzi z důvodu nedostatečných důkazů, což vedlo až k rezignaci tří členů poradního výboru FDA<sup>12</sup>. Standardní léčbou zatím stále zůstává podávání léčiv, které napomáhají ke zpomalení postupu choroby a dočasně zlepšují kognitivní schopnosti.

Kromě konvenčních léčiv se při neurodegenerativních onemocněních využívá i adjuvantní léčba (Obr. 26). V této oblasti dominují především přírodní látky; jejich účinnost však postrádá doložení klinickými studiemi. Jedná se například o standardizované extrakty z listů **Ginkgo biloba L.** (Ginkgoaceae), které obsahují flavonoidy, seskviterpenový lakton bilobalid, a diterpenové ginkgolidy. Tyto látky zlepšují kognitivní schopnosti vasodilatací mozkových cév, mají antiagregační působení, a zároveň působí antioxidantně, což je při tvorbě sterilního zánětu u AD rovněž významným léčebným mechanismem. Další významné antioxidanty používající se v této souvislosti jsou **vitamin E**,  **$\omega$ -3 mastné kyseliny z rybího oleje** (kyselina dokosaheptaenová a ikosapentaenová), **koenzym Q10**, komerční potravní doplněk **Acutil®** (obsahující dokosaheptaenovou kyselinu a fosfolipid fosfatidylserin), nebo přípravky ze sóji obsahující **cholin** a **fosfatidylserin**<sup>2,340</sup>. Mezi další látky přírodního původu uplatňující se jako nootropika patří **vinpocetin**. Jeho hlavní indikací je terapie demencí spojených s poruchou prokrvení, protože má vasodilatační schopnosti a zlepšuje utilizaci glukosy a kyslíku v

neuronech<sup>26</sup>. Vinpocetin je semisyntetický hydroxyderivát přírodního indolového alkaloidu **vinikaminu**, který má podobný účinek a je v některých zemích mimo ČR rovněž registrován jako doplněk stravy k podpůrné léčbě poruch prokrvení mozku a demence<sup>27</sup>. Vasodilací cév v mozku rovněž působí nootropika **dihydroergotoxin** a **nicergolin**, jež jsou opět semisyntetickými deriváty přírodních námelových alkaloidů s monoterpénovou indolovou strukturou. Díky jejich nežádoucím účinkům se však od nich upouští<sup>356</sup>. Mezi adjuvantní kognitiva nepřírodního původu patří potom nootropikum **piracetam** (cyklický derivát  $\gamma$ -aminomáselné kyseliny), u kterého byla potvrzena i schopnost neuritogeneze *in vitro*<sup>357</sup>. Neuroprotektivní účinek byl studován i u **lazaroidů** (21-aminosteroidy, konkrétně např. tirilazad), jež jsou antioxidanty, které chrání před peroxidací fosfolipidy membrán např. po cévní mozkové příhodě<sup>358</sup>. Na druhou stranu metaanalýza přínos těchto léčiv vyvrací a upozorňuje dokonce na zhoršení nemoci<sup>359</sup>. Dalším zajímavým možným přístupem k léčbě neurodegenerativních onemocnění je podpora tvorby nových mozkových buněk. Např. pokusy *in vitro* i *in vivo* na myších prokázaly, že ***N,N*-dimethyltryptamin** (DMT), halucinogenní indolový alkaloid obsažený v rituálním nápoji ayahuasca, neurogenезi podporuje. V pokusu se schopnost učení u myší během 21 dnů pozorovatelně zvýšila<sup>360</sup>.



Obr. 26 Vybrané struktury adjuvantních léčiv používaných při terapii AD.

### 3.2.3 Vybrané enzymy patofyziologie jako cílové struktury léčiv

#### 3.2.3.1 Acetylcholinesterasa a butyrylcholinesterasa

**Acetylcholinesterasa** (AChE, EC 3.1.1.7) je serinová proteasa, která hraje klíčovou roli v cholinergní transmisi centrálního nervového systému a na neurosvalových spojích. Fyziologickou funkcí AChE je hydrolýza acetylcholinu na cholin a kyselinu octovou<sup>361</sup>. AChE je primárně exprimována nervovou tkání, nervosvalovými spoji, plasmou i krvinkami<sup>362,363</sup>. V lidském mozku se vyskytují její dva strukturně odlišné typy – monomerní G1, a mnohonásobně převažující tetramer G4. V jiných tkáních se vyskytuje i dimerní forma G2. Při AD je množství typu G1 značně zvýšené<sup>364</sup>.

Další cholinesterasou, jež je schopná štěpit acetylcholin, je **butyrylcholinesterasa** (BuChE, EC 3.1.1.8). Ačkoliv za normálních podmínek je BuChE zodpovědná pouze za 20 % štěpení, v pozdějším stádiu AD její aktivita značně stoupá, až na 90 %, a přebírá tím hlavní štěpící roli AChE<sup>365</sup>. Na perifériích amyloidních plaků je aktivita AChE zvýšená, což může naznačovat, že tyto plaky mohou množství AChE ovlivňovat. Změněná exprese AChE v mozku pacientů s AD naznačuje, že aktivita AChE se zvyšuje kolem perifériích amyloidních plaků, a že A $\beta$  mohou hladinu AChE ovlivňovat. Bylo zjištěno, že rozdílné isoformy AChE v mozku a mozkomíšni tekutině u pacientů s AD jsou změněny v souvislosti s abnormální glykosylací<sup>366</sup>. Ačkoliv je role AChE u neurodegenerativních onemocnění relativně dobře známá, role BuChE ještě stále není kompletně objasněna. Tato pseudocholinesterasa totiž v organismu postrádá přirozený substrát<sup>364</sup>. Některé studie ukázaly, že BuChE může nepřímo přispívat k patogenezi cukrovky typu 2 (T2DM) zvyšováním insulinové rezistence<sup>367</sup>. Podobnost některých patofyziologických znaků AD a T2DM (zvýšená agregace  $\beta$ -amyloidu, abnormální hladiny cholinesteras) dala vzniknout teorii, že inhibitory cholinesteras (ChEIs) by mohly být prospěšné při terapii obou nemocí. Ačkoliv ChEIs poskytují hlavně symptomatickou úlevu AD pacientům, vývoj nových ChEIs jako multifunkčních ligandů, nebo selektivních inhibitorů BuChE, zůstává předmětem zájmu v léčbě neurodegenerativních poruch. Kromě toho, zacílením na nikotinové receptory v nervosvalových spojích mohou být ChEIs využity v léčbě autoimunitního onemocnění *myasthenia gravis*, nebo jako profylaktická léčba otravy neurotoxickými organofosfáty<sup>368,369</sup>. Inhibiční selektivita látek vůči AChE nebo BuChE je předmětem k debatě, ačkoliv v jedné studii se naznačuje, že vyšší selektivita vůči AChE může vést k nižším nežádoucím účinkům<sup>370</sup>.

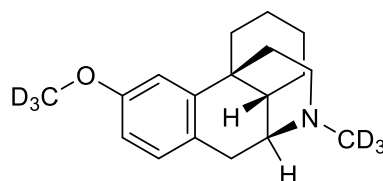
V rámci biologických *in vitro* testů na inhibici AChE hraje důležitou roli zdroj, ze kterého je enzym získán. Běžně se pro *in vitro* testy používala a stále ještě používá AChE z elektrického úhoře *Electrophorus electricus* (*eelAChE*), která ale může v porovnání s lidskou cholinesterázou (*hAChE*) dávat odlišné výsledky<sup>371,372</sup>. Často se používala pro *in vitro* a

*in silico* studie AChE z úhoře *Torpedo californica* (*TcAChE*). Navíc v roce 1991 byla u této AChE popsána první 3D struktura tohoto enzymu<sup>373</sup>. V roce 2012 se poté podařilo zachytit krystalografickou strukturu lidské AChE v komplexu s donepezilem, a zjistilo se, že vazebné místo enzymu z *T. californica* je značně odlišné. Lidská AChE tedy poskytuje mnohem přesnější model pro *in vitro* a *in silico* studie<sup>374</sup>. Příprava enzymu rekombinantní technologií je rovněž mnohem výhodnější než získávání erytrocytární AChE z lidské plazmy, neboť produkce může probíhat za lépe kontrolovatelných a standardizovaných podmínek<sup>375</sup>. Studiu BuChE nebylo v tomto ohledu věnováno tolik pozornosti, většinou je dnes jako zdroj enzymu pro *in vitro* studie využíváno koňské sérum (*eqBuChE*), nebo lidská BuChE (*hBuChE*) získávána z plazmy, a nebo rekombinantně. BuChE z různých zdrojů však opět může poskytovat odlišné výsledky *in vitro* studií<sup>376</sup>.

Rozsáhlý přehled o přírodních látkách inhibujících AChE i BuChE uvádí např. disertační práce Jakuba Chlebka<sup>377</sup>.

### 3.2.3.2 *N-Methyl-D-aspartátové receptory*

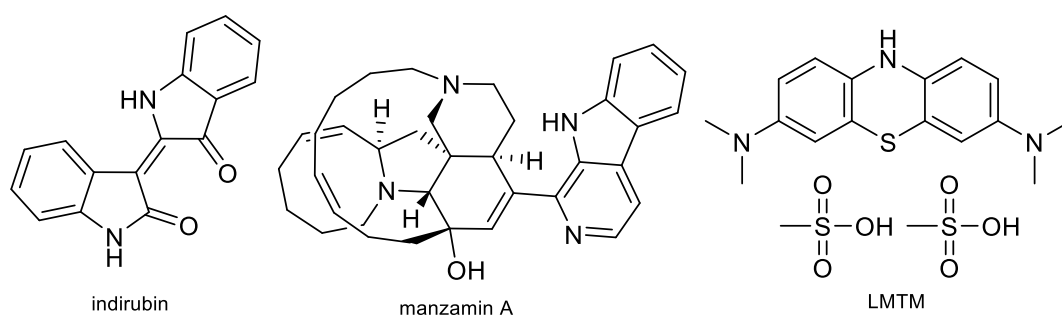
Excitační glutamátergní transmise přes *N*-methyl-D-aspartátové receptory (NMDARs) je klíčová pro synaptickou plasticitu a životnost neuronů. Glutamát je nejhojnějším transmitterem v savčí CNS, kde se nachází skoro výhradně uvnitř buněk<sup>378</sup>. Nadměrná aktivita NMDARs může způsobovat excitotoxicitu a urychlovat buněčnou smrt, což dává podklad k možnému mechanismu neurodegenerace u AD. Glutamátergní hypotéza říká, že postupný kognitivní úpadek u pacientů s AD je způsoben smrtí neuronů způsobenou nadměrnou aktivitou NMDARs a následným zvýšením intracelulárního vápníku. Několik studií ukázalo, že rozpustné A $\beta$  oligomery a  $\tau$ -protein mohou reagovat s glutamát-signalizujícími proteiny zapojenými v glutamátovém vychytávání a recyklaci, jako právě např. NMDARs, což poté vede k glutamátergní excitotoxicitě<sup>379</sup>. Není tedy divu, že některé léčebné postupy AD jsou soustředěny právě na tento mechanismus. V současnosti je v ČR jakožto antagonist NMDARs jedinou schválenou léčivou látkou memantin<sup>380</sup>, nicméně v současnosti probíhá 3. fáze klinických testů u kombinace deuterizovaného dextrometorfanu (Obr. 27) a chinidinu (AVP-786)<sup>381</sup>.



Obr. 27 Deuterizovaný dextrometorfan.

### 3.2.3.3 Glykogen syntasa kinasa-3 $\beta$

Důležitou roli ve formaci NFTs, které jsou neuropatologickou charakteristikou AD, hraje glykogen syntasa kinasa-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ , EC 2.7.11.26). Jedná se o multifunkční serin/threonin kinasu, která je klíčovou součástí mnoha signálních drah<sup>362</sup>. Hraje velmi důležitou roli při buněčných procesech, jako je regulace buněčného cyklu, diferenciaci a proliferaci. Nedávno bylo však zjištěno, že GSK-3 $\beta$  hraje velmi důležitou roli i v neurodegeneraci, a to obzvláště při AD<sup>382</sup>. Přílišná exprimace a aktivita GSK-3 $\beta$  u AD přispívá k poškození paměti, hyperfosforylaci  $\tau$ -proteinu, zvýšené tvorby  $\beta$ -amyloidu a zánětlivé odpovědi mikroglie způsobené místními plaky<sup>383</sup>. Jelikož fosforylace  $\tau$ -proteinu je primárně závislá na GSK-3 $\beta$  a cyklin-dependentní kinase 5 (CDK5, EC 2.7.11.22)<sup>346</sup>, jejich inhibice se jeví jako další slibná strategie pro boj s AD<sup>384</sup>. Řada látek s aktivitou proti GSK-3 $\beta$  byla už v minulosti dokumentována<sup>385,386</sup>. Inhibiční potenciál vykazují i některé rostlinné alkaloidy, jako např. bisindolové deriváty indirubiny z rostlin tradiční čínské medicíny *Indigofera tinctoria* L. (Fabaceae) a *Isatis tinctoria* L. (Brassicaceae)<sup>387</sup>, některé alkaloidy čeledi Amaryllidaceae<sup>388</sup>, nebo alkaloidy z mořských hub (hymenialdisin, agelastin A<sup>389</sup>, manzamin<sup>390</sup>). Jako inhibitor hyperfosforylace  $\tau$ -proteinu je v současnosti ve 3. fázi klinického testování derivát methylenové modři LMTM<sup>381</sup> (Obr. 28).

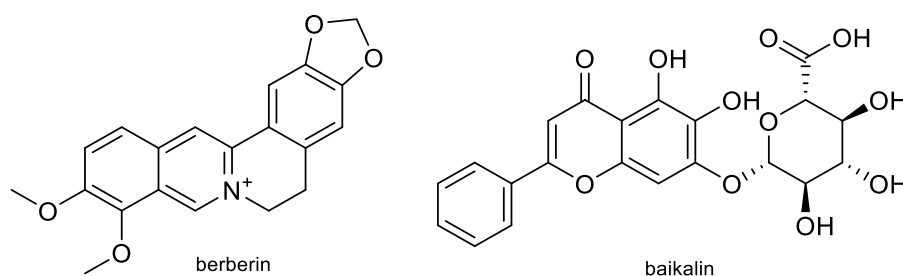


Obr. 28 Vybrané přírodní inhibitory GSK-3 $\beta$ .

### 3.2.3.4 Prolyl oligopeptidasa

V posledních letech získala prolyl oligopeptidasa (POP, EC 3.4.21.26) na významnosti jakožto cílová struktura pro léčbu schizofrenie, bipolární afektivní poruchy a kognitivních poruch, které jsou přítomny i při AD. POP je cytosolová serinová proteasa, která štěpí peptidovou vazbu na karboxylovém konci prolinu<sup>391</sup>, a je primárně exprimována v hipokampu, hypothalamu, amygdale, mozkové kůře a v oblastech bazálních ganglií<sup>392</sup>. Má regulační funkci v mnoha fyziologických procesech, neboť jejími substráty jsou hormony, neuroaktivní peptidy a různé

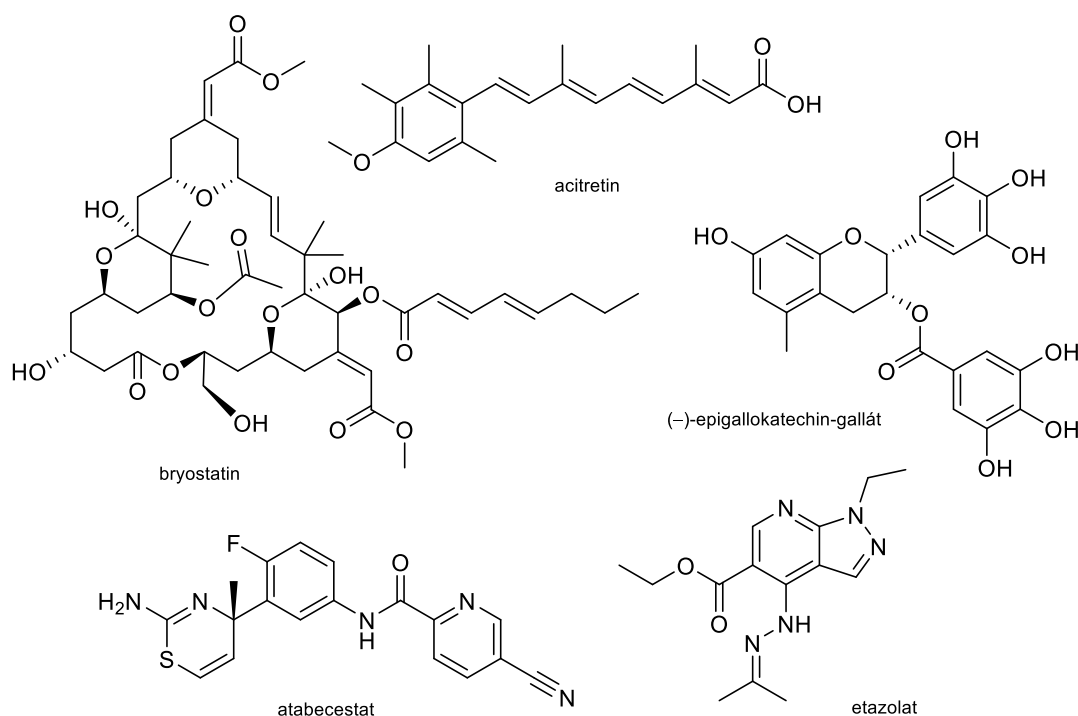
buněčné faktory<sup>393,394</sup>. Její redukováná aktivita koreluje s patologií  $\tau$ -proteinu a závažností stavu AD<sup>395</sup>. Podíl na štěpení neuropeptidů ukazuje na spojení POP s učením a pamětí. Z těchto pohledů se inhibice POP jeví jako zajímavý podpůrný cíl při léčbě AD<sup>393</sup>, což je implikováno i v několika dalších studiích<sup>396,397</sup>. Mezi nejvýznamnější přírodní inhibitory patří isochinolinový alkaloid berberin<sup>398</sup> a flavonoidní glykosid baikalin<sup>399</sup>, které se používají jako standardy při stanovení této aktivity. Aktivita byla nalezena i u alkaloidů např. z *Peumus boldus* Molina (Monimiaceae)<sup>400</sup>, *Fumaria officinalis* L. (Papaveraceae)<sup>401</sup> a některých alkaloidů rostlin čeledi Amaryllidaceae<sup>402</sup>.



Obr. 29 Vybrané přírodní inhibitory POP.

### 3.2.3.5 $\beta$ -Sekretasa 1

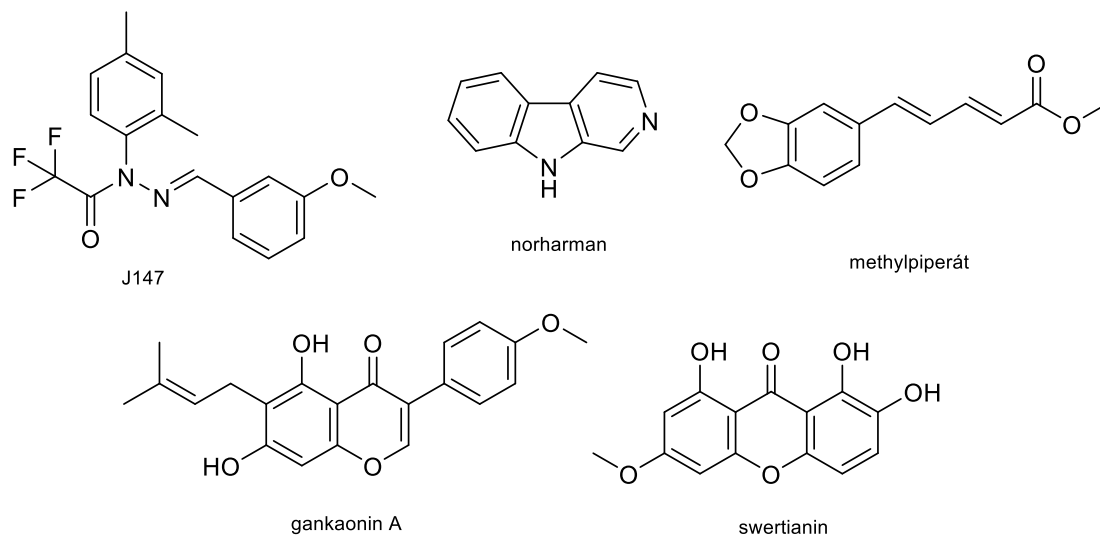
$\beta$ -Sekretasa, neboli „beta-site APP cleaving enzyme 1“ (BACE1, EC 3.4.23.46), na rozdíl od  $\alpha$ -sekretasy u zdravých jedinců, štěpí amyloidní prekurzorový protein amyloidogenní cestou, kdy vznikají nerozpustné fragmenty o 42 a více aminokyselinách ( $A\beta_{42}$ ). Ty se následně kumulují a tvoří  $\beta$ -amyloidní plaky. Její inhibitory představují další potenciální cíl léčivých struktur<sup>403</sup>. Prozatím se v klinických testech jako reverzibilní inhibitor BACE1 udržel pouze atabecestat<sup>381</sup>. Zároveň je snaha najít látky schopné podpořit funkci neamyloidogenní  $\alpha$ -sekretasy. Ve 2. fázi klinických testů se jako její stimulatory nacházejí etazolot, acitretin a (-)-epigallokatechin-gallát<sup>381</sup>, zatímco u bryostatinu (makrocyclický lakton z mořského červa *Bugula neritina*) 2. fáze už úspěšně proběhla<sup>404</sup> (Obr. 30). Do přírodních inhibitorů BACE1 patří dále např. kurkuminoidy<sup>405</sup>, furanokumariny<sup>406</sup>, deriváty stilbenu (vitisin A, B)<sup>407</sup>, katechiny ze zeleného čaje<sup>408</sup>, protoberberiny z *Coptis chinensis* Franch. (Ranunculaceae)<sup>409</sup>, nebo isochinolinové alkaloidy z *Corydalis cava* (L.) Schweigg. et Körte (Fumariaceae)<sup>403</sup>.



Obr. 30 Vybrané látky ovlivňující tvorbu  $\beta$ -amyloidních plaků.

### 3.2.3.6 Monoaminoxidasa

Je známo, že patologické procesy jako neurodegenerace a deprese souvisí s nízkými hladinami monoaminových neurotransmiterů. Aktivovaná monoaminoxidasa (MAO, EC 1.4.3.4) v mozku pacientů s AD je jejím biomarkerem a předpokládá se, že způsobuje nadměrnou produkci hydroxylových radikálů, což spouští biochemickou kaskádu vedoucí k ukládání  $A\beta$ -plaků<sup>410,411</sup>. Lidská MAO se vyskytuje ve dvou isoformách (MAO-A, MAO-B), které jsou odlišeny rozdílnými aminokyselinami, 3D strukturou, distribucí v tkáních a orgánech, inhibiční senzitivitou a substrátovou specifitou. Aktivovaná MAO-B vede ke kognitivním dysfunkcím, ničí cholinergní neurony, způsobuje rozvrat cholinergního systému a přispívá k formaci amyloidních plaků<sup>412</sup>. Inhibitory MAO mají neuroprotektivní účinky spojené s oxidačním stresem, což je žádoucí vlastností pro vývoj multi-cílových léčiv AD. V současnosti je jako inhibitor MAO-B v 1. fázi klinického testování fenyldiazidový derivát J147<sup>381</sup>. Mezi přírodní inhibitory MAO-B patří např. deriváty kumarinů<sup>413</sup>, methylpiperát, alkaloid norharman, deriváty chinolinonu, flavonoid gankaonin A, xanthon swertianin, tetrahydrokannabinol, aj.<sup>414</sup> (Obr. 31).



Obr. 31 Vybrané inhibitory MAO-B.



# 4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

## 4.1 Materiální vybavení

### 4.1.1 Chemikálie pro izolaci a určení struktury alkaloidů

- Aceton ACS čistota (VWR International, Francie) ( $\text{Me}_2\text{CO}$ )
- Acetonitril HPLC gradient (Lach-Ner, Neratovice) ( $\text{MeCN}$ )
- Amoniak 25% vodný roztok p. a. (Lach-Ner, Neratovice) ( $\text{NH}_3$ )
- Benzin lékařský RN (Ing. Petr Švec – PENTA, Praha)
- Cyklohexan p. a. (Ing. Petr Švec – PENTA, Praha) ( $\text{C}_6\text{H}_{11}$ )
- Diethylamin p. a. (Ing. Petr Švec – PENTA, Praha) ( $\text{Et}_2\text{NH}$ )
- Diethylether p. a. (Ing. Petr Švec – PENTA, Praha) ( $\text{Et}_2\text{O}$ )
- Dusičnan bismutitý zásaditý (Lachema, Brno)
- Ethanol 95% (Lihovar Chrudim, Chrudim) ( $\text{EtOH}$ )
- Ethanol absolutní ACS čistota (VWR International, Francie)
- Ethylacetát HPLC gradient (VWR International, Francie) ( $\text{EtOAc}$ )
- *n*-Hexan (Lach-Ner, Neratovice) ( $\text{C}_6\text{H}_{14}$ )
- Chloroform čistý (Ing. Švec – Penta, Praha) ( $\text{CHCl}_3$ )
- Chloroform deuterizovaný pro NMR analýzu – Chloroform-d 99,8 atom % D (Sigma-Aldrich, Praha) ( $\text{CDCl}_3$ )
- Jodid draselný čistý (Lach-Ner, Neratovice) (KI)
- Kyselina chlorovodíková 35% p. a. (Ing. Švec – Penta, Praha) (HCl)
- Kyselina mravenčí LC/MS gradient (VWR International, Francie)
- Kyselina trifluoroctová, ReagentPlus<sup>®</sup>, 99% (Sigma-Aldrich, Německo) (TFA)
- Kyselina vinná p. a. (Balex, Pardubice)
- Methanol HPLC gradient (VWR International, Francie)
- Methanol LC/MS gradient (VWR International, Francie)
- Methanol p. a. (Ing. Petr Švec – PENTA, Praha) ( $\text{MeOH}$ )
- Toluén p. a. (Ing. Petr Švec – PENTA, Praha) ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_3$ )
- Uhličitan sodný bezvodý p. a. (Ing. Švec – Penta, Praha) ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )

#### 4.1.2 Pomocný materiál pro izolaci alkaloidů a určení struktury

- Analytické TLC desky Silica gel 60 F<sub>254</sub> 20 × 20 cm (Merck, Německo)
- Běžné laboratorní sklo od lokálních dodavatelů
- Křemelina Celite C 535 John's Manville (Sigma-Aldrich, Praha)
- Neutrální oxid hlinitý (63–200 μm) (Lach-Ner, Neratovice)
- Silikagel Kieselgel 60 GF<sub>254</sub> (Merck, Německo)
- Silikagel (63–200 μm) (Fluka, USA)
- Silikagel sušící perly (Ing. Švec – Penta, Praha)

#### 4.1.3 Chemikálie a enzymy pro měření inhibice cholinesteras

- 5,5'-Dithio-bis-(2-nitrobenzoová) kyselina (Sigma-Aldrich, Praha) (DTNB) (Ellmanovo činidlo)
- Acetylthiocholin jodid (Sigma-Aldrich, Praha) (ATCh)
- Berberin (Sigma-Aldrich, Praha)
- Butyrylthiocholin jodid (Sigma-Aldrich, Praha) (BuTCh)
- Dihydrogenfosforečnan sodný dihydrát p. a. (Ing. Švec – Penta, Praha) (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O)
- Dimethylsulfoxid p. a. (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) (DMSO)
- Eserin (Sigma-Aldrich, Praha)
- Fosfátový pufr (pH = 7,4) (Sigma-Aldrich, Praha)
- Galantamin (Sigma-Aldrich, Praha)
- Hydrogenfosforečnan disodný bezvodý p. a. (Ing. Švec – Penta, Praha) (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>)
- Chlorid sodný p. a. (Lachema, Brno) (NaCl)
- Lidská rekombinantní acetylcholinesterasa (Sigma-Aldrich, Praha) (*hAChE*)
- Lidská rekombinantní butyrylcholinesterasa (Sigma-Aldrich, Praha) (*hBuChE*)

#### 4.1.4 Rostlinný materiál

Sušená nať *Vinca minor* L. (60 kg) byla zakoupena od firmy Megafyt s. r. o. (Vrané nad Vltavou, rok 2013, položka č. 15607, šarže 11062013, laboratorní protokol I0195/13, kvalita V) v drobně řezaném stavu. Botanickou verifikaci provedl prof. RNDr. Lubomír Opletal, CSc. Záložní vzorek byl uložen v herbáriu Katedry farmakognozie a farmaceutické botaniky Farmaceutické fakulty v Hradci Králové, pod kódem AL-350.

#### 4.1.5 Přístroje a software

- Spektrometr MS-EI na GC/MS systému Agilent 7890A GC 5975 inertní MSD; EI mód 70 eV; kolona HP-5 MS (30 m × 0,25 mm × 0,25 μm) (Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA)
- Spektrometr MS-ESI Waters Acquity qDa a detektor s diodovým polem Waters 2998 na HPLC systému Waters Autopurification™ (Milford, USA)
- Spektrometr HRMS-ESI, Waters Synapt G2Si s hybridním analyzátozem quadrupole-time-of-flight (Q-TOF) připojený na Waters Acquity I-Class UHPLC System (Waters Corporation, Milford, Massachusetts, USA)
- Spektrometr Varian VNMR S500 (Varian, Palo Alto, California, USA)
- Polarimetr P3000 (A. Krüss Optronic, Hamburg, Německo)
- Rotační vakuová odparka (RVO 004, INGOS, Praha)
- Rotační vakuová odparka pro poloprovodní použití (Laborota 20 Heidolph, Německo)
- Ultrazvuková lázeň Sonorex Super 10P (Bandelin, Německo)
- UV reader Synergy HT (Biotek, USA)
- GraphPad Prism v. 6.07 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA)

## 4.2 Obecné postupy

### 4.2.1 Příprava Dragendorffova činidla pro detekci alkaloidů

Zásobní roztok byl připraven smíšením roztoků *a* a *b* v poměru 1 : 1, kde roztok *a* byl složen z 1,7 g zásaditého dusičnanu bismutitého a 20 g kyseliny vinné rozpuštěné v 80 ml vody. Roztok *b* byl složen z 16 g jodidu draselného rozpuštěného v 40 ml vody. Detekční roztok pro postříkání TLC desek byl připraven smíšením 5 ml zásobního roztoku s 10 g kyseliny vinné v 50 ml vody. Toto detekční činidlo tvoří s alkaloidy intenzivní hnědo-oranžové skvrny na světle růžovém pozadí<sup>415</sup>.

### 4.2.2 Příprava litých desek pro preparativní TLC

Desky byly připraveny nalitím a rozprostřením suspenze komerčního silikagelu Kieselgel 60 GF<sub>254</sub> v destilované vodě na skleněnou podložku. Byly použity dva rozměry – na skleněné desky s rozměry 15 × 15 cm byla nalita suspenze 6,5 g silikagelu v 18,5 ml vody; na desky s rozměry 20 × 15 cm byla nalita suspenze 8,7 g silikagelu s 25 ml vody. Desky byly před použitím vysušeny volným ponecháním při laboratorní teplotě po dobu 24 h.

### 4.2.3 Preparativní TLC

Chromatografovaná alkaloidní směs byla vždy před dělením rozpuštěna ve směsi ethanolu a chloroformu (1 : 1) s koncentrací 5–8 % a v tenké čáře nanášecím perem nanesena na chromatografickou desku. TLC desky byly vyvíjeny v chromatografických komorách nasycených parami použité vyvíjecí soustavy. Vyvíjecí dráha na analytických komerčních deskách byla 9 cm, na litých připravených deskách 13,5 cm. V případě vícenásobného vyvíjení byly desky před dalším vyvíjením nejdříve v digestoři vysušeny. Detekce dělených zón byla provedena pod UV světlem ( $\lambda = 254 \text{ nm}$ ,  $\lambda = 366 \text{ nm}$ ). Alkaloidní zóny byly detekovány postříkáním krajní části desky Dragendorffovým činidlem (kap. 4.2.1). Separované zóny se stejným retenčním faktorem byly spojeny; eluce látek byla provedena prolitím směsi separovaných zón s křemelinou (1 : 1) směsí ethanolu a chloroformu (1 : 1) v chromatografické koloně za sníženého tlaku. Objem směsi elučních rozpouštědel byl tvořen přibližně 15násobkem objemu eluovaného adsorbentu. Na konci eluce byla směs prolita 5násobným objemem čistého ethanolu pro úplné vymytí všech navázaných látek.

### 4.2.4 Analytická TLC

Průběžná analytická/kontrolní TLC separovaných zón byla provedena s použitím komerčních analytických desek TLC Silica gel 60 F<sub>254</sub> 20 × 20 cm, v chromatografické komoře nasycené parami použité mobilní fáze. Desky byly stříhány na výšku 10 cm se šířkou dle potřeby. Vyvíjecí dráha byla 9 cm.

### 4.2.5 Analytická HPLC/MS-ESI

Vzorky (0,2–0,3 mg) byly rozpuštěny v 1 ml MeOH čistoty LC/MS a měřeny pomocí systému Waters Autopurification™ HPLC/MS (Milford, USA). Přístroj se skládal z modulů Waters Sample Manager 2767, System Fluidics Organizer, binární gradientové pumpy Waters 2545, Waters 2998 detektoru s diodovým polem a Waters Acquity qDa hmotnostního spektrometru. Vzorky byly analyzovány při laboratorní teplotě. Pro separaci byla použita kolona s reverzní fází XSelect® CSH™ C18 OBD™ (100 mm × 4,6 mm, 5 μm) (Milford, USA). Jako mobilní fáze byly použity voda s 0,1% kyselinou mravenčí (rozpuštědlo A) a metanol s 0,1% kyselinou mravenčí (rozpuštědlo B). Průtok mobilní fáze byl 1 ml/min. Eluční program s gradientem byl naprogramován následovně (v/v): 0 min 5 % B, 5 min 100 % B, 8,5 min 5 % B, poté 1,5 minuty v počátečních podmínkách pro ekvilibraci. Optimální hodnoty parametrů MS-ESI byly: kapilární napětí 0,8 kV; teplota próby 600 °C; kuželové napětí 15 V. HPLC/MS hmotnostní

spektra byla zaznamenána v rozmezí od 200 do 800  $m/z$ . Pro detekci byl rozsah PDA detektoru nastaven od  $\lambda = 190$  do  $\lambda = 700$  nm. HPLC/MS-ESI analýzy byly provedeny v pozitivním iontovém režimu.

#### 4.2.6 Preparativní HPLC

Množství vzorku k dispozici bylo rozpuštěno v MeOH čistoty LC/MS v koncentraci cca 10 mg/ml. Separace byla provedena na stejném systému jako analytická HPLC (kap. 4.2.4) s následujícími podmínkami přizpůsobenými pro preparační proces. Byla použita kolona s větším průměrem XSelect® CSH™ Prep C18 OBD™ (100 mm × 19 mm, 5  $\mu$ m) (Milford, USA). Jako mobilní fáze byly použity opět voda s 0,1% kyselinou mravenčí (rozpuštědlo A) a methanol s 0,1% kyselinou mravenčí (rozpuštědlo B). Průtok mobilní fáze byl 25 ml/min s nastříknutým objemem vzorku 900  $\mu$ l. Eluční program s gradientem byl pro preparační podmínky nastaven následovně (v/v): 0 min 0 % B, 8 min 26,7 % B, 9 min 0 % B.

#### 4.2.7 GC/MS-EI analýza

Vzorky pro analýzu (0,2–0,3 mg) byly rozpuštěny v 1 ml MeOH čistoty LC/MS a změřeny na plynovém chromatografu Agilent 7890A GC 5975 s kolonou HP-5. Na kolonu byl aplikován objem 1  $\mu$ l analyzovaného vzorku se splitem 1 : 10 při teplotě 280 °C. Pro analýzu byl použit následující teplotní gradient: 0 min 100 °C, 1 min 180 °C, 15 min 300 °C. Nosným plynem bylo helium s průtokovou rychlostí 0,8 ml/min. K detekci byl použit hmotnostní spektrometr s elektronovou ionizací při 70 eV. Výsledky analýz izolovaných alkaloidů byly porovnány s knihovnou spekter NIST 11 (National Institute of Standards and Technology Library, USA).

#### 4.2.8 HRMS analýza

Vzorky (0,2–0,5 mg) byly před měřením rozpuštěny v MeCN. Spektra HRMS-ESI byla získána na spektrometru Waters Synapt G2Si s ionizací elektrosprejem v kladném módu a hybridním analyzátozem kvadrupól s analyzátozem doby letu (Q-TOF) připojeným na Waters Acquity I-Class UHPLC Systém (Waters Corporation, Milford, USA). U změřených látek bylo porovnáváno teoretické a experimentální  $m/z$ .

#### 4.2.9 NMR analýza

Vzorky 5–10 mg byly rozpuštěny v CDCl<sub>3</sub> a jejich NMR spektra změřena na přístroji VNMR S500 s pracující frekvencí magnetického pole 499,87 MHz pro jádra <sup>1</sup>H, a frekvencí

125,70 MHz pro jádra  $^{13}\text{C}$ . K ozařování a detekci signálu byla použita širokopásmová dvoukanálová gradientní sonda s regulací teploty OneNMR. Hodnota chemických posunů byla měřena jako  $\delta$  ppm (pars per milion) nepřímo vztažena ke standardu TMS pomocí zbytkového signálu rozpouštědla. Pro rozpouštědlo  $\text{CDCl}_3$  jsou hodnoty chemického posunu pro atom  $^1\text{H}$   $\delta = 7,26$  ppm a pro atom  $^{13}\text{C}$   $\delta = 77,0$  ppm. Získaná data měření jsou uvedena v pořadí: chemický posun  $\delta$ , integrovaná intenzita spekter  $^1\text{H}$ , multiplicita (s: singlet, d: dublet, dd: dublet dubletu, t: triplet, q: kvartet, m: multiplet) a integrační konstanta  $J$  [Hz]. Měření probíhalo za laboratorní teploty  $25^\circ\text{C}$ .

Dvoudimenzionální (2D) NMR experimenty gCOSY, gHSQC, gHMBC a NOESY byly měřeny standardními sekvencemi dodanými firmou Varian. Parametry měření byly stanoveny podle množství vzorku, jeho čistoty a molekulové hmotnosti.

**gCOSY (gradient corelation spectroscopy):** crosspeak se objevuje mezi protony, které mají přímé spojení proton-proton přes tři vazby, 3JHH.

**gHSQC (gradient heteronuclear single quantum coherence):** jedna osa představuje  $^1\text{H}$  a druhá  $^{13}\text{C}$ . Tato spektra představují korelace mezi H a C přes jednu vazbu.

**gHMBC (gradient heteronuclear multiple bond coherence):** technika, jež pomáhá určit korelace C s H přes 3 vazby (případně i 2 nebo 4 vazby).

**NOESY (nuclear overhauser effect spectroscopy):** crosspeak se objevuje mezi protony od sebe vzdálenými do  $6 \text{ \AA}$  a jeho intenzita klesá se zvyšující se vzdáleností protonů v prostoru.

#### 4.2.10 Optická otáčivost

Optická otáčivost izolovaných alkaloidů rozpuštěných v MeOH, nebo  $\text{CHCl}_3$  byla změřena pomocí polarimetru P3000 jako specifická otáčivost podle následujícího vzorce:

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

kde:  $t$  je teplota při měření [ $^\circ\text{C}$ ];  $D$  je vlnová délka D-linie sodíkového polarizovaného světla ( $\lambda = 589,3 \text{ nm}$ );  $\alpha$  je naměřená optická otáčivost [ $^\circ$ ];  $c$  je koncentrace dané látky [g/100 ml];  $l$  je délka měřicí kyvety [dm]. Výsledek byl vypočítán jako průměr z pěti měření.

#### 4.2.11 Příprava činidel a enzymů pro měření biologických aktivit

##### 4.2.11.1 Roztoky činidel pro měření inhibiční aktivity hAChE, hBuChE

**Roztok 5 mM DTNB** byl připraven rozpuštěním naváženého množství DTNB ve 100 mM fosfátovém pufru o pH 7,4. Roztok byl čirý až mírně žlutý. Roztok byl uchováván v chladničce při  $4^\circ\text{C}$  maximálně po dobu jednoho týdne.

**Roztok 10 mM ATChI** byl připraven rozpuštěním odpovídajícího množství látky ve vodě tak, aby bylo dosaženo koncentrace 10 mM. Připravený čirý roztok byl uchováván v chladničce při 4 °C maximálně po dobu jednoho týdne.

**Roztok 10 mM BuTChI** byl připraven rozpuštěním odpovídajícího množství látky ve vodě tak, aby bylo dosaženo koncentrace 10 mM. Takto připravené čiré činidlo bylo uchováváno v chladničce při 4 °C maximálně po dobu jednoho týdne.

#### **4.2.11.2 Příprava fosfátového pufru**

Fosfátový pufr o koncentraci 100 mM s pH 7,4 byl připraven smísením 57 ml roztoku A, 243 ml roztoku B a 300 ml vody. Zásobní roztok A byl 200 mM roztokem NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1 litru roztoku obsahoval 24,0 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>). Zásobní roztok B byl 200 mM roztok Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (1 litru roztoku obsahoval 28,4 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>).

#### **4.2.11.3 Příprava enzymů**

Enzymy byly připraveny rekombinantní technologií na Katedře chemie Přírodovědecké fakulty, Univerzity Hradec Králové. Bylo použito médium obsahující enzymy, které byly v čas potřeby naředěny 100 mM 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 bylo podle potřeby rozděleno, zamraženo a uchováváno při teplotě –22 °C do doby použití.

#### **4.2.11.4 Stanovení vlastní aktivity enzymů**

Do šesti jamek mikrotitračních destiček bylo napipetováno 8,3 μl fosfátového roztoku rekombinantní cholinesterasy (*hAChE*, nebo *hBuChE*), bylo přidáno 283 μl 5 mM DTNB a 8,3 μl DMSO. Po promíchání byla směs inkubována v komoře readeru při 37 °C po dobu 5 minut, potom bylo přidáno 33,3 μl roztoku substrátu (10 mM ATCh, nebo BuTCh) a byla změřena absorbance při  $\lambda = 412$  nm vlnové délce světla v časovém rozmezí 1 minuty. Podle vzorce v kap. 4.4.1 byla stanovena aktivita a byl vypočten průměr se směrodatnou odchylkou.

### **4.3 Izolace alkaloidů z nati *Vinca minor* L.**

#### **4.3.1 Vyvíjecí soustavy pro preparativní a analytickou TLC**

- **S1:** C<sub>6</sub>H<sub>14</sub> : EtOAc : Et<sub>2</sub>NH (30 : 11 : 1)
- **S2:** C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>CH<sub>3</sub> : EtOAc : Et<sub>2</sub>NH (40 : 15 : 1)
- **S3:** C<sub>6</sub>H<sub>6</sub> : Benzin : Et<sub>2</sub>NH (40 : 10 : 2)

- **S4:** CHCl<sub>3</sub> : EtOAc : MeCN : TFA (40 : 5 : 5 : 0,1)
- **S5:** CHCl<sub>3</sub> : MeCN : TFA (40 : 10 : 0,1)
- **S6:** CHCl<sub>3</sub> : MeCN : TFA (25 : 25 : 0,1)
- **S7:** C<sub>6</sub>H<sub>11</sub> : Benzin : Et<sub>2</sub>NH (20 : 30 : 4)
- **S8:** C<sub>6</sub>H<sub>11</sub> : Et<sub>2</sub>NH (95 : 5)
- **S9:** C<sub>6</sub>H<sub>11</sub> : C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>CH<sub>3</sub> : Et<sub>2</sub>NH (65 : 30 : 5)
- **S10:** C<sub>6</sub>H<sub>11</sub> : C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>CH<sub>3</sub> : Et<sub>2</sub>NH (20 : 80 : 2)
- **S11:** C<sub>6</sub>H<sub>11</sub> : C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>CH<sub>3</sub> : Et<sub>2</sub>NH (50 : 50 : 2)
- **S12:** C<sub>6</sub>H<sub>11</sub> : EtOAc : Et<sub>2</sub>NH (70 : 30 : 1)
- **S13:** C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>CH<sub>3</sub> : Et<sub>2</sub>NH (95 : 5)
- **S14:** C<sub>6</sub>H<sub>14</sub> : C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>CH<sub>3</sub> : Et<sub>2</sub>NH (45 : 45 : 10)
- **S15:** C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>CH<sub>3</sub> : CHCl<sub>3</sub> : Et<sub>2</sub>NH (70 : 25 : 5)
- **S16:** C<sub>6</sub>H<sub>14</sub> : C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>CH<sub>3</sub> : EtOAc : Et<sub>2</sub>NH (20 : 10 : 11 : 1)
- **S17:** EtOAc : MeCN : TFA (40 : 10 : 0,1)
- **S18:** C<sub>6</sub>H<sub>11</sub> : Me<sub>2</sub>CO : Et<sub>2</sub>NH (60 : 40 : 2)
- **S19:** C<sub>6</sub>H<sub>14</sub> : C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>CH<sub>3</sub> : Et<sub>2</sub>NH (45 : 45 : 5)
- **S20:** C<sub>6</sub>H<sub>14</sub> : Et<sub>2</sub>NH (90 : 10)
- **S21:** EtOAc : MeOH : Et<sub>2</sub>NH (40 : 10 : 2)
- **S22:** MeCN : MeOH : TFA (40 : 10 : 0,1)
- **S23:** C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>CH<sub>3</sub> : EtOAc : Et<sub>2</sub>NH (30 : 20 : 4)

#### 4.3.2 Příprava přečištěného alkaloidního extraktu

Drobně řezaná suchá nať *Vinca minor* L. (60 kg) byla dále rozemleta do velikosti částic 2 mm a postupně extrahována 95% ethanolem (500 g drogy vařeno 2× s 3 l EtOH po dobu 30 minut). Spojený sumární extrakt byl odpařen na vakuové odparce. Po rozpuštění v 5% HCl byla vzniklá šedo-zelená sedlina odfiltrována. Hnědý filtrát byl alkalizován vodným roztokem 25% NH<sub>3</sub> na pH 9–9,5. Precipitát alkaloidů byl extrahován CHCl<sub>3</sub> (celkem 5× 15 l). Chloroformový alkaloidní výtěpek byl odpařen do sucha s výtěžkem 454 g tmavě hnědého, viskózního odparku. Vodná fáze nebyla dále zpracována. Tento odparek byl s 9 l CHCl<sub>3</sub> přefiltrován přes neutrální oxid hlinitý (4,5 kg; deaktivovaný 6 % vody). Takto přečištěný extrakt byl na odparce zakoncentrován na 200 g tmavě hnědého zbytku. Tento postup byl rovněž popsán v předchozích diplomových pracech z Katedry farmaceutické botaniky<sup>416-419</sup>.



### 4.3.3 Izolace alkaloidů

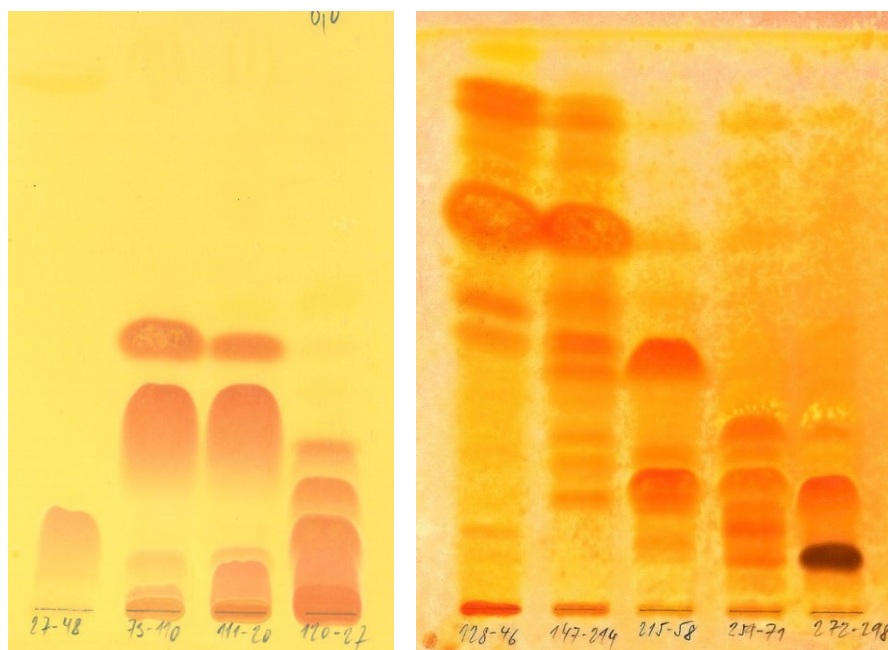
Přečištěný alkaloidní extrakt byl na velké sloupcové chromatografii (Tab. 3) rozdělen na 531 frakcí, které byly následně na základě kontrolního TLC spojeny do 19 alkaloidně bohatých frakcí (Obr. 32–34). Tab. 3 je převzata a doplněna z předchozích diplomových prací z Katedry farmaceutické botaniky<sup>416-419</sup>. Pro izolaci alkaloidů byla v rámci této práce vybrána spojená frakce č. 8, která po odpaření rozpouštědla měla největší hmotnost (27 g). Kontrolní TLC rovněž ukázalo bohatý podíl alkaloidů (Obr. 32). Vybraná frakce byla separována další sloupcovou chromatografií na 97 frakcí (Tab. 4), které na základě kontrolního TLC byly spojeny do frakcí A–H (Obr. 35). Tyto frakce byly pro izolaci čistých alkaloidních látek dále zpracovány metodami tenkovrstvé chromatografie a krystalizací.

Všechny frakce, podfrakce a izolované látky byly pro průběžné skladování vysušeny ve vakuovaném exikátoru nad perlami silikagelu po dobu min. 12 hodin, a poté uloženy v chladničce v uzavřené skleněné vialce při 2–6 °C.

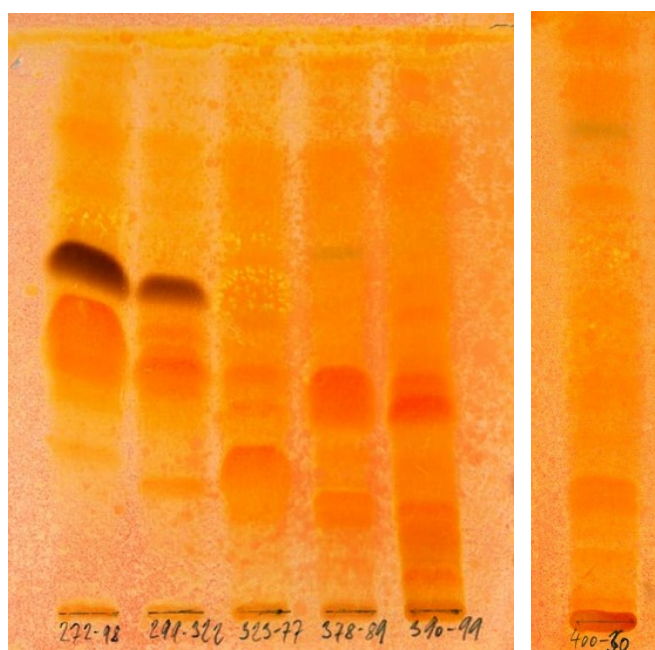
Tab. 3 Sloupcová chromatografie přečištěného alkaloidního extraktu<sup>416-419</sup>.

Množství odparku	200 g			
CHCl <sub>3</sub> na rozpuštění odparku	300 ml			
Adsorbent na roztěr	500 g			
Adsorbent	Neutrální oxid hlinitý (63–200 µm); deaktivovaný 6 % vody; 6 kg			
Dělicí vrstva ve sloupci	Ø 15 × 35 cm			
Vrstva s extraktem	Ø 15 × 2,9 cm			
Mrtvý objem	4,4 l			
Frakce	500 ml			
Doba toku 1 frakce	25 min			
Kontrolní TLC	Silica gel 60 F <sub>254</sub> (Merck); soustavy S1, S20, S22, S23; vyvíjení 1–2×; detekce pod UV λ = 254 nm a Dragendorffovo činidlo			
Spojené frakce č.	Frakce	Eluce	Odparek (g)	Popis
1	1–16	Benzin + 5 % CHCl <sub>3</sub>	0	Vyloučeno, bez alkaloidů
	17–26	Benzin + 10 % CHCl <sub>3</sub>		
2	27–48	Benzin + 10 % CHCl <sub>3</sub>	0,82	Žlutý, voskovitý
3	49–66	Benzin + 10 % CHCl <sub>3</sub>	0	Vyloučeno, bez alkaloidů
	67–72	Benzin + 12,5 % CHCl <sub>3</sub>		
4	73–90	Benzin + 12,5 % CHCl <sub>3</sub>	1,44	Hnědočervený, velmi viskózní
	91–98	Benzin + 15 % CHCl <sub>3</sub>		
	99–105	Benzin + 15 % CHCl <sub>3</sub>		

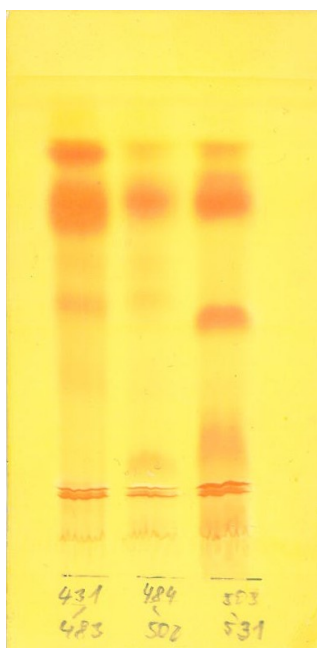
Spojené frakce č.	Frakce	Eluce	Odparek (g)	Popis
	106–110	Benzin + 20 % CHCl <sub>3</sub>		
5	111–120	Benzin + 20 % CHCl <sub>3</sub>	0,26	Žlutohnědý, velmi viskózní
6	121–127	Benzin + 25 % CHCl <sub>3</sub>	0,28	Žlutohnědý, velmi viskózní
7	128–146	Benzin + 25 % CHCl <sub>3</sub>	10,81	Řídký, světle hnědý
8	147–154	Benzin + 25 % CHCl <sub>3</sub>	27,03	Hnědý, velmi viskózní
	155–180	Benzin + 30 % CHCl <sub>3</sub>		
	181–194	Benzin + 30 % CHCl <sub>3</sub>		
	195–214	Benzin + 35 % CHCl <sub>3</sub>		
9	215–218	Benzin + 35 % CHCl <sub>3</sub>	20,75	Tmavě hnědý, pevný
	219–232	Benzin + 40 % CHCl <sub>3</sub>		
	232–246	Benzin + 40 % CHCl <sub>3</sub>		
	247–258	Benzin + 45 % CHCl <sub>3</sub>		
10	259–266	Benzin + 45 % CHCl <sub>3</sub>	1,51	Tmavě hnědý velmi řídký
	267–271	Benzin + 50 % CHCl <sub>3</sub>		
11	272–294	Benzin + 50 % CHCl <sub>3</sub>	4,82	Hnědočervený, pevný,
	295–298	Benzin + 55 % CHCl <sub>3</sub>		
12	299–318	Benzin + 55 % CHCl <sub>3</sub>	8,64	Tmavě hnědý, velmi viskózní
	319–322	Benzin + 60 % CHCl <sub>3</sub>		
13	323–338	Benzin + 60 % CHCl <sub>3</sub>	12,93	Tmavě hnědý, velmi viskózní
	339–362	Benzin + 70 % CHCl <sub>3</sub>		
	363–377	Benzin + 85 % CHCl <sub>3</sub>		
14	378–382	Benzin + 85 % CHCl <sub>3</sub>	1,74	Tmavě hnědý, pevný
	383–389	CHCl <sub>3</sub> + 2 % EtOH		
15	390–399	CHCl <sub>3</sub> + 2 % EtOH	8,79	Tmavě hnědý, pevný
16	400–406	CHCl <sub>3</sub> + 2 % EtOH	18,38	Tmavě hnědý, pevný
	407–414	CHCl <sub>3</sub> + 2 % EtOH		
	415–430	CHCl <sub>3</sub> + 4 % EtOH		
17	431–434	CHCl <sub>3</sub> + 4 % EtOH	12,79	Tmavě hnědý, pevný, snadno lze rozetřít
	435–442	CHCl <sub>3</sub> + 6 % EtOH		
	443–466	CHCl <sub>3</sub> + 8 % EtOH		
	467–483	CHCl <sub>3</sub> + 12 % EtOH		
18	484–494	CHCl <sub>3</sub> + 20 % EtOH	4,81	Tmavě hnědý, pevný, snadno lze rozetřít
19	495–507	CHCl <sub>3</sub> + 30 % EtOH	6,47	Tmavě hnědý, pevný, snadno lze rozetřít
	508–528	CHCl <sub>3</sub> + 40 % EtOH		
	529–532	EtOH		
		Celkem	142,27 g	



Obr. 32 Kontrolní TLC spojených frakcí 27–298. Soustava S1, vyvíjení 2×, detekce Dragendorffovým činidlem<sup>416,419</sup>.



Obr. 33 Kontrolní TLC spojených frakcí 272–430. Soustava S23, vyvíjení 2×, detekce Dragendorffovým činidlem<sup>471</sup>.

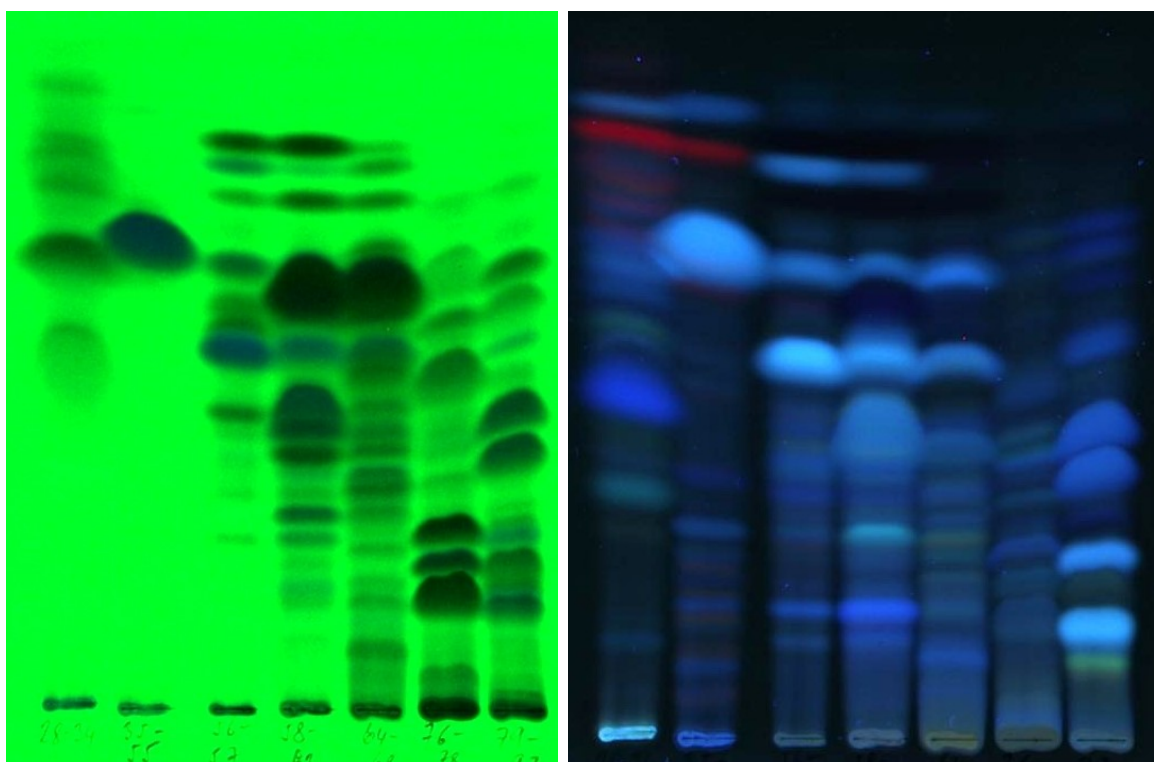


Obr. 34 Kontrolní TLC spojených frakcí 431–531. Soustava S22, vyvíjení 2×, detekce Dragendorffovým činidlem.

Tab. 4 Sloupcová chromatografie spojených frakcí č. 8.

Množství odparku	27 g				
Adsorbent na roztěr	83 g				
Adsorbent	Silikagel 63–200 $\mu\text{m}$ ; deaktivovaný 10 % vody; 1,5 kg				
Dělicí vrstva ve sloupci	$\varnothing 7 \times 63 \text{ cm}$				
Vrstva s extraktem	$\varnothing 7 \times 2,5 \text{ cm}$				
Mrtvý objem	2200 ml				
Frakce	500 ml				
Doba toku 1 frakce	35–40 min				
Kontrolní TLC	Silica gel 60 F <sub>254</sub> (Merck); soustava S1; vyvíjení 2×; detekce pod UV při $\lambda = 254 \text{ nm}$ a $\lambda = 355 \text{ nm}$				
Označení	Spojené frakce	Frakce	Eluční systém	Odparek (g)	Popis
–	1–27	1–21	$\text{CHCl}_3 + 20 \% \text{ Benzin}$	0	0
		22–27	$\text{CHCl}_3$	0	0
A	28–34	28–34	$\text{CHCl}_3$	0,59	Hnědý, krystalický
B	35–55	35–37	$\text{CHCl}_3$	11,82	Světle zeleno-hnědý, velmi viskózní, nafouklý
		38–53	$\text{CHCl}_3 + 1 \% \text{ EtOH}$		
		54–55	$\text{CHCl}_3 + 2 \% \text{ EtOH}$		
C	56–57	56–57	$\text{CHCl}_3 + 2 \% \text{ EtOH}$	1,36	Světle hnědý, řídký
D	58–63	58–63	$\text{CHCl}_3 + 2 \% \text{ EtOH}$	3,13	Světle hnědý, olejovitý
E	64–68	64–67	$\text{CHCl}_3 + 2 \% \text{ EtOH}$	1,02	

		68	CHCl <sub>3</sub> + 5 % EtOH		Světle hnědý, hrubě krystalický
F	69–75	69–75	CHCl <sub>3</sub> + 5 % EtOH	0,87	Světle hnědý, viskózní, drobně krystalický
G	76–78	76–78	CHCl <sub>3</sub> + 5 % EtOH	0,41	Světle hnědý, velmi viskózní
H	79–97	79–83	CHCl <sub>3</sub> + 5 % EtOH	2,38	Velmi viskózní, světle hnědý
		84–97	CHCl <sub>3</sub> + 10 % EtOH		
Celkem				21,58	



Obr. 35 Kontrolní TLC spojených frakcí A–H (zleva do prava). Soustava S1, vyvíjení 2×, detekce pod UV při  $\lambda = 254 \text{ nm}$  (vlevo) a  $\lambda = 355 \text{ nm}$  (vpravo)<sup>416</sup>.

Z **frakce A** (0,59 g) krystalizací z roztoku EtOH bylo vyloučeno 29,3 mg bílé práškovité látky nealkaloidní povahy. Z matečného louhu byly preparativní chromatografií dvojitým vyvinutím v soustavě S2 získány 3 alkaloidní zóny (**A1**: 85,3 mg s  $R_F$  0,83; **A2**: 25,8 mg s  $R_F$  0,70; **A3**: 12,4 mg s  $R_F$  0,55). Alkaloidní zóna **A1** po krystalizaci ze směsi CHCl<sub>3</sub> : EtOH (1 : 1) poskytla 54,4 mg bílé krystalické látky VR-1, zatímco alkaloidní zóna **A2** po krystalizaci ze stejné směsi rozpouštědel poskytla bílou krystalickou látku VR-2 (25,8 mg). Ze třetí zóny **A3** se nepodařilo identifikovat přítomnou alkaloidní látku.

**Frakce B** (11,82 g) byla rozpuštěna ve 30 ml 5% HCl za tepla (pH 1), roztok byl zředěn na 50 ml vodou, zfiltrován přes vrstvu křemeliny, ochlazen a zředěn na 200 ml. Kyselý roztok chloridů byl vytřepán 4× 50 ml Et<sub>2</sub>O, éterová frakce byla oddestilována. Takto předčištěný roztok chloridů byl alkalizován vodným roztokem 10% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> na pH 9–10, kdy se vyloučila hustá bílá sraženina. Suspenze byla vytřepána 5× 50 ml Et<sub>2</sub>O, éterová frakce byla poté opět oddestilována. Tento postup byl opakován ještě jednou. Pevný výpadek alkaloidů byl zfiltrován přes fritu, promyt destilovanou vodou a vysušen ve vakuu. Éterový extrakt z kyselého roztoku byl vyloučen. Vzniklo 5,21 g světle okrové, práškovité látky. Množství 85 mg této látky bylo rozpuštěno ve 2 ml EtOH a postupně bylo přidáno 40 ml destilované vody. Tato suspenze byla zahušťována na odparce při 40 °C. Při odpařování krystalizovala bílá látka, která byla následně odfiltrována na fritě, promyta vodou a vysušena. Bylo získáno 37,5 mg drobně krystalické látky VR-3.

**Frakce C** (1,36 g) byla rozdělena preparativní tenkovrstvou chromatografií dvojitým vyvinutím v soustavě S1 na 6 alkaloidních zón (**C1**: R<sub>F</sub> 0,90; **C2**: R<sub>F</sub> 0,80; **C3**: R<sub>F</sub> 0,72; **C4**: R<sub>F</sub> 0,65; **C5**: R<sub>F</sub> 0,55; **C6**: R<sub>F</sub> 0,45).

Zóna **C1** (172,2 mg) byla několikanásobně přečištěna na analytických TLC deskách. Nejprve vyvíjením v soustavě S3 (vyvíjení 2×) bylo získáno 147,4 mg zóny **C1-1** (R<sub>F</sub> 0,69). Přečištěním této zóny v další soustavě S4 na analytických TLC deskách bylo získáno 61,2 mg zóny **C1-1-1** (R<sub>F</sub> 0,84). K dalšímu přečištění bylo použito znova vyvinutí na analytických TLC deskách v soustavě S5. Bylo získáno 26,0 mg látky (R<sub>F</sub> 0,81), které bylo potřeba znovu přečistit na analytických TLC deskách, tentokrát v soustavě S6. Konečných čistých 12,6 mg patřilo červené amorfni látce VR-4 (R<sub>F</sub> 0,90).

Zóna **C2** (121,8 mg) byla podle kontrolního TLC spojena se zónou **G1** (viz níže) a separací na TLC analytických deskách v soustavě S3 (vyvíjení 2×) bylo po přečištění získáno 27,3 mg oranžového prášku látky VR-5 (R<sub>F</sub> 0,55).

Zóna **C3** (355,6 mg) byla preparativní TLC na litych deskách v soustavě S3 (vyvíjení 3×) rozdělena na 3 další alkaloidní zóny, z nichž jenom jedna se ukázala jako vhodná k získání čisté alkaloidní látky (**C3-1**: R<sub>F</sub> 0,54). Tato zóna (245,4 mg) byla na litych TLC deskách opět přečištěna v soustavě S7 s poskytnutím 120,0 mg hlavní zóny (**C3-1-1**: R<sub>F</sub> 0,44). Tato zóna po finálním přečištění na analytických TLC deskách v soustavě S6 poskytla 98,1 mg látky VR-6 (R<sub>F</sub> 0,67) tmavě žluté barvy a viskózní konzistence.

Zóna **C4** (130,3 mg) byla preparativní TLC na litych deskách v soustavě S8 (vyvíjení 2×) rozdělena na několik zón, z nichž celkových 69,0 mg hlavní alkaloidní zóny (R<sub>F</sub> 0,49) bylo

použito pro další přečištění na analytických TLC deskách v soustavě S5. Tímto se získalo 44,4 mg čisté bílé krystalické látky VR-7 ( $R_F$  0,87).

Zóna **C5** (230,2 mg) byla preparativní TLC na litých deskách v soustavě S5 rozdělena na dvě podzóny (**C5-1**:  $R_F$  0,79; **C5-2**:  $R_F$  0,67). Podzóna **C5-1** se skládala ze 128,2 mg čisté žluté práškovité látky VR-8. Podzóna **C5-2** (34,1 mg) byla přečištěna na analytických TLC deskách v soustavě S9 (vyvíjení 2×) se ziskem 18,8 mg světle hnědé krystalické látky VR-9 ( $R_F$  0,54).

Zóna **C6** (75,4 mg) po opakovaném přečištění na analytických TLC deskách v soustavě S8 (vyvíjení 4×) poskytla 19,7 mg žluté práškovité látky VR-10 ( $R_F$  0,40).

**Frakce D** (3,13 g) byla preparativní TLC na litých deskách v soustavě S8 (vyvíjení 2×) rozdělena na 4 hlavní alkaloidní zóny (**D1**:  $R_F$  0,58; **D2**:  $R_F$  0,47; **D3**:  $R_F$  0,40; **D4**:  $R_F$  0,33).

Zóna **D1** (545,5 mg) byla přečištěna na litých TLC deskách v soustavě S10 (vyvíjení 3×) se ziskem 450 mg podzóny **D1-1** ( $R_F$  0,41). Tato podzóna musela být dále přečištěna na litých TLC deskách v soustavě S6 se ziskem 77,3 mg jediné alkaloidní zóny **D1-1-1** ( $R_F$  0,71). Tato zóna po finálním přečištění na komerčních TLC deskách v soustavě S11 (vyvíjení 2×) poskytla 33,9 mg béžové práškovité látky VR-11 ( $R_F$  0,45).

Zóna **D2** (51,5 mg) byla několikrát přečištěna na komerčních TLC deskách v soustavě S6 se ziskem 9,8 mg bílého prášku látky totožné s VR-3 ( $R_F$  0,44) rovněž získané z frakce **B**.

Zóna **D3** (138,1 mg) byla separována na analytických TLC deskách v soustavě S12 na 3 hlavní další alkaloidní podzóny (**D3-1**:  $R_F$  0,47; **D3-2**:  $R_F$  0,37; **D3-3**:  $R_F$  0,26). Podzóna **D3-1** se skládala jenom z 26,0 mg čisté sloučeniny, která přesně odpovídala látce VR-9 z frakce **C5-2**. Podzóna **D3-2** (33,1 mg) byla přečištěna na komerčních TLC deskách v soustavě S5 se ziskem 24,4 mg bílé krystalické sloučeniny ( $R_F$  0,82) odpovídající látce VR-8 z frakce **C5-1**. Podzóna **D3-3** (15,3 mg) byla také opakovaně přečištěna na komerčních TLC deskách v soustavě S5 se ziskem 8,2 mg žlutého prášku ( $R_F$  0,67) odpovídající látce VR-10 z frakce **C6**.

Zóna **D4** (625,5 mg) obsahovala bílou krystalickou látku VR-12 (499,4 mg), která byla získána krystalizací ze směsi  $\text{CHCl}_3$  :  $\text{Et}_2\text{O}$  (1 : 2).

**Frakce E** (1,02 g) byla preparativní TLC na litých deskách dvojitým vyvinutím v soustavě S1 rozdělena na 3 alkaloidní zóny (**E1**:  $R_F$  0,50; **E2**:  $R_F$  0,36; **E3**:  $R_F$  0,22), které byly dále zpracovány.

Zóna **E1** (180,0 mg) byla několikrát přečištěna na analytických TLC deskách v soustavě S3 (vyvíjení 3×) se ziskem 36,8 mg ( $R_F$  0,44) světle hnědého prášku látky VR-13.

Zóna **E2** (219,8 mg) byla na základě kontrolního TLC spojena se zónou **G3** (viz níže). Tyto spojené zóny (dohromady 241,6 mg) byly nejdříve přečištěny na litých TLC deskách v soustavě S3 se vznikem několika dalších zón, z kterých pro další zpracování byla vybrána hlavní alkaloidní zóna **E2-1** ( $R_F$  0,28). Tato zóna (52,3 mg) byla dále přečištěna na analytických TLC deskách v soustavě S13 s poskytnutím 11,7 mg hlavní alkaloidní látky ( $R_F$  0,67). Tuto látku bylo potřeba dále přecistit. Vzhledem k malému množství bylo použito semi-preparativní HPLC. Tímto konečným přečištěním bylo získáno 10,0 mg bezbarvých krystalů látky VR-14.

Zóna **E3** (76,2 mg) byla podle kontrolního TLC spojena se zónou **H3-1-1** (viz níže). Tyto zóny (dohromady 208,4 mg) byly dále děleny na litých TLC deskách v soustavě S5 (vyvíjení 5×) se ziskem dvou alkaloidních zón (**E3-1**:  $R_F$  0,56; **E3-2**:  $R_F$  0,47). Zóna **E3-1** (62,8 mg) byla potom opakovaně přečištěna na analytických TLC deskách v soustavě S14 (vyvíjení 2×) se ziskem 8,9 mg oranžového prášku látky VR-15 ( $R_F$  0,33). Ze zóny **E3-2** (145,3 mg), která byla několikrát přečištěna na analytických TLC deskách v soustavě S15 (vyvíjení 2×), bylo získáno 27,4 mg nažloutlé drobně krystalické látky VR-16 ( $R_F$  0,55).

**Frakce F** (0,87 g) byla zahřáta na vodní lázni, bylo do ní přidáno 0,5 ml 96% EtOH, a byla ponechána v chladničce krystalizovat. Krystalky byly odsáty, promyty EtOH a vysušeny. Matečný loup této frakce byl chromatografován v soustavě S1 (vyvíjení 2×). Byly separovány čtyři zóny (**F1**:  $R_F$  0,34; **F2**:  $R_F$  0,34; **F3**:  $R_F$  0,31; **F4**:  $R_F$  0,22). Zóny **F1**, **F2** a **F3** odpovídaly kontrolnímu TLC směsi vyloučených krystalů. Směs krystalů byla chromatografována stejným způsobem jako matečný loup a látky se stejným  $R_F$  byly spojeny. Dalším zpracováním TLC se však nepodařilo získat čisté alkaloidy v dostatečném množství k určení struktury.

Zóna **F4** byla přečištěna další preparativní chromatografií za stejných podmínek a opakovanou krystalizací z EtOH bylo získáno 26,5 mg bílé drobně krystalické látky VR-17.

**Frakce G** (0,41 g) byla preparativně chromatografována na preparativních TLC deskách v soustavě S1 s poskytnutím 3 hlavních alkaloidních zón (**G1**:  $R_F$  0,81; **G2**:  $R_F$  0,55; **G3**:  $R_F$  0,31).

Zóna **G1** (17,8 mg) byla podle kontrolního TLC spojena se zónou **C2** (viz výše).

Zóna **G2** (105,2 mg) byla opakovaně přečištěna na analytických TLC deskách v soustavě S2 se ziskem 40,3 mg bílé krystalické látky ( $R_F$  0,80) totožné s VR-7, rovněž získané z frakce **C4**.

Zóna **G3** (21,8 mg) byla podle kontrolního TLC spojena se zónou **E1** (viz výše).



**Frakce H** (2,38 g) byla separována TLC na litých deskách za trojnásobného vyvinutí v soustavě S16. Bylo vybráno 5 hlavních alkaloidních zón (**H1**:  $R_F$  0,70; **H2**:  $R_F$  0,60; **H3**:  $R_F$  0,51; **H4**:  $R_F$  0,42; **H5**:  $R_F$  0,12), které byly jako podfrakce dále přečištěny na TLC.

Podfrakce **H1** (182,2 mg) byla na analytických TLC deskách 2× vyvinuta v soustavě S8. K dalšímu zpracování byly vybrány dvě alkaloidní zóny (**H1-1**:  $R_F$  0,64 a **H1-2**:  $R_F$  0,33). Ze zóny **H1-1** (46,2 mg) spojené se zónou **H2-1** (viz níže) bylo po trojnásobném vyvinutí na analytických deskách v soustavě S17 získáno 37,1 mg hnědé velice viskózní látky VR-18 ( $R_F$  0,65). Zóna **H1-2** (48,3 mg) byla několikrát přečištěna v soustavě S1 na analytických TLC deskách (vyvíjení 2×) se ziskem 27,5 mg tmavě červené amorfni látky VR-19 ( $R_F$  0,66).

Podfrakce **H2** (623,9 mg) byla na litých TLC deskách v soustavě S8 (vyvíjení 3×) rozdělena na čtyři další alkaloidní zóny, z nichž pro další přečištění byly vybrány dvě (**H2-1**:  $R_F$  0,62; **H2-2**:  $R_F$  0,51). Zóna **H2-1** (9,2 mg) byla spojena s předchozí zónou **H1-1**, zatímco zóna **H2-2** (265,7 mg) byla nejdříve přečištěna v soustavě S3 (vyvíjení 3×) na litých TLC deskách, z čehož první zóna ( $R_F$  0,45; 177,6 mg) po dalším přečištění na analytických TLC deskách v soustavě S3 (vyvíjení 3×) poskytla 65,6 mg nažloutlé práškovité látky VR-20 ( $R_F$  0,50).

Podfrakce **H3** (358,2 mg) byla na litých TLC deskách v soustavě S18 po jednom vyvinutí rozdělena na několik zón, kde k dalšímu zpracování byla vybrána největší zóna **H3-1** ( $R_F$  0,33; 179,5 mg). Tato zóna byla dále separována na analytických TLC deskách v soustavě S19 (vyvíjení 3×). Nejvýraznější zóna **H3-1-1** ( $R_F$  0,51; 132,2 mg) byla spojena se zónou **E3** (viz výše).

Podfrakce **H4** (241,3 mg) byla na analytických TLC deskách rozdělena v soustavě S20 (vyvíjení 3×) na dvě alkaloidní zóny (**H4-1**:  $R_F$  0,59; **H4-2**:  $R_F$  0,41). Přečištěním zóny **H4-1** ve stejné soustavě bylo získáno 89,3 mg načervenalého prášku látky VR-21. Zóna **H4-2** (19,5 mg) po opakovaném přečištění na analytických TLC deskách v soustavě S5 poskytla 3,8 mg nažloutlé práškovité látky VR-22 ( $R_F$  0,32).

Podfrakce **H5** (62,9 mg) byla několikrát přečištěna na analytických TLC deskách v soustavě S21 se ziskem 12,4 mg tmavě žluté práškovité látky VR-23 ( $R_F$  0,45).

#### 4.3.5. Určení struktury alkaloidů

Izolované látky byly po zhodnocení čistoty na analytickém TLC, GC/MS-EI, a HPLC/MS-ESI podrobeny NMR analýze. Na základě porovnání molekulární hmotnosti, fragmentačních spekter, optické otáčivosti a signálů z NMR s literaturou byla určena struktura. V případě látek s novou strukturou nebo nedostatečnými NMR spektry v literatuře, byla tato data doplněna a bylo změřeno HRMS.

## 4.4 Biologická aktivita izolovaných alkaloidů

### 4.4.1 Stanovení inhibiční aktivity vůči cholinesterasám

Ke stanovení inhibiční aktivity izolovaných alkaloidů vůči rekombinantní *hAChE* (EC 3.1.1.7) a rekombinantní *hBuChE* (EC 3.1.1.8) izolovaných alkaloidů byla použita modifikovaná Ellmanova metoda<sup>402</sup>. Všechny činidla a enzymy byly připraveny podle kapitoly 4.2.10. Měření bylo provedeno na 96-jamkových mikrodestičkách z polystyrenu (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA). Médium bylo složeno z 10  $\mu\text{l}$  roztoku cholinesterasy o potřebné aktivitě (změřené dle kap. 4.2.11.4), 20  $\mu\text{l}$  DTNB (0,01 M) a 40  $\mu\text{l}$  fosfátového pufru (0,1 M). Roztoky testovaných alkaloidů (10  $\mu\text{l}$  v několika koncentracích potřebných k sestrojení inhibiční křivky pro  $\text{IC}_{50}$ ) byly 5 min v testovacím médiu preinkubovány a poté bylo přidáno 20  $\mu\text{l}$  substrátu (0,01 M ATCh, nebo BuTCH), které zahájilo reakci. Měření probíhalo 1 min při vlnové délce světla  $\lambda = 412 \text{ nm}$  na přístroji Multimode microplate reader Synergy 2 (BioTek Inc., Winooski, VT, USA). Pro výpočet naměřené aktivity byl použit následující vzorec:

$$I = \left(1 - \frac{\Delta A_i}{\Delta A_0}\right) \cdot 100,$$

kde  $\Delta A_i$  vyjadřuje změnu absorbance přímo úměrné inhibici enzymu a  $\Delta A_0$  znázorňuje změnu absorbance slepého vzorku, kdy místo roztoku inhibitor byl přidán stejný objem fosfátového pufru. Čím větší je inhibice enzymu, tím menší je nárůst absorbance. Inhibiční aktivita testovaných látek byla vyjádřena jako  $\text{IC}_{50}$  a porovnána s referenčními standardy známých inhibitorů (galantamin, eserin, berberin – Tab. 5). K výpočtům byl použit program GraphPad Prism v. 6.07 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

### 4.4.2 Stanovení inhibiční aktivity vůči prolyl oligopeptidase

Alkaloidy, jež byly izolované v dostatečném množství, byly podrobeny studiu inhibičního potenciálu vůči enzymu POP (EC 3.4.21.26) ve spolupráci s Katedrou toxikologie a vojenské farmacie Fakulty vojenského zdravotnictví Univerzity Obrany. Spektrofotometricky stanovená inhibiční aktivita testovaných alkaloidů byla vyjádřena jako  $\text{IC}_{50}$ ; pozitivním standardem byl berberin. Detailní postup je možno nalézt v doplňkovém materiálu publikace spojené s touto prací<sup>420</sup>.

### 4.4.3 Stanovení inhibiční aktivity vůči glykogen syntase kinase-3 $\beta$

Studium inhibiční aktivity izolovaných alkaloidů vůči enzymu GSK-3 $\beta$  (EC 2.7.11.26) bylo provedeno ve spolupráci s katedrou Life Quality Studies na Boloňské univerzitě v Itálii. Stanovení inhibiční aktivity bylo provedeno podle luminiscenční metody<sup>421</sup> za použití

Kinase-Glo kitu (Promega Biotech Iberica, S.L., Španělsko). Inhibiční aktivita testovaných látek vyjádřená jako procento inhibice enzymu při dané koncentraci byla porovnána s maximální inhibiční aktivitou referenčního standardu SB-415286 a maximální aktivitou enzymu bez žádného inhibitoru. Detailní postup měření lze nalézt v doplňkovém materiálu publikace spojené s touto prací<sup>420</sup>, nebo v jiné publikaci výzkumné skupiny ADINACO zaměřené na Amaryllidaceae alkaloidy<sup>388</sup>.

#### 4.4.4 Stanovení cytotoxicity na panelu nádorových buněk

Stanovení cytotoxicity izolovaných alkaloidů bylo provedeno ve spolupráci s Ústavem lékařské biochemie na Lékařské fakultě Univerzity Karlovy v Hradci Králové. Metoda byla provedena podle dříve publikované metody WTS-1<sup>422,423</sup> na devíti vybraných lidských nádorových buněčných liniích a jedné nenádorové. Jedná se o kolorimetrickou metodu, která využívá tetrazoliové soli 4-[3-(4-jodofenyl)-2-(4-nitrofenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzen disulfonátu, jež je v průběhu reakce redukován na fialový formazan mitochondriálními dehydrogenasami živých buněk. Tato metoda je velice podobná rozšířené metodě MTT, má však výhody citlivějšího a rychlejšího stanovení<sup>424</sup>. Buněčná viabilita jako procento růstu byla spočítána v porovnání s negativní kontrolou (100 %), kdy k buňkám namísto roztoku alkaloidů byl přidán pouze DMSO (do finální koncentrace 0,1 %). Pro pozitivní kontrolu byl použit cytotoxický doxorubicin. Byl spočítán průměr ze tří nezávislých měření se směrodatnou odchylkou.

#### 4.4.5 Výpočet logBB

Na základě molekulární struktury byla u látek vypočtena hodnota logBB, což je logaritmická hodnota poměru koncentrace látky v mozku ku koncentraci látky v krvi. Výpočet byl proveden zadáním molekulární vzorce ve formátu SMILES do webové aplikace dostupné na <http://www.way2drug.com/geb>.

#### 4.4.6 PAMPA

PAMPA, neboli “parallel artificial membrane permeability assay“, je *in vitro* metoda pro predikci průchodu potenciálního léčiva přes hematoencefalickou bariéru (HEB), kdy k simulaci této membrány se používá polární lipid z prasečího mozku<sup>425</sup>. Stanovení bylo provedeno ve spolupráci s Biomedicínským výzkumným centrem fakultní nemocnice v Hradci Králové. Pro negativní kontrolu byla vybrána známá léčiva, jež nepřestupují přes HEB (furosemid, chlorothiazid, cefuroxim). Pozitivní kontrolou byla léčiva, jež jsou svojí přestupností do CNS

známa (donepezil, rivastigmin, takrin). Detailní postup lze nalézt v doplňkovém materiálu publikace spojené s touto prací<sup>420</sup>.

#### **4.4.7 Stanovení farmakokinetických parametrů**

Kinetická studie pro inhibici *h*BuChE byla provedena již zmíněnou modifikovanou metodou podle Ellmana (kap. 4.4.1) s tím rozdílem, že byly použity čtyři rozdílné koncentrace substrátu. Stanovení proběhlo ve spolupráci s Biomedicínským výzkumným centrem fakultní nemocnice v Hradci Králové. Z rychlostních křivek substrátu měřených při různých koncentracích měřené látky byl určen typ enzymatické inhibice a afinitní parametr  $K_i$ . Více detailů k postupu lze nalézt v publikovaném článku souvisejícím s touto prací<sup>420</sup>, nebo v článku skupiny ADINACO zabývající se alkaloidy z *Berberis vulgaris* L. (Berberidaceae)<sup>426</sup>.

#### **4.5 Dockingová studie nejaktivnější látky vůči butyrylcholinesterase**

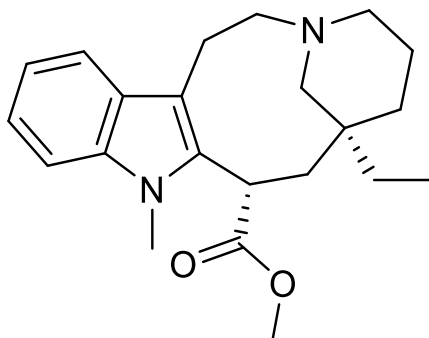
Dockingová studie byla provedena ve spolupráci s Katedrou toxikologie a vojenské farmacie, Fakulty Vojenského Zdravotnictví Univerzity Obrany. Předlohová X-ray struktura proteinu *h*BuChE byla získána z databáze [www.rcsb.org](http://www.rcsb.org) s ID: 4BDS<sup>427</sup>. Nadockovaná pozice s nevyšším skóre byla dále ověřena a vylepšena 10 ns molekulární dynamickou simulací. Výsledná vazebná pozice testované látky byla porovnána se známým inhibitorem *h*BuChE takrinem<sup>428</sup> z originálního X-ray obrazu proteinu a 3D vizualizována. Detailní postup dockingové studie je k nalezení v publikovaném článku souvisejícím s touto prací<sup>420</sup>.

## 5 VÝSLEDKY

### 5.1 Izolované alkaloidy a jejich strukturní analýza

#### 5.1.1 VR-1: (+)-Vinkaminorin

Látka na základě shody s experimentálními daty byla určena jako (+)-vinkaminorin<sup>163,429</sup>.



#### Sumární vzorec

$C_{22}H_{30}N_2O_2$

#### Molekulová hmotnost

354,49

#### MS-EI analýza

$[M+H]^+$   $m/z$  (%) = 355(4), 354(15), 230(16), 229(100), 228(8), 210(5), 184(4), 177(3), 170(5), 169(3), 168(5), 167(3), 144(3), 126(8), 124(10), 110(6), 96(3), 55(4), 44(4), 42(6), 41(3)

#### NMR analýza

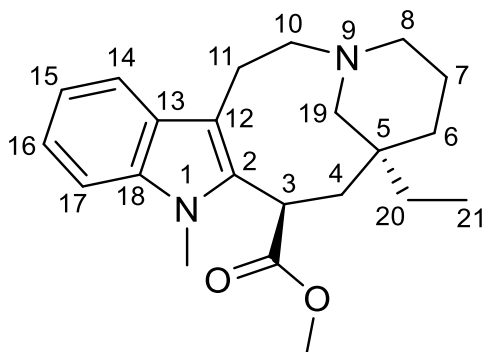
Spektra  $^1H$  i  $^{13}C$  byla v naprosté shodě s referenční literaturou<sup>163,429</sup>.

#### Optická otáčivost

$[\alpha]_D^{25} = +46,6^\circ$  ( $c = 0,10$  g/100 ml;  $CHCl_3$ )

### 5.1.2 VR-2: (+)-Vinkaminorein

Látka na základě shody s experimentálními daty byla určena jako (+)-vinkaminorein, ačkoliv v literatuře<sup>163</sup> byly odhaleny drobné nepřesnosti. Jejich detailní popis je dostupný v publikovaném článku souvisejícím s touto disertační prací<sup>420</sup> a v disertační práci dr. Jany Maříkové<sup>50</sup>.



#### Sumární vzorec

$C_{22}H_{30}N_2O_2$

#### Molekulární hmotnost

354,49

#### MS-EI analýza

$[M+H]^+$   $m/z$  (%) = 355(9), 354(35), 230(17), 229(100), 228(7), 211(9), 210(56), 184(11), 177(8), 170(13), 169(6), 168(11), 167(6), 158(9), 157(7), 154(5), 144(8), 138(12), 126(9), 125(10), 124(38), 123(7), 122(6), 110(19), 96(10), 57(6), 55(6), 44(5), 42(13), 41(7)

#### HRMS analýza (Q-TOF/ESI)

teoretická  $m/z$   $C_{22}H_{31}N_2O_3^+$   $[M+H]^+$  = 355,2380

experimentální  $m/z$   $C_{22}H_{31}N_2O_3^+$   $[M+H]^+$  = 355,2390

#### NMR analýza:

$^1H$  NMR (500 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 7,50 (1H, d,  $J = 7,8$  Hz, H14), 7,26 (1H, d,  $J = 7,8$  Hz, H17), 7,18 (1H, t,  $J = 7,8$  Hz, H15), 7,09 (1H, t,  $J = 7,8$  Hz, H16), 3,90 (1H, dd,  $J = 4,8$  Hz,  $J = 2,8$  Hz, H3), 3,71 (3H, s, 3-COOCH<sub>3</sub>), 3,54 (3H, s, N1-CH<sub>3</sub>), 3,16 (1H, d,  $J = 12,5$  Hz, H19), 3,00–2,89 (2H, m, H11), 2,55–2,50 (1H, m, H10), 2,46 (1H, dd,  $J = 13,7$ ,  $J = 2,8$  Hz), 2,38–2,32 (1H, m, H8), 2,32–2,20 (2H, m, H8, H10), 1,97 (1H, d,  $J = 13,7$  Hz), 1,61 (1H, d,  $J = 12,5$  Hz, H19), 1,54–1,44 (1H, m, H7), 1,43–1,36 (1H, m, H6), 1,35–1,24 (2H, m, H7, H20), 1,24–1,12 (2H, m, H6, H20), 0,95 (3H, t,  $J = 7,5$  Hz, H21)

$^{13}C$  NMR (125,7 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 175,2 (C=O), 139,3 (C2), 136,8 (C18), 127,1 (C13), 120,6 (C16), 118,5 (C15), 118,0 (C14), 110,0 (C12), 108,6 (C17), 57,9 (C19), 55,3 (C8), 53,3 (C10),

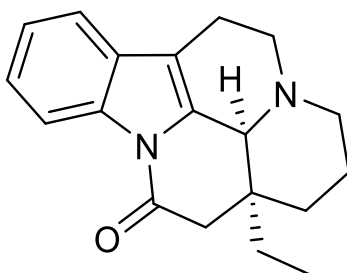
52,5 (3-COOCH<sub>3</sub>), 38,1 (C5, C3), 34,2 (C6), 33,9 (C4), 31,0 (C20), 30,2 (N1-CH<sub>3</sub>), 22,5 (C7),  
22,3 (C11), 7,4 (C21)

**Optická otáčivost**

$[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +27,6^{\circ}$  ( $c = 0,10$  g/100 ml; CHCl<sub>3</sub>)

### 5.1.3 VR-3: (-)-Eburnamonin

Na základě shody experimentálních dat s literaturou byla látka VR-3 určena jako (-)-eburnamonin<sup>174,430</sup>. Látka byla v minulosti též označována jako vinkamon<sup>431</sup>.



#### Sumární vzorec

C<sub>19</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub>O

#### Molekulární hmotnost

294,40

#### MS-EI analýza

[M+H]<sup>+</sup> *m/z* (%) = 295(20), 294(100), 293(85), 266(8), 265(28), 264(6), 263(6), 238(8), 237(33), 236(6), 235(4), 225(5), 224(23), 223(4), 222(8), 209(4), 208(3), 196(4), 194(4), 193(3), 181(5), 180(14), 169(5), 168(13), 167(17), 154(3), 147(4), 115(4)

#### NMR analýza

Spektra <sup>1</sup>H i <sup>13</sup>C byla v naprosté shodě s referenční literaturou<sup>174,430</sup>.

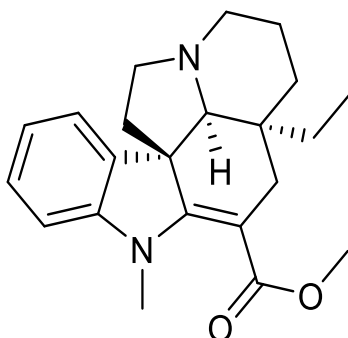
#### Optická otáčivost

[α]<sub>D</sub><sup>26</sup> = -72,1° (*c* = 0,11 g/100 ml; CHCl<sub>3</sub>)

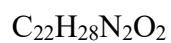


#### 5.1.4 VR-4: (-)-Minovin

Na základě shody experimentálních dat s literaturou byla látka VR-4 určena jako (-)-minovin<sup>163,429</sup>.



#### Sumární vzorec



#### Molekulární hmotnost

352,48

#### MS-EI analýza

$[\text{M}+\text{H}]^+ m/z$  (%) = 353(6), 352(24), 267(3), 252(3), 168(6), 167(5), 125(9), 124(100)

#### NMR analýza

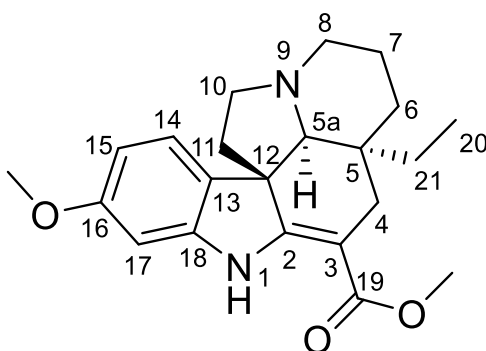
Spektra  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  byla v naprosté shodě s referenční literaturou<sup>163,429</sup>.

#### Optická otáčivost

$[\alpha]_{\text{D}}^{28} = -11,1^\circ$  ( $c = 0,11$  g/100 ml;  $\text{CHCl}_3$ )

### 5.1.5 VR-5: (-)-16-Methoxyminovin

Na základě porovnání analytických dat s literaturou látka VR-5 odpovídala struktuře *N*-methylerviceinu<sup>432,433</sup>, avšak vzhledem k podobnosti našich experimentálních dat s VR-4 se název (-)-16-methoxyminovin, jakožto methoxy-derivát minovinu, zdá mnohem vhodnější. Problematika je podrobněji popsána v publikovaném článku souvisejícím s touto prací<sup>420</sup> a v disertační práci dr. Jany Maříkové<sup>50</sup>.



#### Sumární vzorec

$C_{23}H_{30}N_2O_3$

#### Molekulární hmotnost

382,50

#### MS-EI analýza

$[M+H]^+$   $m/z$  (%) = 383(5), 382(20), 198(3), 125(9), 124(100)

#### HRMS analýza (Q-TOF/ESI)

teoretická  $m/z$   $C_{23}H_{31}N_2O_3 + [M+H]^+ = 383,2329$

experimentální  $m/z$   $C_{23}H_{31}N_2O_3 + [M+H]^+ = 383,2336$

#### NMR analýza

**<sup>1</sup>H NMR** (500 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 7,10 (1H, d,  $J = 8,1$  Hz, H14), 6,44 (1H, dd,  $J = 8,1$  Hz,  $J = 2,2$  Hz, H15), 6,40 (1H, d,  $J = 2,2$  Hz, H17), 3,82 (3H, s, 16-OCH<sub>3</sub>), 3,75 (3H, s, 19-OCH<sub>3</sub>), 3,23 (3H, s, N1-CH<sub>3</sub>), 3,15–3,08 (1H, m, H8), 2,93 (1H, dd,  $J = 8,4$  Hz,  $J = 6,1$  Hz, H10), 2,89 (1H, d,  $J = 16,3$  Hz, H4), 2,62–2,56 (1H, m, H10), 2,48–2,38 (2H, m, překryv, H8, H4), 2,47 (1H, s, překryv, H5a), 1,99 (1H, td,  $J = 11,2$  Hz,  $J = 6,5$  Hz, H11), 1,90–1,77 (2H, m, H7, H6), 1,63 (1H, dd,  $J = 11,4$  Hz,  $J = 4,6$  Hz, H11), 1,56–1,49 (1H, m, H7), 1,29–1,15 (1H, m, H6), 0,94–0,86 (1H, m, H21), 0,70–0,56 (1H, m, H21), 0,66 (3H, t, překryv,  $J = 6,7$  Hz, H20)

**<sup>13</sup>C NMR** (125,7 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 168,1 (C19), 167,4 (C2), 160,0 (C16), 148,2 (C18), 131,3 (C13), 120,9 (C14), 104,8 (C15), 96,3 (C17), 93,1 (C3), 75,3 (C5a), 56,0 (C12), 55,5

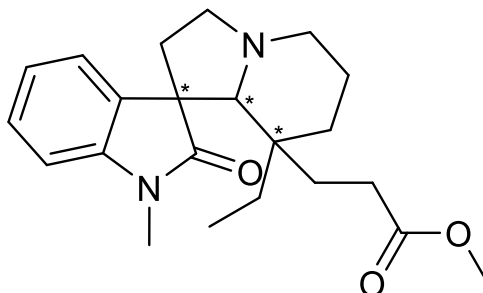
(16-OCH<sub>3</sub>), 51,8 (C10), 50,9 (19-OCH<sub>3</sub>), 50,4 (C8), 47,1 (C11), 37,5 (C5), 36,0 (N1-CH<sub>3</sub>), 32,5 (C6), 30,1 (C4), 29,3 (C21), 22,0 (C7), 7,1 (C20)

**Optická otáčivost**

$[\alpha]_{\text{D}}^{26} = -21,2^{\circ}$  ( $c = 0,17$  g/100 ml; CHCl<sub>3</sub>)

### 5.1.6 VR-6: Vinkatin (směs diastereomerů 2 : 3)

Na základě shody experimentálních dat s literaturou byla látka VR-6 určena jako vinkatin<sup>215,434,435</sup>, nicméně NMR analýza odhalila, že se jedná o diastereoizomerní směs v poměru cca 2 : 3, kterou nešlo rozdělit běžnými chromatografickými metodami.



\*) chirální centra

#### Sumární vzorec

C<sub>22</sub>H<sub>30</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

#### Molekulární hmotnost

370,49

#### MS-EI analýza

[M+H]<sup>+</sup> *m/z* (%) = 371(19), 370(76), 341(4), 339(14), 298(5), 297(25), 283(6), 267(7), 227(4), 215(26), 211(15), 200(4), 183(12), 182(92), 174(12), 173(30), 172(9), 159(7), 158(17), 144(16), 131(5), 130(12), 125(14), 124(100), 122(5), 115(5), 109(6), 108(5), 67(5), 55(9)

#### NMR analýza

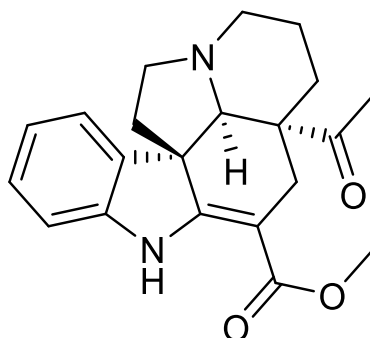
<sup>1</sup>H i <sup>13</sup>C spektra byla v naprosté shodě s referenčními daty<sup>215,434,435</sup>.

#### Optická otáčivost

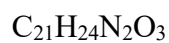
Nebyla měřena.

### 5.1.7 VR-7: (-)-Minovincin

Na základě shody experimentálních dat s literaturou byla látka VR-7 určena jako (-)-minovincin<sup>163,436-438</sup>.



#### Sumární vzorec



#### Molekulární hmotnost

352,43

#### MS-EI analýza

Látka nezplyňuje.

#### MS-ESI analýza

$[\text{M}+\text{H}]^+$   $m/z$  (%) = 353

#### NMR analýza

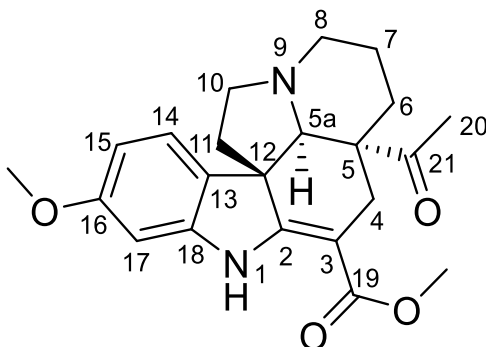
Spektra  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  plně odpovídají již publikovaným<sup>163,436-438</sup>.

#### Optická otáčivost

$[\alpha]_{\text{D}}^{26} = -557,0^\circ$  ( $c = 0,11$  g/100 ml;  $\text{CHCl}_3$ )

### 5.1.8 VR-8: (-)-16-Methoxyminovincin

Na základě porovnání analytických dat s literaturou látka VR-8 odpovídala struktuře s názvem (-)-16-methoxyminovincin<sup>439</sup>, dříve publikovanou pod názvem minoricein<sup>153</sup>. Více informací k určení struktury a ustanovení názvu lze nalézt v publikaci vycházející z této dizertace<sup>420</sup> a v disertační práci dr. Jany Maříkové<sup>50</sup>.



#### Sumární vzorec

$C_{22}H_{26}N_2O_4$

#### Molekulární hmotnost

382,45

#### MS-EI analýza

Látka nezplyňuje.

#### MS-ESI analýza

$[M+H]^+$   $m/z$  (%) = 383(100)

#### HRMS analýza (Q-TOF/ESI)

teoretická  $m/z$   $C_{22}H_{27}N_2O_4^+$   $[M+H]^+$  = 383,1965

experimentální  $m/z$   $C_{23}H_{31}N_2O_3^+$   $[M+H]^+$  = 383,1972

#### NMR analýza

$^1H$  NMR (500 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 8,74 (1H, bs, NH), 7,18 (1H, d,  $J = 8,2$  Hz, H14), 6,45 (1H, dd,  $J = 8,2$  Hz,  $J = 2,3$  Hz, H15), 6,38 (1H, d,  $J = 2,3$  Hz, H17), 3,78 (3H, s, 16-OCH<sub>3</sub>), 3,77 (3H, s, 19-OCH<sub>3</sub>), 3,24 (1H, d,  $J = 2,1$  Hz, H5a), 3,16–3,09 (1H, m, H8) 3,04 (1H, d,  $J = 15,0$  Hz, H4), 2,95 (1H, dd,  $J = 8,3$  Hz,  $J = 6,2$  Hz, H10), 2,80 (1H, dd,  $J = 15,0$  Hz,  $J = 2,1$  Hz, H4), 2,71 (1H, ddd,  $J = 11,4$  Hz,  $J = 8,4$  Hz,  $J = 4,3$  Hz, H10), 2,47 (1H, td,  $J = 11,2$  Hz,  $J = 3,1$  Hz, H8), 2,00–1,91 (2H, m, H6, H11), 1,91–1,83 (1H, m, překryv, H7), 1,89 (3H, s, překryv, H20), 1,75 (1H, dd,  $J = 11,4$  Hz,  $J = 4,3$  Hz, H11), 1,66–1,60 (1H, m, H7), 1,43 (1H, td,  $J = 13,0$  Hz,  $J = 5,1$  Hz, H6)

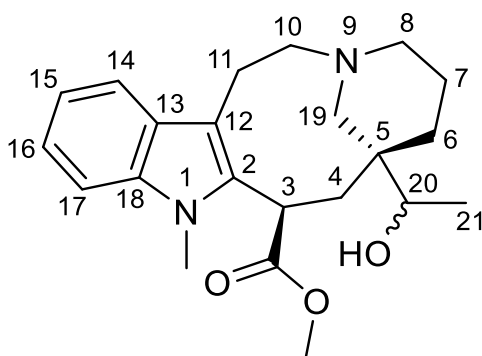
$^{13}\text{C}$  NMR (125,7 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 212,1 (C21), 168,7 (C2), 168,2 (C19), 159,6 (C16), 143,6 (C18), 130,6 (C13), 121,0 (C14), 105,5 (C15), 96,9 (C17), 91,8 (C3), 67,7 (C5a), 55,5 (C12), 55,4 (16- $\text{OCH}_3$ ), 54,0 (C5), 51,4 (C10), 51,1 (19- $\text{OCH}_3$ ), 49,8 (C8), 45,3 (C11), 31,1 (C6), 25,8 (C4), 25,2 (C20), 22,3 (C7)

**Optická otáčivost**

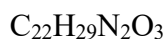
$[\alpha]_{\text{D}}^{26} = -400,0^\circ$  ( $c = 0,10$  g/100 ml; MeOH)

### 5.1.9 VR-9: (+)-Vinkaminorudein

NMR analýza odhalila, že se jedná o dosud nepopsanou látku, podobnou **VR-2**, avšak s přidanou hydroxyskupinou v poloze C20. Kvůli nedostatečnému množství vyhovujícího vzorku pro X-ray analýzu však její konfigurace nemohla být stanovena. Více detailů k určení struktury je k nalezení v publikovaném článku souvisejícím s touto prací<sup>420</sup> a v disertační práci dr. Jany Maříkové<sup>50</sup>. Látka byla pojmenována jako vinkaminorudein.



#### Sumární vzorec



#### Molekulová hmotnost

370,49

#### MS-EI analýza

$[\text{M}+\text{H}]^+$   $m/z$  (%) = 371(14), 370(59), 325(10), 311(6), 230(21), 229(100), 227(13), 226(91), 185(7), 184(20), 182(7), 170(14), 169(7), 168(16), 167(9), 158(15), 157(11), 155(8), 154(15), 144(12), 142(26), 141(8), 140(42), 139(10), 133(7), 124(18), 111(7), 110(34), 108(11), 96(17)

#### HRMS analýza (Q-TOF/ESI)

teoretická  $m/z$   $\text{C}_{22}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_3 + [\text{M}+\text{H}]^+ = 371,2329$

experimentální  $m/z$   $\text{C}_{22}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_3 + [\text{M}+\text{H}]^+ = 371,2339$

#### NMR analýza

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 7,53 (1H, dd,  $J = 7,8$  Hz,  $J = 1,1$  Hz, H14), 7,27 (1H, d,  $J = 7,8$  Hz, H17), 7,19 (1H, dd,  $J = 7,8$  Hz,  $J = 1,1$  Hz, H16), 7,09 (1H, dd,  $J = 7,8$  Hz,  $J = 1,1$  Hz, H15), 4,39 (1H, t,  $J = 3,8$  Hz, H3), 3,75–3,70 (1H, m, překryv, H19), 3,72 (3H, s, překryv, 3-COOCH<sub>3</sub>), 3,54 (3H, s, N1-CH<sub>3</sub>), 3,47 (1H, q,  $J = 6,5$  Hz, H20), 3,05–2,85 (2H, m, H11), 2,63–2,55 (2H, m, H10, H4), 2,38–2,22 (3H, m, H8, H10), 1,92 (1H, dd,  $J = 14,3$  Hz,  $J = 3,8$  Hz, H4), 1,64 (1H, d,  $J = 12,5$  Hz, H19), 1,52–1,39 (1H, m, H7), 1,36–1,21 (2H, m, překryv, H7, H6) 1,29 (3H, d, překryv,  $J = 6,5$  Hz, H21), 1,06 (1H, td,  $J = 12,5$  Hz,  $J = 5,5$  Hz, H6)



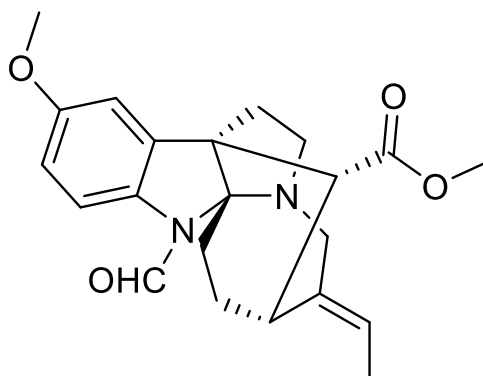
$^{13}\text{C}$  NMR (125,7 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 177,0 (C=O), 139,1 (C2), 136,7 (C18), 127,0 (C13), 120,7 (C16), 118,5 (C15), 118,1 (C14), 110,3 (C12), 108,6 (C17), 74,2 (C20), 56,6 (C19), 55,2 (C8), 53,6 (C10), 52,7 (3-COOCH<sub>3</sub>), 42,9 (C5), 38,7 (C3), 31,7 (C6), 31,1 (C4), 30,3 (N1-CH<sub>3</sub>), 22,3 (C11), 22,3 (C7), 17,6 (C21)

**Optická otáčivost**

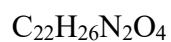
$[\alpha]_D^{27} = +27,8^\circ$  ( $c = 0,12$  g/100 ml;  $\text{CHCl}_3$ )

### 5.1.10 VR-10: (-)-Demethoxyalstonamid

Na základě shody experimentálních dat s literaturou byla látka VR-10 určena jako (-)-demethoxyalstonamid<sup>440</sup>.



#### Sumární vzorec



#### Molekulární hmotnost

382,46

#### MS-EI analýza

$[\text{M}+\text{H}]^+$   $m/z$  (%) = 383(7), 382(29), 355(24), 354(100), 353(4), 340(8), 339(35), 326(8), 295(11), 281(9), 267(4), 266(4), 252(4), 231(4), 216(4), 210(4), 200(5), 199(4), 198(5), 187(4), 186(6), 184(4), 174(5), 173(5), 160(5), 158(6), 154(5), 115(4), 79(5), 77(6)

#### NMR analýza

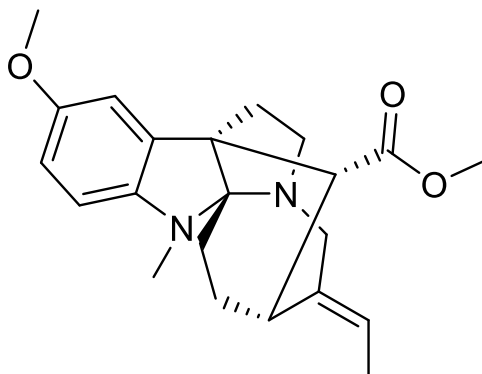
Spektra  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  byla v naprosté shodě s referenční literaturou<sup>440</sup>.

#### Optická otáčivost

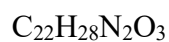
$[\alpha]_D^{28} = -82,8^\circ$  ( $c = 0,17$  g/100 ml;  $\text{CHCl}_3$ )

### 5.1.11 VR-11: (-)-Vinkorin

Na základě shody experimentálních dat s literaturou byla látka VR-11 určena jako (-)-vinkorin<sup>54,441</sup>.



#### Sumární vzorec



#### Molekulární hmotnost

368,48

#### MS-EI analýza

$[\text{M}+\text{H}]^+ m/z$  (%) = 370(3), 369(24), 368(100), 354(6), 353(26), 309(6), 281(5), 280(4), 266(5), 264(3), 245(7), 212(3), 201(8), 200(3), 188(4), 187(3), 184(4), 174(5), 172(4), 168(3)

#### NMR analýza

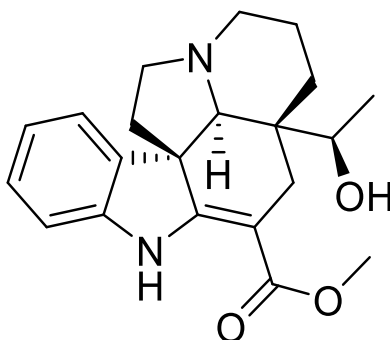
Experimentální  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  spektra byla v naprosté shodě s referenčními daty<sup>441</sup>.

#### Optická otáčivost

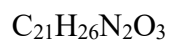
$[\alpha]_D^{28} = -156,0^\circ$  ( $c = 0,10$  g/100 ml;  $\text{CHCl}_3$ )

### 5.1.12 VR-12: (-)-Minovincinin

Na základě shody experimentálních dat s literaturou byla látka VR-12 určena jako (-)-minovincinin<sup>152,167,442,443</sup>.



#### Sumární vzorec



#### Molekulární hmotnost

354,44

#### MS-EI analýza

$[\text{M}+\text{H}]^+$   $m/z$  (%) = 336(27), 122(100)

#### NMR analýza

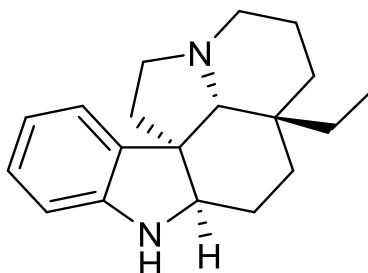
Experimentální  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  spektra byla v naprosté shodě s referenčními daty<sup>442</sup>.

#### Optická otáčivost

$[\alpha]_D^{26} = -517,4^\circ$  ( $c = 0,11$  g/100 ml;  $\text{CHCl}_3$ )

### 5.1.13 VR-13: (+)-Aspidospermidin

Na základě shody experimentálních dat s literaturou byla látka VR-13 určena jako (+)-aspidospermidin<sup>444-446</sup>.



#### Sumární vzorec

C<sub>19</sub>H<sub>26</sub>N<sub>2</sub>

#### Molekulární hmotnost

282,43

#### MS-EI analýza

[M+H]<sup>+</sup> *m/z* (%) = 283(5), 282(23), 281(4), 255(3), 254(18), 156(3), 152(6), 144(5), 143(5), 130(8), 125(10), 124(100)

#### NMR analýza

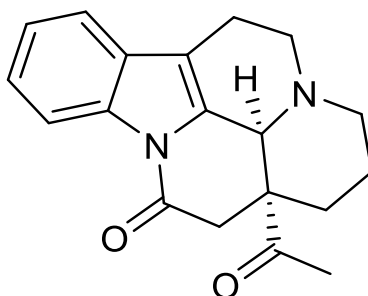
Spektra <sup>1</sup>H i <sup>13</sup>C byla v naprosté shodě s referenční literaturou<sup>445</sup>.

#### Optická otáčivost

[α]<sub>D</sub><sup>28</sup> = +29,4° (*c* = 0,11 g/100 ml; CHCl<sub>3</sub>)

#### 5.1.14 VR-14: (-)-19-Oxoeburnamonin

Na základě shody experimentálních dat s literaturou byla látka VR-14 určena jako (-)-19-oxoeburnamonin<sup>279</sup>.



#### Sumární vzorec

C<sub>19</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

#### Molekulární hmotnost

308,38

#### MS-EI analýza

[M+H]<sup>+</sup> *m/z* (%) = 308(12), 266(20), 265(100), 264(5), 263(18), 238(10), 237(54), 236(4), 235(3), 223(4), 222(6), 209(4), 207(3), 194(3), 193(4), 180(10), 168(4), 167(8), 133(3), 118(3), 115(3)

#### NMR analýza

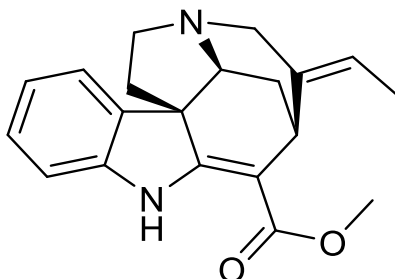
Spektra <sup>1</sup>H i <sup>13</sup>C byla v naprosté shodě s referenční literaturou<sup>279</sup>.

#### Optická otáčivost

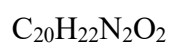
[α]<sub>D</sub><sup>28</sup> = -7,6° (*c* = 0,11 g/100 ml; CHCl<sub>3</sub>)

### 5.1.15 VR-15: (-)-Akuammicin

Na základě shody experimentálních dat s literaturou byla látka VR-15 určena jako (-)-akuammicin<sup>447</sup>.



#### Sumární vzorec



#### Molekulární hmotnost

322,41

#### MS-EI analýza

Látka nezplyňuje.

#### MS-ESI analýza

$[\text{M}+\text{H}]^+$   $m/z$  (%) = 323(100)

#### NMR analýza

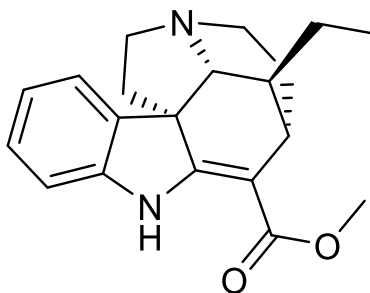
Experimentální  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  spektra byla v naprosté shodě s referenčními daty<sup>447</sup>.

#### Optická otáčivost

$[\alpha]_D^{26} = -388,0^\circ$  ( $c = 0,10$  g/100 ml;  $\text{CHCl}_3$ )

### 5.1.16 VR-16: (+)-Tubotaiwin

Na základě shody experimentálních dat s literaturou byla látka VR-16 určena jako (+)-tubotaiwin<sup>448</sup>.



#### Sumární vzorec

C<sub>20</sub>H<sub>24</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

#### Molekulární hmotnost

324,42

#### MS-EI analýza

Látka nezplyňuje.

#### MS-ESI analýza

[M+H]<sup>+</sup> *m/z* (%) = 325(100)

#### NMR analýza

Spektra <sup>1</sup>H i <sup>13</sup>C byla v naprosté shodě s referenční literaturou<sup>448</sup>.

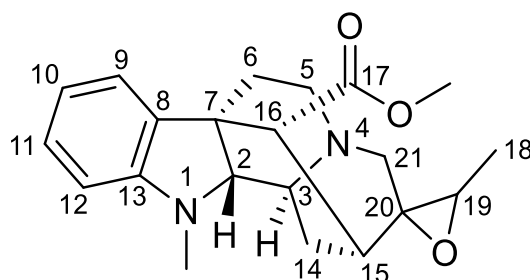
#### Optická otáčivost

[α]<sub>D</sub><sup>26</sup> = +176,0° (*c* = 0,10 g/100 ml; CHCl<sub>3</sub>)

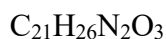


### 5.1.17 VR-17: (-)-Raukubainin

Látka VR-17 byla na základě důkladné analýzy a porovnání s literaturou určena jako (-)-raukubainin<sup>449</sup>, konstitucí odpovídající i dříveji popsanému diastereoizomeru quaternoxinu<sup>450</sup>. Vzhledem k nedostatečnému množství vzorku pro X-ray analýzu nebylo možné určit relativní konfiguraci epoxidové části molekuly (C19, C20). Více detailů k řešení struktury lze nalézt v publikaci vycházející z této disertační práce<sup>420</sup>.



#### Sumární vzorec



#### Molekulární hmotnost

354,45

#### MS-EI analýza

$[\text{M}+\text{H}]^+$   $m/z$  (%) = 355(16), 354(68), 299(11), 211(12), 210(59), 202(29), 197(17), 194(12), 184(13), 183(13), 182(21), 181(11), 180(14), 170(23), 168(17), 167(19), 166(19), 159(15), 158(89), 157(100), 156(11), 145(13), 144(87), 143(20), 128(10), 125(29), 115(14), 111(13), 56(10), 42(11)

#### HRMS analýza (Q-TOF/ESI<sup>+</sup>)

teoretická  $m/z$   $\text{C}_{21}\text{H}_{27}\text{N}_2\text{O}_3^+$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  = 355,2016

experimentální  $m/z$   $\text{C}_{21}\text{H}_{27}\text{N}_2\text{O}_3^+$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  = 355,2020

#### NMR analýza

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 7,12 (1H, td,  $J = 7,6$  Hz,  $J = 1,2$  Hz, H11), 7,05 (1H, dd,  $J = 7,6$  Hz,  $J = 1,2$  Hz, H9), 6,72 (1H, td,  $J = 7,6$  Hz,  $J = 1,2$  Hz, H10), 6,63 (1H, dd,  $J = 7,6$  Hz,  $J = 1,2$  Hz, H12), 4,11 (1H, d,  $J = 5,1$  Hz, H3), 3,83 (1H, ddd,  $J = 14,0$  Hz,  $J = 14,0$  Hz,  $J = 4,8$  Hz, H5), 3,76 (3H, s, 17-OCH<sub>3</sub>), 3,49 (1H, d,  $J = 15,7$  Hz, H21), 3,06 (1H, q,  $J = 5,7$  Hz, H19), 2,98 (1H, d,  $J = 4,0$  Hz, H16), 2,77–2,72 (1H, m, H15), 2,72–2,68 (1H, m, překryv, H6), 2,70 (3H, s, překryv, NCH<sub>3</sub>), 2,64 (1H, ddd,  $J = 14,0$  Hz,  $J = 5,1$  Hz,  $J = 3,0$  Hz, H14), 2,53 (1H, dd,  $J = 14,0$  Hz,  $J = 6,3$  Hz, H5), 2,51 (1H, s, H2), 2,29 (1H, d,  $J = 15,7$  Hz, H21), 1,69

(1H, dd,  $J = 15,1$  Hz,  $J = 4,8$  Hz, H6), 1,63 (1H, dd,  $J = 14,0$  Hz,  $J = 3,0$  Hz, H14), 1,29 (1H, d,  $J = 5,7$  Hz, H18)

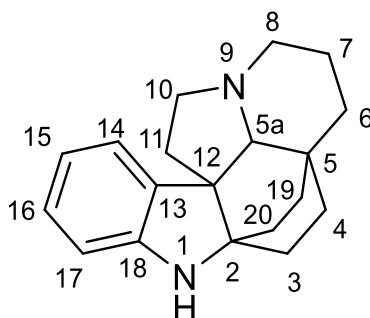
$^{13}\text{C}$  NMR (125,7 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 173,3 (C17), 153,5 (C13), 139,8 (C8), 127,4 (C11), 121,5 (C9), 119,5 (C10), 109,5 (C12), 79,4 (C2), 65,9 (C20), 65,6 (C19), 55,8 (C21), 53,5 (C16), 51,4 (17-OCH<sub>3</sub>), 50,2 (C5), 47,0 (C3), 42,9 (C7), 39,2 (C15), 34,0 (NCH<sub>3</sub>), 33,6 (C14), 32,8 (C6), 15,8 (C18)

**Optická otáčivost**

$[\alpha]_D^{20} = -11,0^\circ$  ( $c = 0,10$  g/100 ml;  $\text{CHCl}_3$ )

### 5.1.18 VR-18: (-)-Aspidofraktinin

Na základě porovnání experimentálních dat s literaturou byla látka VR-18 určena jako (-)-aspidofraktinin<sup>438</sup>, nicméně naměřená NMR spektra vykazovala odchylky naznačující, že se jedná o diastereoizomer. Bohužek vzhledem k nedostupnosti vhodného vzorku pro X-ray analýzu nebylo možné určit, o jaký diastereoizomer se jedná. Podrobnější komentář k určení struktury je dostupný v disertační práci dr. Jany Maříkové<sup>50</sup>.



#### Sumární vzorec

C<sub>19</sub>H<sub>24</sub>N<sub>2</sub>

#### Molekulární hmotnost

280,41

#### MS-EI analýza

[M+H]<sup>+</sup> *m/z* (%) = 281(16), 280(75), 279(12), 253(19), 252(100), 251(11), 224(8), 209(8), 195(8), 194(7), 182(8), 180(11), 169(8), 168(11), 167(11), 158(40), 157(21), 156(14), 144(10), 143(12), 140(9), 136(9), 130(12), 128(8), 125(7), 124(41), 115(9), 110(13), 109(98), 108(14)

#### NMR analýza

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 7,60 (1H, d, *J* = 7,5 Hz), 7,05 (1H, t, *J* = 7,5 Hz), 6,83 (1H, t, *J* = 7,5 Hz), 6,64 (1H, d, *J* = 7,5 Hz), 3,86–3,78 (1H, m, překryv, H10), 3,80 (1H, s, překryv, H5a), 3,54 (1H, td, *J* = 13,8 Hz, *J* = 4,1 Hz), 3,43–3,31 (2H, m, H8, H10), 2,94 (1H, ddd, *J* = 15,1 Hz, *J* = 9,2 Hz, *J* = 2,5 Hz), 2,27–2,11 (2H, m, H3, H4), 2,02–1,84 (4H, m, H3, H7, H11, H20), 1,80–1,73 (1H, m, H7), 1,71–1,59 (2H, m, H19, H6), 1,49–1,36 (4H, m, H4, H6, H19, H20)

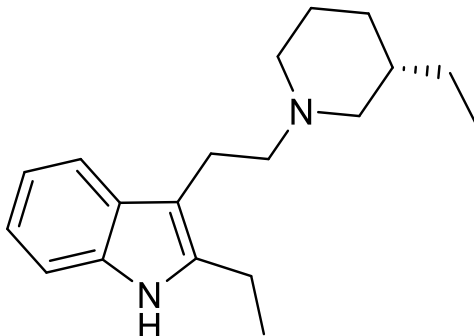
<sup>13</sup>C NMR (125,7 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 149,0 (C18), 135,5 (C13), 128,0 (C16), 123,2 (C14), 120,9 (C15), 110,8 (C17), 67,4 (C5a), 63,6 (C2), 57,3 (C12), 50,3 (C10), 46,8 (C8), 35,0 (C19), 33,2 (C6), 32,7 (C11), 30,3 (C5), 30,2 (C20), 29,4 (C4), 25,7 (C3), 15,2 (C7)

#### Optická otáčivost

[α]<sub>D</sub><sup>27</sup> = -18,5° (*c* = 0,17 g/100 ml; CHCl<sub>3</sub>)

### 5.1.19 VR-19: (-)-2-Ethyl-3[2-(3-ethylpiperidiny)-ethyl]-1*H*-indol

Na základě porovnání experimentálních dat s literaturou byla látka VR-19 určena jako (-)-2-ethyl-3[2-(3-ethylpiperidiny)-ethyl]-1*H*-indol<sup>451</sup>, rovněž v minulosti označena jako demethoxykarbonyltetrahydrosekodin<sup>452</sup>.



#### Sumární vzorec

C<sub>19</sub>H<sub>28</sub>N<sub>2</sub>

#### Molekulární hmotnost

284,45

#### MS-EI analýza

[M+H]<sup>+</sup> *m/z* (%) = 284(4), 158(5), 156(3), 143(7), 127(10), 126(100), 58(11), 55(5)

#### NMR analýza

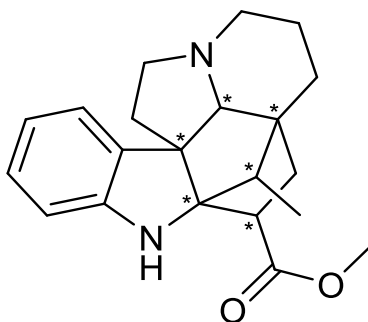
Spektra <sup>1</sup>H i <sup>13</sup>C byla v naprosté shodě s referenční literaturou<sup>451</sup>.

#### Optická otáčivost

[α]<sub>D</sub><sup>27</sup> = -20,3° (*c* = 0,16 g/100 ml; MeOH)

### 5.1.20 VR-20: (-)-14,15-Dihydrovindolinin

Na základě porovnání experimentálních dat s literaturou byla látka VR-20 určena jako (-)-14,15-dihydrovindolinin<sup>453</sup>. Absolutní konfigurace je však v literatuře pro porovnání zatím nedostupná a látka bohužel nekrytalizovala v dostatečném množství pro X-ray analýzu.



\*) chirální centra

#### Sumární vzorec

C<sub>21</sub>H<sub>26</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

#### Molekulární hmotnost

338,45

#### MS-EI analýza

[M+H]<sup>+</sup> *m/z* (%) = 339(18), 338(75), 279(6), 230(9), 229(33), 214(7), 206(6), 197(10), 194(9), 183(6), 181(6), 180(10), 171(7), 170(43), 169(16), 168(16), 167(11), 156(15), 155(9), 154(14), 143(6), 137(15), 136(100), 128(8), 125(9), 124(75), 123(36), 122(26), 115(7), 110(33)

#### NMR analýza

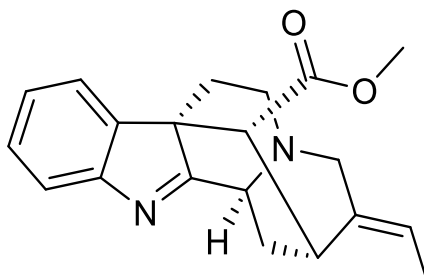
Spektra <sup>1</sup>H i <sup>13</sup>C byla v naprosté shodě s referenční literaturou<sup>453</sup>.

#### Optická otáčivost

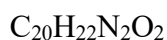
[α]<sub>D</sub><sup>27</sup> = -33,2° (*c* = 0,17 g/100 ml; MeOH)

### 5.1.21 VR-21: (+)-Striktamin

Na základě porovnání experimentálních dat s literaturou byla látka VR-21 určena jako (+)-striktamin<sup>454</sup>, též prve označován jako vinkamidin v roce 1960<sup>137,138</sup>.



#### Sumární vzorec



#### Molekulární hmotnost

322,41

#### MS-EI analýza

$[\text{M}+\text{H}]^+$   $m/z$  (%) = 323(21), 322(100), 321(82), 291(10), 264(15), 263(62), 249(7), 241(8), 234(17), 233(9), 232(9), 220(10), 219(7), 218(10), 208(7), 206(10), 204(10), 194(11), 182(11), 181(12), 180(24), 169(7), 168(12), 167(14), 156(15), 154(15), 128(9), 121(13), 115(10), 77(10)

#### NMR analýza

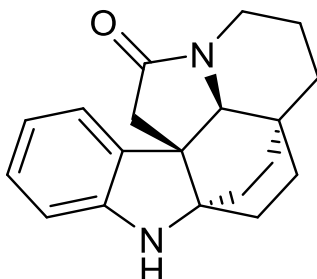
Experimentální  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  spektra byla v naprosté shodě s referenčními daty<sup>454</sup>.

#### Optická otáčivost

$[\alpha]_D^{28} = +103,8^\circ$  ( $c = 0,19$  g/100 ml;  $\text{CHCl}_3$ )

### 5.1.22 VR-22: (-)-5-Oxoaspidofraktinin

Na základě porovnání experimentálních dat s literaturou byla látka VR-22 určena jako (-)-5-oxoaspidofraktinin<sup>455</sup>.



#### Sumární vzorec

C<sub>19</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub>O

#### Molekulární hmotnost

294,40

#### MS-EI analýza

[M+H]<sup>+</sup> *m/z* (%) = 295(20), 294(98), 265(5), 252(4), 251(5), 224(5), 223(5), 209(5), 208(4), 195(4), 194(5), 184(4), 183(4), 180(5), 167(6), 157(17), 156(100), 155(5), 154(4), 147(3), 144(12), 143(50), 130(7), 129(4), 128(6), 115(7), 111(16), 110(5), 96(21), 77(5)

#### NMR analýza

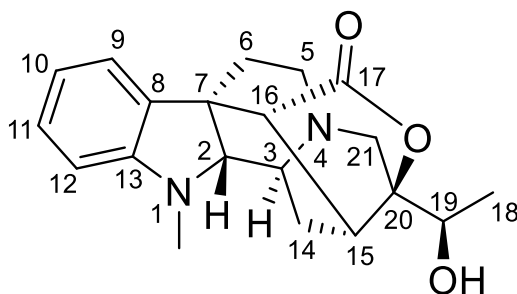
Experimentální <sup>1</sup>H i <sup>13</sup>C spektra byla v naprosté shodě s referenčními daty<sup>455</sup>.

#### Optická otáčivost

[α]<sub>D</sub><sup>24</sup> = -38,7° (*c* = 0,10 g/100 ml; CHCl<sub>3</sub>)

### 5.1.23 VR-23: (-)-Raukubain

Na základě porovnání experimentálních dat s literaturou byla látka VR-23 určena jako (-)-raukubain<sup>449</sup>. Konstituce rovněž odpovídala dřívěji popsanému quaternolinu<sup>450</sup>, který ale postrádal dostatečné analytické údaje. Více detailů k určení struktury lze nalézt v publikaci vycházející z této disertace<sup>420</sup> a v disertační práci dr. Jany Maříkové<sup>50</sup>.



#### Sumární vzorec

$C_{20}H_{24}N_2O_3$

#### Molekulární hmotnost

340,42

#### MS-EI analýza

$[M+H]^+$   $m/z$  (%) = 341(10), 340(46), 239(6), 214(16), 213(100), 197(13), 196(52), 194(6), 184(14), 183(8), 182(21), 181(8), 180(8), 172(7), 170(14), 168(13), 167(18), 159(10), 158(82), 157(91), 156(8), 154(6), 152(7), 145(10), 144(84), 143(14), 128(8), 115(11), 70(29), 56(8)

#### HRMS analýza (Q-TOF/ESI)

teoretická  $m/z$   $C_{20}H_{25}N_2O_3^+$   $[M+H]^+$  = 341,1860

experimentální  $m/z$   $C_{20}H_{25}N_2O_3^+$   $[M+H]^+$  = 341,1871

#### NMR analýza

**$^1H$  NMR** (500 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 7,42 (1H, d,  $J = 7,5$  Hz, H9), 7,12 (1H, t,  $J = 7,5$  Hz, H11), 6,83 (1H, t,  $J = 7,5$  Hz, H10), 6,65 (1H, d,  $J = 7,5$  Hz, H12), 3,97 (1H, d,  $J = 4,6$  Hz, H3), 3,69–3,61 (2H, m, H19, OH), 3,41–3,32 (1H, m, překryv, H5), 3,35 (1H, d, překryv,  $J = 8,0$  Hz, H16), 3,28 (1H, d,  $J = 16,3$  Hz, H21), 3,14–3,08 (1H, m, H15), 2,79 (1H, dd,  $J = 14,2$  Hz,  $J = 7,5$  Hz, H5), 2,72 (3H, s, překryv, N1- $CH_3$ ), 2,70 (1H, d, překryv,  $J = 16,3$  Hz, H21), 2,56 (1H, s, H2), 2,12 (1H, dd,  $J = 14,3$  Hz,  $J = 4,7$  Hz, H14), 1,99–1,88 (1H, m, H6), 1,73 (1H, dd,  $J = 14,3$  Hz,  $J = 4,6$  Hz, H14), 1,46 (1H, dd,  $J = 15,3$  Hz,  $J = 7,5$  Hz, H6), 1,29 (3H, d,  $J = 6,3$  Hz, H18)

**$^{13}C$  NMR** (125,7 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 177,2 (C17), 153,1 (C13), 141,4 (C8), 127,0 (C11), 120,6 (C9), 120,1 (C10), 109,6 (C12), 90,6 (C20), 78,7 (C2), 68,8 (C19), 53,8 (C21), 50,4 (C5), 48,4 (C16), 45,8 (C3), 40,7 (C7), 34,5 (N1- $CH_3$ ), 33,6 (C6), 32,2 (C15), 30,0 (C14), 17,6 (C18)



### Optická otáčivost

$$[\alpha]_D^{27} = -14,9^\circ (c = 0,19 \text{ g/100 ml; CHCl}_3)$$

## 5.2 Inhibiční aktivita alkaloidů vůči vybraným enzymům

Všechny izolované alkaloidy byly testovány na inhibici lidských cholinesteras (*hAChE*, *hBuChE*). Alkaloidy získané v dostatečném množství byly testovány i na další enzymy patofyziologie AD (POP, GSK-3 $\beta$ ). Výsledky jsou shrnuty v Tab. 5. Barevně je vyznačená významnost inhibiční aktivity vůči cholinesterasám, kde červená znamená velmi významnou aktivitu ( $IC_{50} < 1 \mu M$ ), oranžová středně významnou aktivitu ( $IC_{50} < 10 \mu M$ ) a žlutá méně významnou aktivitu ( $IC_{50} < 30 \mu M$ ).

Tab. 5 Biologické aktivity alkaloidů vůči enzymům patofyziologie AD.

Kód	Alkaloid	$IC_{50}$ <i>hAChE</i> $\pm$ VSO ( $\mu M$ ) <sup>a</sup>	$IC_{50}$ <i>hBuChE</i> $\pm$ VSO ( $\mu M$ ) <sup>a</sup>	$IC_{50}$ POP $\pm$ VSO ( $\mu M$ ) <sup>a</sup>	% Inhibice GSK-3 $\beta$ $\pm$ VSO
VR-1	vinkaminorin	> 100*	> 100*	429 $\pm$ 30	79,05 $\pm$ 29,63
VR-2	vinkaminorein	> 100*	8,71 $\pm$ 0,49*	408 $\pm$ 60	72,36 $\pm$ 1,78
VR-3	eburnamonin	> 100*	93,49 $\pm$ 15,90*	nm.	94,09 $\pm$ 8,36
VR-4	minovín	> 100*	26,32 $\pm$ 2,52*	nm.	97,12 $\pm$ 4,08
VR-5	16-methoxyminovín	> 100	25,01 $\pm$ 3,27	nt.	nt.
VR-6	vinkatin	> 100	43,47 $\pm$ 3,30	nm.	nm.
VR-7	minovincin	> 100*	> 100*	301 $\pm$ 15	83,27 $\pm$ 10,05
VR-8	16-methoxyminovincin	> 100	> 100	nm.	nm.
VR-9	vinkaminorudein	> 100	84,91 $\pm$ 2,98	nm.	nm.
VR-10	demethoxyalstonamid	> 100	56,38 $\pm$ 2,58	nm.	nm.
VR-11	vinkorin	> 100*	9,75 $\pm$ 0,45*	nt.	nt.
VR-12	minovincinin	> 100	> 100	nm.	nm.
VR-13	aspidospermidin	> 100	33,60 $\pm$ 1,52	nm.	nm.
VR-14	19-oxoeburnamonin	> 100	> 100	nt.	nt.
VR-15	akuammicin	> 100	38,17 $\pm$ 0,84	nt.	nt.
VR-16	tubotaiwin	> 100	11,70 $\pm$ 0,11	nm.	nm.
VR-17	rauubainin	> 100	93,96 $\pm$ 6,80	> 500	nm.
VR-18	aspidofraktinin	> 100	> 100	nm.	nm.
VR-19	2-ethyl-3[2-(3-ethylpiperidinyl)-ethyl]-1 <i>H</i> -indol	> 100	0,650 $\pm$ 0,016	58 $\pm$ 4	31,43 $\pm$ 3,05 <sup>c</sup>
VR-20	14,15-dihydrovindolinin	> 100	> 100	nm.	nm.
VR-21	striktamin	> 100	> 100	190 $\pm$ 11	nm.
VR-22	5-oxoaspidofraktinin	> 100	> 100	nt.	nt.
VR-23	rauubain	> 100	> 100	nt.	nt.
	galantamin <sup>e</sup>	1,72 $\pm$ 0,12	42 $\pm$ 1	-	-
	eserin <sup>e</sup>	0,063 $\pm$ 0,005	0,13 $\pm$ 0,01	-	-
	berberin <sup>e</sup>	0,72 $\pm$ 0,11	31 $\pm$ 4	142 $\pm$ 21	-

<sup>a</sup> Koncentrace látky potřebná ke snížení aktivity enzymu o 50 %, hodnoty jsou průměrem s výběrovou směrodatnou odchylkou (VSO) ze tří nezávislých měření, kde každé bylo provedeno v triplicátu; <sup>b</sup> Měřeno při koncentraci 50  $\mu M$ ; <sup>c</sup> Měřeno při koncentraci 100  $\mu M$ ; <sup>e</sup> Referenční látka; nt. zkratka pro netestováno z důvodu nedostatečného množství; nm. zkratka pro neměřeno kvůli problému s rozpustností; \*hodnota převzata ze souvisejících diplomových prací<sup>416-419</sup>

### 5.3 Cytotoxicita izolovaných alkaloidů

Izolované alkaloidní látky, které byly získány v dostatečné množství, byly testovány na cytotoxicitu na panelu několika buněčných linií. Výsledky shrnuje Tab. 6, která znázorňuje procento růstu devíti linií tumorových buněk a jedné zdravé linie (MRC-5) po aplikaci alkaloidu do živného média. S vyšší inhibicí růstu (cytotoxicita) procentuální hodnota buněčné linie klesá. Červenou barvou je rozlišena významná cytotoxicita (< 25 %), oranžovou střední toxicita (< 50 %) a žlutou mírná cytotoxicita (< 75 %). Mezi vybraými liniemi byly Jurkat (akutní leukémie T buněk), MOLT-4 (akutní lymfoblastická leukémie), A549 (plicní adenokarcinom), HT-29 (kolorektální adenokarcinom), PANC-1 (epiteliální karcinom pankreatu), A2780 (karcinom vaječníků), HeLa (adenokarcinom děložního čípku), MCF-7 (adenokarcinom prsu), SAOS-2 (osteosarkom) a MRC-5 (zdravé plicní fibroblasty).

Tab. 6 Cytotoxicita izolovaných alkaloidů při koncentraci 10  $\mu$ M.

Kód	Jurkat	MOLT-4	A549	HT-29	PANC-1	A2780	HeLa	MCF-7	SAOS-2	MRC-5
VR-1	121 $\pm$ 8	107 $\pm$ 12	80 $\pm$ 24	88 $\pm$ 16	130 $\pm$ 17	117 $\pm$ 28	52 $\pm$ 19	97 $\pm$ 5	135 $\pm$ 14	135 $\pm$ 5
VR-2	101 $\pm$ 17	90 $\pm$ 17	99 $\pm$ 7	111 $\pm$ 15	99 $\pm$ 7	111 $\pm$ 15	99 $\pm$ 4	88 $\pm$ 3	112 $\pm$ 4	121 $\pm$ 5
VR-3	7 $\pm$ 3	25 $\pm$ 11	75 $\pm$ 8	80 $\pm$ 7	82 $\pm$ 5	54 $\pm$ 3	27 $\pm$ 5	63 $\pm$ 8	54 $\pm$ 3	116 $\pm$ 7
VR-4	75 $\pm$ 5	72 $\pm$ 5	108 $\pm$ 9	86 $\pm$ 10	101 $\pm$ 7	88 $\pm$ 3	92 $\pm$ 8	88 $\pm$ 6	103 $\pm$ 4	93 $\pm$ 9
VR-5	99 $\pm$ 9	89 $\pm$ 3	113 $\pm$ 2	101 $\pm$ 3	106 $\pm$ 8	93 $\pm$ 1	98 $\pm$ 3	98 $\pm$ 5	103 $\pm$ 2	96 $\pm$ 5
VR-6	89 $\pm$ 9	91 $\pm$ 5	99 $\pm$ 10	94 $\pm$ 15	103 $\pm$ 9	107 $\pm$ 12	96 $\pm$ 8	85 $\pm$ 5	96 $\pm$ 8	89 $\pm$ 6
VR-7	106 $\pm$ 7	102 $\pm$ 5	97 $\pm$ 6	109 $\pm$ 8	110 $\pm$ 7	102 $\pm$ 2	85 $\pm$ 15	101 $\pm$ 5	113 $\pm$ 4	99 $\pm$ 5
VR-8	31 $\pm$ 12	82 $\pm$ 7	75 $\pm$ 16	88 $\pm$ 14	86 $\pm$ 9	65 $\pm$ 1	65 $\pm$ 2	79 $\pm$ 11	84 $\pm$ 10	105 $\pm$ 5
VR-9	97 $\pm$ 6	91 $\pm$ 7	101 $\pm$ 8	94 $\pm$ 11	101 $\pm$ 6	98 $\pm$ 8	99 $\pm$ 3	92 $\pm$ 3	101 $\pm$ 7	88 $\pm$ 3
VR-10	106 $\pm$ 7	94 $\pm$ 6	87 $\pm$ 4	98 $\pm$ 11	96 $\pm$ 5	99 $\pm$ 5	101 $\pm$ 9	96 $\pm$ 12	102 $\pm$ 12	106 $\pm$ 3
VR-11	74 $\pm$ 8	79 $\pm$ 1	96 $\pm$ 5	51 $\pm$ 19	60 $\pm$ 23	79 $\pm$ 15	82 $\pm$ 9	85 $\pm$ 8	80 $\pm$ 11	85 $\pm$ 3
VR-12	80 $\pm$ 2	85 $\pm$ 6	102 $\pm$ 5	87 $\pm$ 6	94 $\pm$ 4	117 $\pm$ 40	93 $\pm$ 12	86 $\pm$ 5	92 $\pm$ 5	87 $\pm$ 6
VR-13	90 $\pm$ 6	96 $\pm$ 32	90 $\pm$ 15	80 $\pm$ 22	101 $\pm$ 8	98 $\pm$ 6	108 $\pm$ 9	97 $\pm$ 11	89 $\pm$ 23	82 $\pm$ 12
VR-14	97 $\pm$ 1	93 $\pm$ 5	99 $\pm$ 13	97 $\pm$ 9	93 $\pm$ 4	101 $\pm$ 12	89 $\pm$ 4	96 $\pm$ 6	96 $\pm$ 6	97 $\pm$ 3
VR-15	nt.	nt.	nt.	nt.	nt.	nt.	nt.	nt.	nt.	nt.
VR-16	84 $\pm$ 14	69 $\pm$ 30	80 $\pm$ 10	70 $\pm$ 12	90 $\pm$ 17	102 $\pm$ 17	97 $\pm$ 11	83 $\pm$ 9	74 $\pm$ 14	64 $\pm$ 15
VR-17	nt.	nt.	nt.	nt.	nt.	nt.	nt.	nt.	nt.	nt.
VR-18	107 $\pm$ 8	101 $\pm$ 2	100 $\pm$ 2	96 $\pm$ 7	99 $\pm$ 7	94 $\pm$ 7	101 $\pm$ 11	100 $\pm$ 3	99 $\pm$ 13	105 $\pm$ 0
VR-19	114 $\pm$ 10	97 $\pm$ 5	92 $\pm$ 21	88 $\pm$ 13	117 $\pm$ 24	97 $\pm$ 3	104 $\pm$ 8	94 $\pm$ 8	111 $\pm$ 14	120 $\pm$ 2
VR-20	92 $\pm$ 6	83 $\pm$ 28	84 $\pm$ 15	74 $\pm$ 10	86 $\pm$ 15	117 $\pm$ 6	94 $\pm$ 5	88 $\pm$ 13	81 $\pm$ 17	90 $\pm$ 25
VR-21	95 $\pm$ 4	93 $\pm$ 4	76 $\pm$ 10	86 $\pm$ 17	86 $\pm$ 12	91 $\pm$ 7	90 $\pm$ 4	76 $\pm$ 9	93 $\pm$ 19	100 $\pm$ 1
VR-22	nt.	nt.	nt.	nt.	nt.	nt.	nt.	nt.	nt.	nt.
VR-23	104 $\pm$ 10	95 $\pm$ 2	97 $\pm$ 3	98 $\pm$ 6	97 $\pm$ 9	92 $\pm$ 2	98 $\pm$ 9	86 $\pm$ 4	97 $\pm$ 12	105 $\pm$ 4
DOX*	3 $\pm$ 1	2 $\pm$ 1	11 $\pm$ 2	60 $\pm$ 8	88 $\pm$ 4	21 $\pm$ 6	14 $\pm$ 3	29 $\pm$ 5	18 $\pm$ 5	29 $\pm$ 9

\*DOX = pozitivní standard doxorubicin v konc. 1  $\mu$ M ; nt. zkratka pro netestováno z důvodu nedostatečného množství

## 5.4 Hodnoty logBB izolovaných alkaloidů

Tab. 7 shrnuje výsledky výpočtů logBB u všech získaných alkaloidů. Zeleně jsou označeny látky s vysokou pravděpodobností přestupu (logBB nad 0,3). U ostatních látek s logBB mezi -1 a 0,3 je přestup přes HEB ještě teoreticky možný; u látek s logBB pod -1 (žádná ze získaných alkaloidů) by byla ale pravděpodobnost přestupu velmi nízká<sup>456</sup>.

Tab. 7 LogBB izolovaných alkaloidů.

Kód	Alkaloid	LogBB
VR-1	vinkaminorin	-0,262
VR-2	vinkaminorein	-0,262
VR-3	eburnamonin	-0,523
VR-4	minovin	0,415
VR-5	16-methoxyminovin	0,198
VR-6	vinkatin	0,595
VR-7	minovincin	0,193
VR-8	16-methoxyminovincin	-0,270
VR-9	vinkaminorudein	-0,864
VR-10	demethoxyalstonamid	0,023
VR-11	vinkorin	-0,022
VR-12	minovincinin	-0,075
VR-13	aspidospermidin	0,492
VR-14	19-oxoeburnamonin	-0,433
VR-15	akuammicin	0,116
VR-16	tubotaiwin	0,438
VR-17	rauubainin	0,210
VR-18	aspidofraktinin	0,595
VR-19	2-ethyl-3[2-(3-ethylpiperidinyl)-ethyl]-1 <i>H</i> -indol	-0,164
VR-20	14,15-dihydrovindolinin	0,435
VR-21	striktamin	0,575
VR-22	5-oxoaspidofraktinin	0,315
VR-23	rauubain	-0,291

## 5.5 PAMPA pro látku VR-19

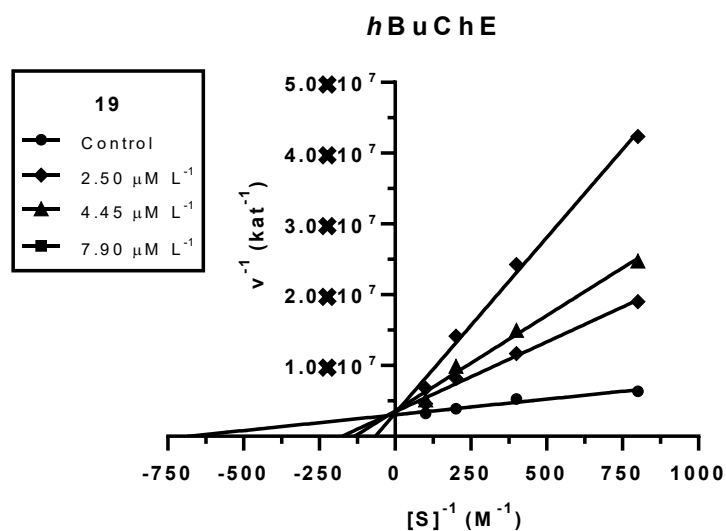
K odhadu schopnosti nejaktivnější látky VR-19 přecházet přes hematoencefalickou bariéru pasivní difúzí byl proveden *in vitro* test s uměle vytvořenou membránou (PAMPA) (Tab. 8). Aby u dané látky byla považována vysoká pravděpodobnost přestupu přes HEB, musí mít experimentálně zjištěný parametr přestupu  $P_e$  ( $10^{-6} \text{ cm.s}^{-1}$ ) nad 4,0 (CNS +). U látek s  $P_e$  ( $10^{-6} \text{ cm.s}^{-1}$ ) pod 2,0 je předpokládána nízká schopnost penetrace přes HEB (CNS –). Látka s hodnotou  $P_e$  ( $10^{-6} \text{ cm.s}^{-1}$ ) mezi 2,0 a 4,0 by měla schopnost průniku přes HEB nejistou<sup>425</sup>.

Tab. 8 PAMPA pro VR-19.

	<b>Látka</b>	<b><math>P_e \pm \text{VSO} (\times 10^{-6} \text{ cm.s}^{-1})</math></b>	<b>CNS (+/-)</b>
<b>Izolovaný alkaloid</b>	VR-19	$15,70 \pm 1,26$	CNS +
<b>Negativní kontrola</b>	Furosemid	$0,19 \pm 0,07$	CNS –
	Chlorothiazid	$1,14 \pm 0,53$	CNS –
	Cefuroxim	$0,62 \pm 0,16$	CNS –
<b>Pozitivní kontrola</b>	Donepezil	$21,49 \pm 2,05$	CNS +
	Rivastigmin	$20,00 \pm 2,07$	CNS +
	Takrin	$5,96 \pm 0,59$	CNS +

## 5.6 Farmakokinetické parametry látky VR-19

K určení inhibičního mechanismu nejaktivnější látky VR-19 na *h*BuChE byla provedena kinetická studie. Statistická analýza ukázala, že se jedná o kompetitivní typ inhibice ( $p < 0,05$ ), což bylo i v souladu s Lineweaver-Burk plotem, který byl použit pro vizualizaci získaných dat (Obr. 36). Afinitní parametr pro inhibici *h*BuChE alkaloidem VR-19 byl  $K_i = 54,9 \pm 8,8$  nM.



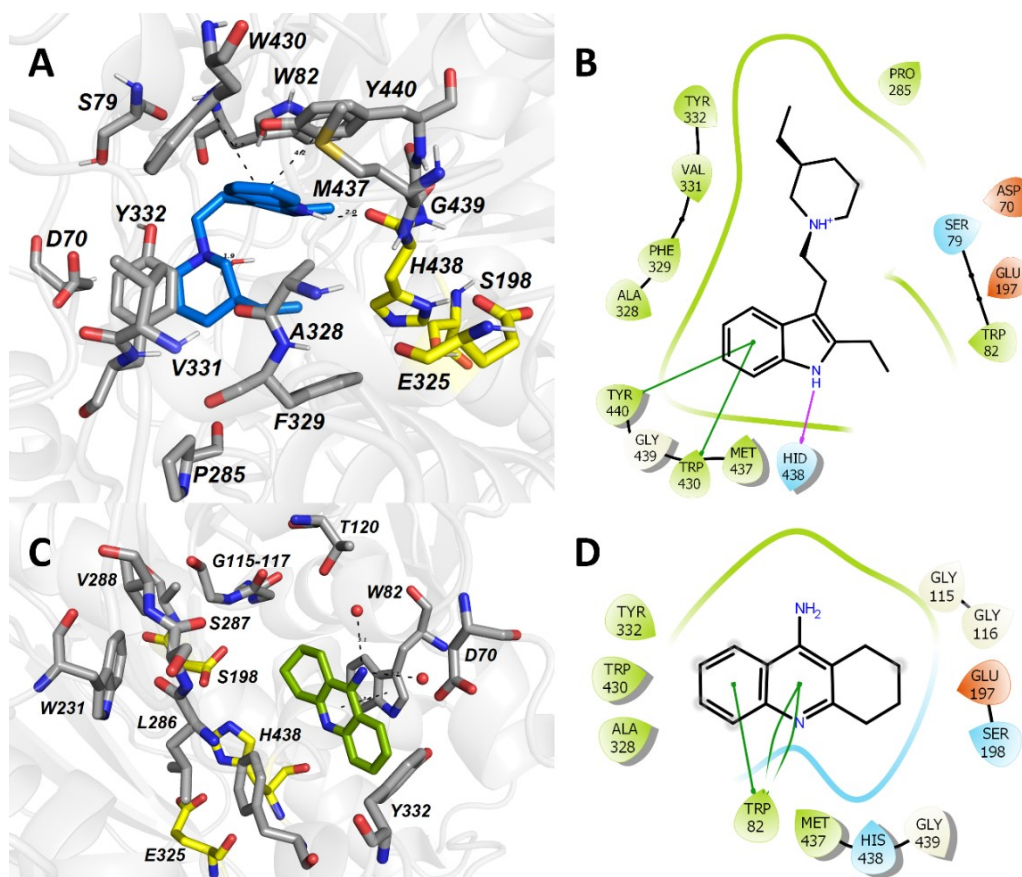
Obr. 36 Průsečík linií je lokalizován na ose „y“, což na aktivním místě enzymu znamená reverzibilní kompetitivní typ inhibice. Se zvyšující se koncentrací inhibitoru se parametr  $V_{\max}$  (mezní rychlost reakce) neměnil, zatímco parametr  $K_m$  (koncentrace substrátu, při níž je dosaženo poloviny mezní rychlosti) se zvyšoval.

## 5.7 Dockingová studie látky VR-19

Dockingová studie a molekulární dynamická simulace látky VR-19 v aktivním místě enzymu *h*BuChE odhalila několik významných interakcí zodpovědných za vysokou aktivitu ligandu (Obr. 37A, 37B). Část molekuly obsahující 2-ethyl-1*H*-indol je angažována v patrové  $\pi$ - $\pi$  interakci s Tyr440 (vzdálenost 4,2 Å), a dislokované  $\pi$ - $\pi$  interakci s Trp430 (4,7 Å). Tato část se rovněž nachází v blízkosti Trp82 (4,3 Å). Vodíková vazba (1,9 Å) může být pozorována mezi indolovou částí VR-19 a amidovou skupinou páteřního His438 z katalytické triády; ostatní aminokyselinové zbytky katalytické triády (Ser198, Glu325) stojí mimo interakci. Protonovaný dusík 3-ethylpiperidinové části VR-19 je situován čelně vůči Tyr332 a poskytuje s ním nekovalentní vazbu typu kation- $\pi$  (4,5 Å). Hydrofobní oblast tvořená Phe329 je obsazena 3-ethylpiperidinovým přívěškem ligandu.

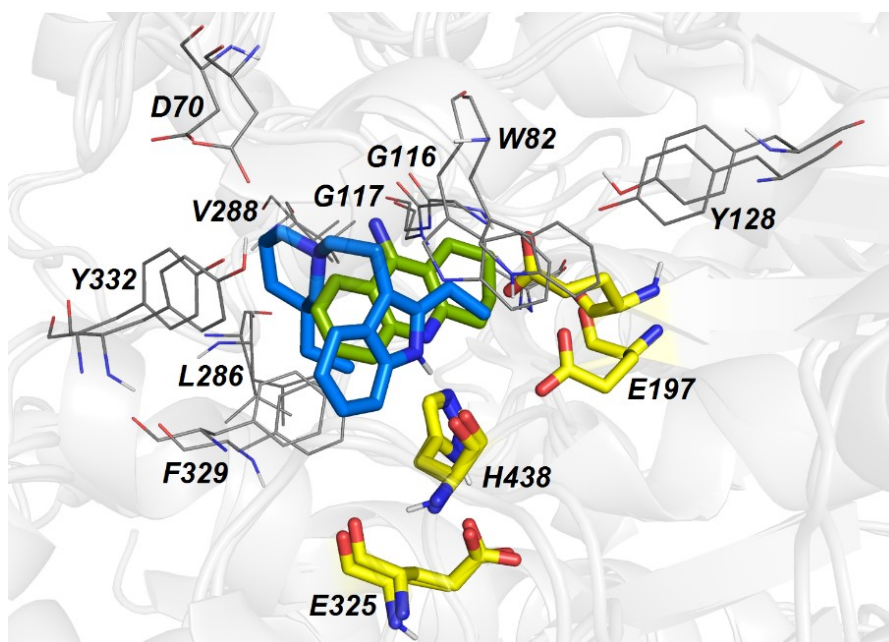
Mezi takrinem a Trp82 je pozorovatelná charakteristická paralelní  $\pi$ - $\pi$ /kation- $\pi$  interakce (vzdálenost 3,6 Å) (Obr. 37C, 37D)<sup>427</sup>. Aminoskupina takrinu je ukotvena ke dvěma molekulám vody, což vytváří most k dalším AMK zbytkům jako Asp70, Ser79, and Thr120 (nezobrazeno). Vodíková vazba může být pozorována mezi aromatickým dusíkem takrinu a karbonylovou skupinou hlavního řetězce His438 katalytické triády.

Překrytí látky VR-19 a takrinu je zobrazeno na Obr. 38; oba ligandy se překrývají svými aromatickými částmi, které jsou zodpovědné za  $\pi$ - $\pi$ /kation- $\pi$  interakci s Trp82. U obou jsou rovněž pozorovatelné různé hydrofobní interakce s Ala328, Trp430 a Tyr332. V případě takrinu se těchto hydrofobních interakcí účastní aromatické jádro, kdežto u VR-19 je v interakcích zapojená jenom 3-ethylpiperidinová část. Díky tomuto přívěšku VR-19 obsazuje i další oblasti aktivního místa *h*BuChE.



Obr. 37 Nejlépe skórovaná pozice alkaloidu VR-19 v aktivním místě *h*BuChE (A, B; PDB ID: 4BDS) a krystalická struktura komplexu *h*BuChE s takrinem (C, D; PDB ID: 4BDS). Ligandy jsou zobrazeny modře (A, VR-19) a zeleně (C, takrin). Důležité AMK zbytky zodpovědné za ukotvení ligandů jsou zobrazeny šedě; zbytky katalytické triády jsou žluté (A, C). Hlavní interakce jsou vykresleny černými přerušovanými linkami; vzdálenosti jsou měřeny v angströmech (Å). Zbytek receptoru je zobrazen ve světle šedé kreslené konformaci (A, C). Části A a C byly generovány programem PyMOL Molecular Graphics System, v. 2.4.1, Schrödinger, LLC. Obrázky 2D reprezentace B a D byly vygenerovány programem Maestro 12.3 (Schrödinger Release, Schrodinger, LLC, New York, NY, 2020).





Obr. 38 Překryv nejlépe skórované pozice ligandu VR-19 (modře) a krystalické struktury takrinu (zeleně) v aktivním místě *h*BuChE (PDB ID: 4BDS). AMK zbytky interagující s ligandy jsou zobrazeny šedě a žlutě (katalytická triáda). Zbytek receptoru je zobrazen ve světle šedé kreslené konformaci. Obrázek byl vytvořen programem PyMOL Molecular Graphics System, v. 2.4.1, Schrödinger, LLC.

## 6 DISKUZE

Rostlina *Vinca minor* L. byla vybrána pro podrobnou fytochemickou studii na základě výsledků screeningové studie alkaloidního extraktu nadzemní části, který byl testován na inhibiční potenciál vůči cholinesterasám ( $IC_{50,hAChE} = 192 \mu\text{g/ml}$ ;  $IC_{50,hBuChE} = 14 \mu\text{g/ml}$ ). Zjištěné výsledky byly v souladu se studií tureckého týmu z roku 2012, která stanovila procentuální inhibiční aktivitu alkaloidního extraktu *V. minor* L. na 61 % pro AChE a 74 % pro BuChE při koncentraci  $200 \mu\text{g/ml}^{25}$ .

Pro fytochemickou studii bylo použito 60 kg sušené drobně řezané nati, ze které byl připraven sumární ethanolový extrakt. Na základě acidobazických vlastností alkaloidních látek byl přetřepáním získán alkaloidní extrakt, který po přečištění přes sloupec oxidu hlinitého a odpaření rozpouštědla činil 200 g. Tento přečištěný extrakt byl nahrubo rozdělen sloupcovou chromatografií na oxidu hlinitém. Spojená frakce č. 8 s největší hmotností (27 g) a bohatým podílem alkaloidů byla vybrána pro další zpracování za účelem izolace alkaloidních látek. Další sloupcovou a následnou tenkovrstvou chromatografií na silikagelu bylo získáno a strukturní analýzou ověřeno 23 indolových alkaloidů. K dosažení potřebné čistoty pro biologické testy byly látky přečištěny opakovanou tenkovrstvou chromatografií nebo rekrystalizací. Jednotlivé alkaloidy byly identifikovány za využití spektrometrických metod jako MS-EI, HRMS a NMR. Zároveň byla zrevidována, opravena a doplněna nedostatečná NMR spektra pro známé alkaloidy VR-1 (vinkaminorin), VR-5 (16-methoxyminovin), VR-8 (16-methoxyminovincin), VR-17 (raukubainin) a VR-23 (raukubain).

Alkaloidy VR-5, -9, -10, -14, -16, -17–20, -22 a -23 byly z druhu *Vinca minor* L. izolovány poprvé. Alkaloidy 16-methoxyminovin (VR-5) a 5-oxoaspidofraktinin (VR-22) nebyly předtím získány z přírodního zdroje, ale byly připraveny pouze synteticky<sup>432,455</sup>. Alkaloid demethoxyalstonamid (VR-10) byl v minulosti identifikován v *Alstonia macrophylla* Wall. ex G. Don<sup>440</sup>. Aspidospermidin (VR-13) byl izolován z *Tabernaemontana bufalina* Lour<sup>457</sup> a *Rhazya stricta* Decne.<sup>458</sup>, stejně tak jako aspidofraktinin (VR-18) a jeho strukturně odvozená analoga, která jsou k nalezení i v rodě *Kopsia* Blume<sup>279,459</sup>. Rod *Kopsia* Blume je také zdrojem 19-oxoeburnamoninu (VR-14)<sup>279</sup>. Raukubain (VR-16) byl v minulosti získán například z již zmíněné *T. bufalina* Lour<sup>457</sup>, nebo z *Haplophyton crooksii* L. D. Benson<sup>261</sup>. *Rauwolfia salicifolia* Griseb. je zdrojem alkaloidů raukubaininu (VR-17) a raukubainu (VR-23)<sup>449</sup>. Raukubain se také nachází v *Alstonia costata* (G. Forst.) R. Br.<sup>460</sup> Alkaloidní látka 14,15-dihydrovindolinin (VR-20) byla v minulosti identifikována v rodě *Vinca* L., i když z rozdílných druhů jako *V. erecta* Regel et Schmalh. a *V. major* L.<sup>76</sup> Všechny zde zmíněné rody a druhy patří do stejné

čeledi Apocynaceae, která je bohatým zdrojem indolových alkaloidů. Dosud nepopsaný monoterpenový indolový alkaloid VR-9, pojmenován jako vinkaminorudein, byl izolován ve formě světle hnědých krystalů. Bohužel nebyl v dostatečném množství a kvalitě pro X-ray analýzu, a ani nejsou dostupná data cirkulárního dichroismu pro látky s podobnou strukturou.

Všechny izolované alkaloidy byly testovány na jejich inhibiční potenciál vůči *hAChE* a *hBuChE*. Látky, které byly získány v dostatečném množství, byly rovněž podrobeny testu na aktivitu vůči dalším enzymům uplatňujících se v patofyziologii AD (POP, GSK-3 $\beta$ ) (Tab. 5). Žádný z alkaloidů nebyl významně aktivní proti *hAChE* ( $IC_{50} > 100 \mu M$ ), ale některé z nich (VR-2, VR-4, VR-5, VR-11, VR-16 a VR-19) projevily selektivní inhibiční potenciál vůči *hBuChE* ( $IC_{50} < 30 \mu M$ ). Mezi testovanými alkaloidy nejlepší aktivitu proti *hBuChE* vykázal (-)-2-ethyl-3[2-(3-ethylpiperidinyl)-ethyl]-1*H*-indol (VR-19) s hodnotou  $IC_{50} = 650 \text{ nM}$ . Tento relativně strukturně jednoduchý indolový alkaloid byl izolován i z několika dalších rostlin stejné čeledi Apocynaceae, jako *Haplophyton crooksii* L. D. Benson<sup>261</sup>, *Tabernaemontana pachysiphon* Stapf<sup>461</sup>, a *Aspidosperma excelsum* Benth.<sup>462</sup>. Některé z izolačních prací se zároveň zabývaly stanovením inhibice AChE z elektrického úhoře. Jejich výsledek ( $IC_{50} = 203 \mu M$ )<sup>261</sup> je v souladu s výsledkem uvedeným v této disertační práci ( $IC_{50} > 100 \mu M$ , Tab. 5), což ukazuje na velmi slabou inhibici AChE. (+)-2-ethyl-3[2-(3-ethylpiperidinyl)-ethyl]-1*H*-indol byl v minulosti izolován z listů *Rhazya stricta* Decne. (Apocynaceae)<sup>451</sup>, nicméně aktivita tohoto (+)-izomeru nebyla zatím studována. Vzhledem k tomu, že alkaloid VR-19 je v přírodních zdrojích přítomný pouze ve velmi nízké koncentraci, byly studovány možnosti jeho totální syntézy. Ta byla publikována v roce 1995<sup>463</sup>. O pár let později byla popsána výhodnější syntetická cesta vedoucí k enantioselektivní přípravě obou izomerů prostřednictvím alkylace fenylglycinolových bicyklických laktamů<sup>464</sup>.

Z hlediska inhibice POP, alkaloid VR-19 byl v rámci této práce rovněž nejaktivnější. Jeho inhibiční aktivita  $IC_{50} = 58 \mu M$  byla téměř třikrát vyšší v porovnání s berberinem (Tab. 5), známým referenčním standardem pro inhibici POP<sup>465</sup>. Ne všechny izolované látky však byly vůči POP testovány, protože se některé nepodařilo izolovat v dostatečném množství pro všechny studie (prioritou byla inhibice cholinesteras) a celá řada látek měla problém s rozpustností (Tab. 5).

Některé látky bylo možné v rámci mezinárodní spolupráce s Univerzitou v Boloni (prof. Vincenza Andrisano) změřit i vůči inhibici GSK-3 $\beta$ . Látky VR-3 a VR-4 vykázaly slibný inhibiční potenciál (až přes 90 % inhibice při  $c = 50 \mu M$ ). Nejaktivnější látka v rámci inhibice *hBuChE* a POP VR-19 však vykázala při screeningu pouze mírnou inhibiční aktivitu

(31 % inhibice při  $c = 100 \mu\text{M}$ ) (Tab. 6). Stejně jako v případě POP, většina izolovaných alkaloidů měla při testu problém s rozpustností a jejich aktivita nemohla být proto změřena. K řešení tohoto problému by v budoucnu mohla pomoci příprava hydrochloridů problematických látek.

K popsání mechanismu inhibice enzymu *h*BuChE u látky VR-19 byla provedena farmakokinetická studie *in vitro*. Na základě stanovení reakčních křivek a porovnání všech modelů inhibice, bylo zjištěno, že VR-19 působí na *h*BuChE reverzibilním kompetitivním typem inhibice (Obr. 36). Nelineární regresní analýzou byla vypočítána hodnota afinitního parametru  $K_i = 55 \text{ nM}$ .

K určení strukturních aspektů zodpovědných za vysokou inhibiční aktivitu u látky VR-19 byla provedena dockingová studie s krátkou molekulární dynamickou simulací k ověření stability komplexu. Stejně jako známý inhibitor takrin<sup>355</sup>, interaguje VR-19 svým aromatickým jádrem v anionické části aktivního místa *h*BuChE. Látka se rovněž vodíkovou vazbou z dusíku indolové části váže s aminokyselinou katalytické triády. Pozitivně nabitý heterocyklický dusík piperidinového cyklu je důležitý pro interakci s periferní anionickou částí aktivního místa enzymu. Ethylpiperidinová část molekuly svými dalšími hydrofobními interakcemi, podobně jako takrin, dále upevňuje VR-19 v aktivním místě. Tato část by rovněž mohla být místem zájmu pro potenciální strukturní analoga s cílem zvýšení inhibiční aktivity látky VR-19 vůči *h*BuChE.

Aby mohla být látka klinicky využitelná v léčbě Alzheimerovy choroby, musí být mimo jiné schopna přestupu přes HEB a dostat se do mozku. Jednou z nejrychlejších orientačních metod *in silico* je výpočet parametru  $\log\text{BB}$ , ke kterému stačí znát pouze strukturu látky. Podle Tab. 7 by všechny alkaloidy měly bariérou teoreticky procházet, zejména ty s  $\log\text{BB} > 0,3$ <sup>456</sup>. Další z hojně používaných testů penetrace přes HEB je PAMPA, která na umělé membráně měří schopnost pasivní difúze. Narozdíl od  $\log\text{BB}$  se jedná o *in vitro* metodu, jež poskytne spolehlivější informaci. K tomuto testu byla vybrána pouze nejaktivnější látka VR-19. V porovnání s referenčními standardy bylo zjištěno, že tento jednoduchý indolový alkaloid by přes HEB pasivní difúzí mohl přecházet (Tab. 8).

Všechny izolované alkaloidy, které byly získány ve větším množství, byly podrobeny testu na cytotoxicitu na panelu devíti nádorových linií a jedné zdravé linii. Většina látek nevykázala signifikantní toxicitu (Tab. 6) kromě eburnamoninu (VR-3), který téměř úplně zastavil růst leukemických T-lymfocytů Jurkat a významně inhiboval růst buněk akutní lymfoblastické leukémie MOLT-4 a adenokarcinomu prsu HeLa. Cytotoxický účinek vykazoval i proti

nádorovým buňkám A549 (karcinom plic), HT29 (kolorektální adenokarcinom) a HCT116 (kolorektální karcinom) v japonské studii z roku 2014<sup>279</sup>. Další významější cytotoxicitu projevil 16-methoxyminovincin (VR-8), který inhiboval především linii lidské leukémie T-lymfocytů (Jurkat). Další látky, které projevíly mírnou cytotoxicitou proti více buněčným liniím, byly alkaloidy VR-11 (vinkorin) a VR-16 (tubotaiwin) (Tab. 6). Biologicky nejaktivnější látka VR-19 byla netoxická, což může poukazovat na její dobrou snášenlivost. Pro lepší informace o možné toxicitě této látky v případě využití při terapii AD by bylo potřeba udělat další testy, např. na buněčných liniích hepatocytů HepG2, neuroblastomů 5H-SY5Y a *in vivo* studie na myších. V kontrastu s předchozími studiemi, které popsaly cytostatický účinek u alkaloidů vinkaminorinu (VR-1) a vinkaminoreinu (VR-2) na leukemické buňky P388<sup>323</sup>, v našem testu byly tyto alkaloidy neaktivní (vyjma mírné inhibice buňek HeLa u alkaloidu VR-1). Významná a klinicky využívaná protinádorová aktivita je rovněž známá u strukturně podobných, ale dimerních monoterpenových indolových alkaloidů vinblastinu a vinkristinu<sup>466</sup>. Tyto látky bývají označovány jako *Vinca* alkaloidy, i když podle současné systematické botaniky se v rodě *Vinca* L. nevyskytují. Toto označení vzniklo v době, kdy matečná rostlina těchto látek – dnešním názvem *Catharanthus roseus* (L.) G. Don – měla označení *Vinca rosea* L. Název se však v odborné literatuře udržel dodnes a může být zdrojem nejasností.

Izolaci z ostatních frakcí *Vinca minor* L. se věnují kolegové z výzkumné skupiny ADINACO a další výsledky jsou dostupné v souvisejících diplomových pracech. Mgr. Vašíčková vyizolovala z frakce 215–258 striktamin a minovincin, ale i novou látku s mírnou inhibiční aktivitou proti *hBuChE* ( $IC_{50} = 86 \mu M$ )<sup>467</sup>. Mgr. Hojgrová z frakce 215–258 vyizolovala raukubainin a jeden nový alkaloid, který byl ale proti cholinesterasám neaktivní<sup>468</sup>. Mgr. Šípková z frakce 299–318 získala dimerní alkaloid vinkarubin, jež byl vůči cholinesterasám neaktivní, a (–)-vinoxin, který měl významnou selektivní aktivitu proti *hBuChE* ( $IC_{50} = 25 \mu M$ )<sup>469</sup>. Mgr. Pavukové se z frakce 323–327 podařilo získat jednu novou látku, (–)-pikrinin a deacetylakuammilin, ale všechny alkaloidy byly bohužel vůči cholinesterasám i dalším testovaným enzymům (POP, GSK-3 $\beta$ ) neaktivní<sup>470</sup>. Mgr. Vítovcová z frakce 73–110 vyizolovala (+)-vinkaminorin a z frakce 128–146 vinkorin<sup>417</sup>. Mgr. Bouz získal z frakce 128–146 (+)-vinkaminorein a vinkamin, jež ale nebyl vůči cholinesterasám významně aktivní<sup>416</sup>. Mgr. Kučerová vyizolovala z frakce 73–110 vinkaminorein a eburnamonin<sup>418</sup>, Mgr. Marečková z frakce 128–146 (–)-minovin a (+)-minovincin<sup>419</sup>. Mgr. Klátilová získala z frakce 378–389 venoterpin, jež ale byl vůči cholinesterasám neaktivní<sup>471</sup>. Mgr. Valová získala vincin a dvě dosud nepopsané látky, avšak všechny měly nevýznamnou aktivitu proti cholinesterasám a

POP<sup>472</sup>. Mgr. Jurkaninová z frakce 323–327 izolovala (–)-vinoxin a jeho racemát; obě látky byly selektivně aktivní vůči *h*BuChE ( $IC_{50} = 24–28 \mu M$ )<sup>473</sup>.

V závěru lze shrnout, že fytochemická studie nadzemní části rostliny *Vinca minor* L. (Apocynaceae) vedla v rámci této disertační práce k izolaci dvaceti dvou známých indolových monoterpenových alkaloidních struktur a jedné nové dosud nepopsané látky, která byla pojmenována jako vinkaminorudein (VR-9). Biologické testy soustředící se na aktivitu vůči enzymům patofyziologie Alzheimerovy choroby odhalily, že některé ze získaných alkaloidů jsou slibnými inhibitory *h*BuChE, ačkoliv proti *h*AChE nevykazují žádnou signifikantní aktivitu. Nejaktivnější látkou v tomto ohledu byl (–)-2-ethyl-3[2-(3-ethylpiperidinyl)-ethyl]-1*H*-indol (VR-19), jež byl aktivní i proti POP a zároveň nevykazoval žádnou cytotoxicitu aktivitu na panelu deseti různých buněčných linií. U této látky byla predikována schopnost přecházet přes hematoencefalickou bariéru a provedena farmakokinetická studie. Dockingová studie pomohla objasnit, které strukturní aspekty jsou klíčové pro vysokou aktivitu této látky vůči *h*BuChE. Vzhledem k probádaným možnostem syntetické přípravy a uspokoivým výsledkům *in vitro* testů, tento alkaloid představuje potencionálního kandidáta k *in vivo* studiím a strukturovou předlohu pro přípravu možných analog s lepšími vlastnostmi.

## 7 ABSTRAKT

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakognozie a farmaceutické botaniky

Kandidát: **Mgr. Rudolf Vrabec**

Školitel: **prof. RNDr. Lubomír Opletal, CSc.**

Název disertační práce: **Alkaloidy *Vinca minor* L. a jejich biologická aktivita**

Klíčová slova: *Vinca*, indolové alkaloidy, Alzheimerova choroba, AChE, BuChE, POP, GSK-3 $\beta$ , cytotoxicita, dockingová studie

Z nati *Vinca minor* L. (Apocynaceae) bylo chromatografickými metodami vyizolováno 23 monoterpenových indolových alkaloidů různých strukturních typů, které byly identifikovány pomocí kombinace analytických technik (NMR, MS, HRMS, optická otáčivost). Mezi izolovanými látkami se nacházela i dosud nepopsaná alkaloidní struktura, která byla pojmenovaná vinkaminorudein. Celkem 11 alkaloidů bylo v tomto rostlinném druhu identifikováno poprvé. Látky, které byly získány v dostatečném množství, byly podrobeny testům vůči inhibici *h*AChE, *h*BuChE, POP, a GSK-3 $\beta$  – enzymům hrající klíčovou roli v patogenezi Alzheimerovy choroby. Z testovaných alkaloidů byl nejaktivnější (–)-2-ethyl-3[2-(3-ethylpiperidiny)-ethyl]-1*H*-indol (VR-19) s  $IC_{50} = 0,65 \mu M$  pro *h*BuChE, a  $IC_{50} = 58 \mu M$  pro POP. Z dalších alkaloidů významnou inhibici vůči *h*BuChE ( $IC_{50} < 30 \mu M$ ) vykazovaly vinkaminorein, minovin, 16-methoxyminovin, vinkorin a tubotaiwin. Žádný z alkaloidů nebyl významně aktivní vůči *h*AChE. Nejaktivnější alkaloid VR-19 byl podroben farmakokinetické studii, jež odhalila, že se jedná o reverzibilní kompetitivní inhibitor s  $K_i = 55 \text{ nM}$  vůči *h*BuChE. Dockingová studie následně objasnila strukturní aspekty zodpovědné za tuto vysokou inhibiční aktivitu. Podle *in vitro* studie je látka schopná i přestupu přes hematoencefalickou bariéru. U většiny izolovaných alkaloidů byla zhodnocena i cytotoxicita na panelu deseti různých buněčných linií. Kromě eburnamoninu látky nevykazovaly významnou cytotoxicitu.

## 8 ABSTRACT

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacognosy and Pharmaceutical Botany

Candidate: **Mgr. Rudolf Vrabec**

Supervisor: **prof. RNDr. Lubomír Opletal, CSc.**

Title of doctoral thesis: **Alkaloids from *Vinca minor* L. and their biological activity**

Key words: *Vinca*, indole alkaloids, Alzheimer's disease, AChE, BuChE, POP, GSK-3 $\beta$ , cytotoxicity, docking study

Twenty-three monoterpene indole alkaloids of different structural types were isolated by chromatographic techniques from aerial parts of *Vinca minor* L. (Apocynaceae). The alkaloids were identified by a combination of analytical methods (NMR, MS, HRMS, optical rotation). Among obtained compounds, one structure was undescribed so far and was named vincaminorudeine. Eleven alkaloids were isolated for the first time from this species. Obtained compounds that were isolated in sufficient amounts were subjected to *in vitro* tests for the inhibition of *h*AChE, *h*BuChE, POP, and GSK-3 $\beta$  – enzymes that play a key role in the pathophysiology of Alzheimer's disease. The most active alkaloid was (–)-2-ethyl-3[2-(3-ethylpiperidinyl)-ethyl]-1*H*-indole (VR-19) with  $IC_{50} = 0,65 \mu M$  for the inhibition of *h*BuChE, and with  $IC_{50} = 58 \mu M$  for the inhibition of POP. Other alkaloids which exhibited a significant inhibition against *h*BuChE ( $IC_{50} < 30 \mu M$ ) were vincaminoreine, minovine, 16-methoxyminovine, vincorine, and tubotaiwine. None of the isolated alkaloids were active against *h*AChE. The most active alkaloid VR-19 was further studied for its pharmacokinetic, revealing a reversible competitive type of inhibition for *h*BuChE with  $K_i = 55 \text{ nM}$ . A follow-up docking study helped to explain structural aspects responsible for the high activity. This compound can also penetrate the blood-brain barrier by passive diffusion, as was assessed by *in vitro* study. Most of the isolated alkaloids were also tested for the cytotoxicity on ten different cell lines. Except for eburnamonine, none of the alkaloids showed significant inhibition of the growth.



## 9 LITERATURA

1. Newman DJ, Cragg GM. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. *J Nat Prod.* 2016;79(3):629–661. doi:10.1021/acs.jnatprod.5b01055
2. Opletal L. *Přírodní látky a jejich biologická aktivita. Svazek 3, Nutraceutika: sekundární metabolity rostlin.* Vydání první ed. Nutraceutika. Univerzita Karlova, Karolinum; 2016.
3. Wang S, Dong G, Sheng C. Structural Simplification of Natural Products. *Chem Rev.* 2019;119(6):4180–4220. doi:10.1021/acs.chemrev.8b00504
4. Konrath EL, Passos CD, Klein LC, Henriques AT. Alkaloids as a source of potential anticholinesterase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease. *J Pharm Pharmacol.* 2013;65(12):1701–1725. doi:10.1111/jphp.12090
5. Spilková J, Martin J, Siatka T, Tůmová L, Kašparová M. *Farmakognozie.* 1. vydání. Univerzita Karlova, Karolinum; 2016.
6. WHO. Dementia. 2021. Přístupné 5.1.2022. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dementia>
7. Association As. 2020 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's & Dementia.* 2020;16(3):391–460. doi:10.1002/alz.12068
8. Prince M, Comas-Herrera A, Knapp M, Mačlenn G, Karagiannidou M. *World Alzheimer Report 2016: Improving healthcare for people living with dementia: Coverage, quality and costs now and in the future.* 2016. Přístupné 29.12.2021. <https://www.alzint.org/u/WorldAlzheimerReport2016.pdf>
9. FDA. FDA's Decision to Approve New Treatment for Alzheimer's Disease. 2022. Přístupné 20.1.2022. <https://www.fda.gov/drugs/news-events-human-drugs/fdas-decision-approve-new-treatment-alzheimers-disease>
10. Lalli G, Schott JM, Hardy J, De Strooper B. Aducanumab: a new phase in therapeutic development for Alzheimer's disease? *EMBO Mol Med.* 2021;13(8):e14781. doi:10.15252/emmm.202114781
11. Sevigny J, Chiao P, Bussière T, et al. The antibody aducanumab reduces A $\beta$  plaques in Alzheimer's disease. *Nature.* 2016;537(7618):50–56. doi:10.1038/nature19323
12. Mahase E. Three FDA advisory panel members resign over approval of Alzheimer's drug. *BMJ.* 2021;373:n1503. doi:10.1136/bmj.n1503
13. Prokopová I. Farmakoterapie Alzheimerovy demence a přidružených neuropsychiatrických symptomů – 1. část. *Psychiatr praxi.* 2018;19(1):7–10.
14. Martin J, Krsková Z, Dušek J, Huperzin A a jiné přírodní látky v léčbě Alzheimerovy choroby. *Prakt lékáren.* 2011;7(1):39–41.
15. ClinicalTrials.gov. Study of Huperzine A Sustained-Release Tablets in Patients With Alzheimer's Disease. 2011. Přístupné 10.2.2022. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01282619>
16. Leonard J. Recent progress in the chemistry of monoterpenoid indole alkaloids derived from secologanin. *Nat Prod Rep.* 1999;16(3):319–338. doi:10.1039/a707500f
17. Zenk MH, Juenger M. Evolution and current status of the phytochemistry of nitrogenous compounds. *Phytochemistry.* 2007;68(22–24):2757–2772. doi:10.1016/j.phytochem.2007.07.009
18. Feng T, Li Y, Liu YP, Cai XH, Wang YY, Luo XD. Melotenine A, a Cytotoxic Monoterpenoid Indole Alkaloid from *Melodinus tenuicaudatus*. *Org Lett.* 2010;12(5):968–971. doi:10.1021/ol1000022
19. Feng T, Li Y, Cai XH, et al. Monoterpenoid Indole Alkaloids from *Alstonia yunnanensis*. *J Nat Prod.* 2009;72(10):1836–1841. doi:10.1021/np900374s
20. Cao XF, Wang JS, Wang XB, Luo J, Wang HY, Kong LY. Monoterpene indole alkaloids from the stem bark of *Mitragyna diversifolia* and their acetylcholine esterase inhibitory effects. *Phytochemistry.* 2013;96:389–396. doi:10.1016/j.phytochem.2013.10.002
21. Çelemlı ÖG. Insight into palynological characteristics of *Vinca* species in Turkey and their taxonomic relationship. *Palynology.* 2022;46(1):1–11. doi:10.1080/01916122.2021.1970041
22. Khanavi M, Pourmoslemi S, Farahanikia B, Hadjiakhoondi A, Ostad SN. Cytotoxicity of *Vinca minor*. *Pharm Biol.* 2010;48(1):96–100. doi:10.3109/13880200903046187
23. Vas A, Gulyas B. Eburnamine derivatives and the brain. *Med Res Rev.* 2005;25(6):737–757. doi:10.1002/med.20043
24. Abouzeid S, Beutling U, Surup F, et al. Treatment of *Vinca minor* Leaves with Methyl Jasmonate Extensively Alters the Pattern and Composition of Indole Alkaloids. *J Nat Prod.* 2017;80(11):2905–2909. doi:10.1021/acs.jnatprod.7b00424
25. Bahadori F, Topçu G, Boğa M, Türkekul A, Kolak U, Kartal M. Indole Alkaloids from *Vinca major* and *V. minor* Growing in Turkey. *Nat Prod Commun.* 2012;7(6):731–734. doi:10.1177/1934578x1200700610
26. SÚKL. CAVINTON – Sourhn údajů o přípravku (SPC). Přístupné 22.1.2022. <https://www.sukl.cz/modules/medication/download.php?file=SPC97124.doc&type=spc&as=cavinton-spc>
27. Al-Rashed S, Baker A, Ahmad SS, et al. Vincamine, a safe natural alkaloid, represents a novel anticancer agent. *Bioorg Chem.* 2021;107:104626. doi:10.1016/j.bioorg.2021.104626
28. ADINACO. ADINACO Research Group. Přístupné 22.1.2022. <https://portal.faf.cuni.cz/Groups/ADINACO/>
29. Blamey M, Grey-Wilson C. *Flora of Britain and Northern Europe.* Hodder and Stoughton; 1989.

30. Jahodář L. *Farmakobotanika – Semenné rostliny*. 3. vydání. Univerzita Karlova, Karolinum; 2011.
31. Jahodář L. *Rostliny způsobující otravy*. Univerzita Karlova, Karolinum; 2018.
32. Klinkenberg B. E-Flora BC: Electronic Atlas of the Plants of British Columbia [eflora.bc.ca]. Přístupné 17.2.2022. <https://linnet.geog.ubc.ca/Atlas/Atlas.aspx?sciname=Vinca%20major>
33. Arora R. *Medicinal plant biotechnology*. CAB International; 2010.
34. Kovář L. *Vinca major* L. – barvínek větší / zimozelen väčšia. Přístupné 17.2.2022. <https://botany.cz/cs/vinca-major/>
35. Invasive-Species. *Vinca major*, Bigleaf Periwinkle. USDA National Institute of Food and Agriculture. Přístupné 17.2.2022. <https://invasive-species.extension.org/vinca-major-bigleaf-periwinkle/>
36. Farnsworth NR. The phytochemistry of *Vinca* species. V: Taylor WI, Farnsworth NR, editoři. *The Vinca Alkaloids*. Marcel Dekker; 1973:95–147.
37. Csiky J, Purger D. Herbaceous periwinkle, *Vinca herbacea* Waldst. et Kit. 1799 (Apocynaceae), a new species of the Croatian flora. *Acta Bot Croat*. 2013;72(2):399–406. doi:10.2478/botcro-2013-0001
38. Bussmann RW, Batsatsashvili K, Kikvidze Z. *Vinca erecta* Regel & Schmalhausen Apocynaceae. V: Batsatsashvili K, Kikvidze Z, Bussmann RW, editoři. *Ethnobotany of the Mountain Regions of Central Asia and Altai*. Springer International Publishing; 2020:1–4.
39. RHS. *Vinca difformis*. The Royal Horticultural Society. Přístupné 1.18.2022. <https://www.rhs.org.uk/plants/23728/vinca-difformis/details>
40. Koyuncu M. A new species of *Vinca* (Apocynaceae) from eastern Anatolia, Turkey. *Turk J Bot*. 2012;36(3):247–251. doi:10.3906/bot-1103-19
41. World Flora Online. Přístupné 1.18.2022. <http://www.worldfloraonline.org/>
42. POWO. Plants of the World Online. Royal Botanic Gardens, Kew. Přístupné 13.4.2022. <https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:77119119-1>
43. Koyuncu M, Ekşi G, Özkan AMG. *Vinca ispartensis* (Apocynaceae), a New Species from Turkey. *Ann Bot Fenn*. 2015;52(5-6):340–344. doi:10.5735/085.052.0511
44. Verzar-Petri G, Szarvas T, Varadi J. Incorporation of tryptophan-2-14C in *Vinca minor* alkaloids. *Ann Univ Sci Budapest Rolando Eotvos Nominatae, Sect Biol*. 1970;12:89–95.
45. Sottomayor M, Barceló AR. The *Vinca* Alkaloids: From Biosynthesis and Accumulation in Plant Cells, to Uptake, Activity and Metabolism in Animal Cells. V: Atta-ur-Rahman, editor. *Studies in Natural Products Chemistry*. Elsevier; 2006:813–857.
46. Nagy M, Grančai D, Mučaji P. *Farmakognózia. Biogenéza prírodných látok*. Vydavateľstvo Osveta; 2011.
47. Malikov VM, Yunusov SY. *Vinca* alkaloids. *Chem Nat Compd*. 1977;13(5):497–512. doi:10.1007/BF00569574
48. Abouzeid S, Hijazin T, Lewerenz L, Haensch R, Selmar D. The genuine localization of indole alkaloids in *Vinca minor* and *Catharanthus roseus*. *Phytochemistry*. 2019;168:112110. doi:10.1016/j.phytochem.2019.112110
49. Demessie Z, Woolfson KN, Yu F, Qu Y, De Luca V. The ATP binding cassette transporter, VmTPT2/VmABCG1, is involved in export of the monoterpenoid indole alkaloid, vincamine in *Vinca minor* leaves. *Phytochemistry*. 2017;140:118–124. doi:10.1016/j.phytochem.2017.04.019
50. Maříková J. *NMR spektroskopie ve strukturní analýze izolovaných alkaloidů. Disertační práce*. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta; 2021. Přístupné 12.4.2022. <http://hdl.handle.net/20.500.11956/125367>
51. Adams GL, Smith AB. Chapter Three - The Chemistry of the Akuammiline Alkaloids. V: Knölker H-J, editor. *The Alkaloids: Chemistry and Biology*. Academic Press; 2016:171–257.
52. Tulyaganov TS, Nigmatullaev AM. Alkaloids of *Vinca minor*. *Chem Nat Compd*. 2001;36(5):540.
53. Vachnadze VY, Mudzhiri KS. Chromatographic isolation and analysis of indole alkaloids. *Khromatogr Metody Farm*. 1977:156–159.
54. Mokřý J, Dubravková L, Šefcovič P. Alkaloids from *Vinca minor*. Vincadine, minovine, and vincorine. *Experientia*. 1962;18:564–565.
55. Proksa B, Uhrin D, Grossmann E, Votický Z. (–)-1-Norvincorine, a new alkaloid from *Vinca minor*. *Planta Med*. 1987;53(1):120. doi:10.1055/s-2006-962650
56. Kompíš I, Mokřý J. Alkaloids from *Vinca minor*. XXI. Structure of vincaminoridine and vincoridine. *Collect Czech Chem Commun*. 1968;33(12):4328–4336. doi:10.1135/cccc19684328
57. Mokřý J, Kompíš I. Vincaminoridine and vincoridine, two new alkaloids from *Vinca minor*. *Naturwissenschaften*. 1963;50:93–94. doi:10.1007/bf00590810
58. Tan PW, Seayad J, Dixon DJ. Expedient and Divergent Total Syntheses of Aspidosperma Alkaloids Exploiting Iridium(I)-Catalyzed Generation of Reactive Enamine Intermediates. *Angew Chem Int Ed*. 2016;55(43):13436–13440. doi:10.1002/anie.201605503
59. Proksa B, Uhrin D, Grossmann E, Votický Z, Fуска J. Relative configuration and cytotoxic activity of vincarubine: a novel bisindole alkaloid from *Vinca minor*. *Planta Med*. 1988;54(3):214–218. doi:10.1055/s-2006-962407
60. Votický Z, Dolejš L, Grossmann E. Alkaloids from *Vinca minor* L. XXVI. *N*<sub>1</sub>-Methyl-2β,16β-dihydroakuammicine-*N*<sub>4</sub>-methochloride and epipleiocarpamine *N*<sub>4</sub>-oxide, two new alkaloids from *Vinca minor* L. *Collect Czech Chem Commun*. 1979;44(1):123–127. doi:10.1135/cccc19790123

61. Garnier J, Mahuteau J, Plat M, Merienne C. The complete assignment of the <sup>13</sup>C and <sup>1</sup>H NMR spectra of jadiffine. *Phytochemistry*. 1989;28(1):308–309. doi:10.1016/0031-9422(89)85073-3
62. Garnier J, Mahuteau J. Determination of the structure of difforlemenine, a new alkaloid from *Vinca difformis* Pourr., using 400 MHz proton NMR. *Tetrahedron Lett.* 1985;26(12):1513–1514. doi:10.1016/s0040-4039(00)98539-3
63. Zabolotnaya ES, Bukreeva EV, Lazur'evskii TV. *Vinca herbacea* alkaloids. *Khim-Farm Zh.* 1969;3(1):32–34.
64. Zhang Z-J, Du R-N, He J, et al. Vinmajorines C-E, monoterpene indole alkaloids from *Vinca major*. *Helv Chim Acta.* 2016;99(2):157–160. doi:10.1002/hlca.201500211
65. Wei X, Khan A, Song D, et al. Three New Pyridine Alkaloids from *Vinca major* Cultivated in Pakistan. *Nat Prod Bioprospect.* 2017;7(4):323–327. doi:10.1007/s13659-017-0137-7
66. Sohretoglu D, Masullo M, Piacente S, Kirmizibekmez H. Iridoids, monoterpene glucoindole alkaloids and flavonoids from *Vinca major*. *Biochem Syst Ecol.* 2013;49:69–72. doi:10.1016/j.bse.2013.03.028
67. Robakidze ZV, Mudzhiri MM, Vachnadze VY, Mudzhiri KS. Alkaloids from *Vinca minor* cultivated in the Georgian SSR. *Khim Prir Soedin.* 1980;(5):735–736.
68. Kikalishvili BY, Zurabashvili DZ, Turabelidze DG, Sulakvelidze TP, Vachnadze NS, Malaniya MA. Fatty-Acid Composition in Oil of *Vinca minor* and *V. herbacea* Growing in Georgia. *Chem Nat Compd.* 2014;49(6):1117–1118. doi:10.1007/s10600-014-0833-z
69. Ciorîță A, Zăgrean-Tuza C, Moț AC, Carpa R, Pârnu M. The Phytochemical Analysis of *Vinca* L. Species Leaf Extracts Is Correlated with the Antioxidant, Antibacterial, and Antitumor Effects. *Molecules.* 2021;26(10):3040. doi:10.3390/molecules26103040
70. Molchan OV, Fatykhava SA, Shabunya PS, Yurin VM. Determination of vincamine and ajmalicine contents in introduced in belarus *Vinca minor* plants by HPLC-MS. *Khim Rastit Syr'ya.* 2015;3:135–141. doi:10.14258/jcprm.201503760
71. Cheng G-G, Zhao Y-L, Zhang Y, et al. Indole alkaloids from cultivated *Vinca major*. *Tetrahedron.* 2014;70(45):8723–8729. doi:10.1016/j.tet.2014.09.026
72. Il'yashenko LI, Malikov VM, Yagudaev MR, Yunusov SY. Alkaloids of *Vinca major*. *Chem Nat Compd.* 1977;13(3):324–327. doi:10.1007/BF00573553
73. Aynilian GH, Bell CL, Farnsworth NR, Abraham DJ. Alkaloids of *Vinca* species. IV. NMR studies of herbamine and vincamajine. Corrected structure of herbamine, an alkaloid isolated from *Vinca libanotica*. *Lloydia.* 1974;37(4):589–592.
74. Chkhikvadze GV, Vachnadze VY. d,l-Vincadifformine, 11-methoxyvincadifformine, and ervine from the herb *Vinca herbacea*. *Chem Nat Compd.* 1986;22(3):363–363. doi:10.1007/BF00598334
75. Malikov VM, Yuldashev PK, Yunusov SY. The structure of Ervine. *Chem Nat Compd.* 1966;2(5):276–278. doi:10.1007/BF00566990
76. Abdurakhimova N, Yuldashev PK, Yunusov SY. The structure of majdine, pseudokopsinine, and vinervinine. *Chem Nat Compd.* 1967;3(5):263–266. doi:10.1007/BF00574630
77. Gasic O, Djurkovic R, Popovic N, Pyuskyulev B, Kirilova T. Alkaloids in *Vinca herbacea* W. K. collected at the site of Deliblato Sands. Part II. *Zb Prir Nauke.* 1984;67:93–99.
78. Chkhikvadze GV, Vachnadze VY, Mudzhiri KS. Herbaceine, herbaine, and vincamajine from the aboveground organs of *Vinca herbacea*. *Khim Prir Soedin.* 1980;(6):850–851.
79. Ognyanov I, Pyuskyulev B. Structure of the alkaloid herbaceine from *Vinca herbacea*. *Chem Ber.* 1966;99(3):1008–1014.
80. Ognyanov I, Pyuskyulev B. Alkaloids from *Vinca herbacea*. *Izv Otd Khim Nauki, Bulg Akad Nauk.* 1968;1(4):5–16.
81. Zabolotnaya ES, Bukreeva EV. Alkaloids of *Vinca herbacea*. *Zh Obshch Khim.* 1963;33(11):3780–3781.
82. Mollov N, Mokri I, Ognyanov I, Dalev P. Alkaloids from *Vinca herbacea* W.K.II. Herbacein-a new *Vinca* alkaloid. *Dokl Bolg Akad Nauk.* 1961;13(1):43–46.
83. Clauder O, Mathe I, Bojthe Horvath K, Gesztes ML, Kocsis A. Alkaloids of *Vinca herbacea*. *Herba Hung.* 1969;8(1–2):29–34.
84. Ognyanov I, Pyuskyulev B, Bozjanov B, Hesse M. Alkaloids from *Vinca herbacea*. VIII. Isolation and structure of hervine. *Helv Chim Acta.* 1967;50(3):754–758.
85. Dzhakeli EZ. Carboxyhydroxyindole alkaloids from *Vinca herbacea* W.K. *Tezisy Dokl - Sov-Indiiskii Simp Khim Prir Soedin, 5th.* 1978:25.
86. Dzhakeli EZ. Isoreserpinine from *Vinca herbacea*. *Chem Nat Compd.* 1978;14(3):362–362. doi:10.1007/BF00713359
87. Robakidze ZV. Determination of pharmacologically active alkaloids of *Vinca minor* cultivated in Georgia. *Sakartvelos Mecnierebata Akad Macne, Kimiis Ser.* 2003;29(1–2):30–34.
88. Balsevich J, Constabel F, Kurz GW. Alkaloids of *Vinca major* cv. *Variegata*. *Planta Med.* 1982;44(2):91–93. doi:10.1055/s-2007-971409

89. Plat M, Lemay R, Men JL, Janot MM, Djerassi C, Budzikiewicz H. Periwinkle alkaloids. XXXII. New alkaloids of *Vinca major*. *Bull Soc Chim Fr*. 1965;(9):2497–2501.
90. Banerji A, Chakrabarty M. Lochvinerine, a new indole alkaloid of *Vinca major*. *Phytochemistry*. 1974;13(10):2309–2312. doi:10.1016/0031-9422(74)85045-4
91. Sadykov YD, Khodzimatov M, Degtyarev VA. Alkaloids of *Vinca major* L. *Dokl Akad Nauk Tadzh SSR*. 1985;28(5):289–292.
92. Janot MM, Le Men J. Vincamajoreine: third crystalline alkaloid from *Vinca major*. *Ann Pharm Fr*. 1955;13:325–328.
93. Trojánek J, Hodková J. Alkaloids. V. Isolation of vincamedine from *Vinca major*. *Collect Czech Chem Commun*. 1962;27:2981–2985. doi:10.1135/cccc19622981
94. Janot MM, Le Men J. Alkaloids of the greater periwinkle (*Vinca major* L.). The presence of reserpinine or 11-methoxy- $\delta$ -yohimbine. *C R Hebd Seances Acad Sci*. 1954;238(26):2550–2552.
95. Aynilian GH, Farnsworth NR, Trojánek J. Alkaloids of *Vinca* species. III. Isolation and characterization of indole alkaloids from *Vinca libanotica*. *Lloydia*. 1974;37(2):299–308.
96. Ognyanov I, Dalev P, Dutschevska H, Mollov N. New alkaloids from *Vinca herbacea*. *Dokl Bolg Akad Nauk*. 1964;17(2):153–156.
97. Yuldashev PK, Yunusov SY. Vincarine, a new alkaloid from roots of *Vinca erecta*. *Dokl Akad Nauk SSSR*. 1964;154(6):1412–1413.
98. Liu J, Liu Y, Pan Y-j, Zu Y-G, Tang Z-H. Determination of Alkaloids in *Catharanthus roseus* and *Vinca minor* by High-Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Anal Lett*. 2016;49(8):1143–1153. doi:10.1080/00032719.2015.1094664
99. Chen Q, Lu X, Guo X, Guo Q, Li D. Metabolomics characterization of two Apocynaceae plants, *Catharanthus roseus* and *Vinca minor*, using GC-MS and LC-MS methods in combination. *Molecules*. 2017;22(6):997. doi:10.3390/molecules22060997
100. Atta Ur R, Sultana A, Nighat F, Bhatti MK, Kurucu S, Kartal M. Alkaloids from *Vinca major*. *Phytochemistry*. 1995;38(4):1057–1061. doi:10.1016/0031-9422(94)00638-a
101. Boga M, Kolak U, Topcu G, Bahadori F, Kartal M, Farnsworth NR. Two new indole alkaloids from *Vinca herbacea* L. *Phytochem Lett*. 2011;4(4):399–403. doi:10.1016/j.phytol.2011.07.008
102. Zhang Z-J, Du R-N, He J, et al. Three new monoterpene indole alkaloids from *Vinca major*. *J Asian Nat Prod Res*. 2016;18(4):328–333. doi:10.1080/10286020.2015.1094463
103. Aynilian GH, Bell CL, Farnsworth NR. Alkaloids of *Vinca* species. V. Structure elucidation of herbadine, an alkaloid isolated from *Vinca libanotica*. *J Pharm Sci*. 1975;64(2):341–342. doi:10.1002/jps.2600640236
104. Chkhikvadze GV. Method for the quantitative determination of vincarine, herbadine, and herbamine in the herbage of *Vinca herbacea*. *Chem Nat Compd*. 1986;22(1):117–118. doi:10.1007/BF00574608
105. Vachnadze VY, Malikov VM, Mudzhiri KS, Yunusov SY. The structure of herbadine and herbamine. *Chem Nat Compd*. 1972;8(3):334–336. doi:10.1007/BF00563743
106. Kaul JL, Trojánek J. Alkaloids. XVI. Isolation and characterization of some new alkaloids from *Vinca major*. *Lloydia*. 1966;29(1):26–34.
107. Kaul JL, Trojánek J, Bose AK. Structure of majoridine, an alkaloid from *Vinca major*. *Chem Ind*. 1966;(21):853–854.
108. Singh S, Kanwar SS. Antilipase activity guided fractionation of *Vinca major*. *J King Saud Univ Sci*. 2018;30(4):433–439. doi:10.1016/j.jksus.2017.03.005
109. Zhukovich EN. Alkaloids of the roots of *Vinca major* introduced into Georgia. *Chem Nat Compd*. 1987;23(4):515–516. doi:10.1007/BF00597827
110. Zhukovich EN, Vachnadze VY. Alkaloids from *Vinca major* introduced in Georgia [USSR]. *Khim Prir Soedin*. 1984;(4):533–534.
111. Janot MM, Le Men J. Vincamajine, the fourth alkaloid crystallized from the large periwinkle. (*Vinca major* Apocynaceae). *Compt rend*. 1955;241:767–770.
112. Gosset J, Le Men J, Janot MM. Periwinkle alkaloids. XX. Isolation of akuammidine and of a new alkaloid vincadiformine from the leaves of *Vinca difformis*. *Ann Pharm Fr*. 1962;20:448.
113. Zhukovich E, Vachnadze V. Vincamajinine – A new alkaloid from *Vinca major*. *Chem Nat Compd*. 1985;21:682–682. doi:10.1007/BF00579093
114. Zhang Z-J, Yang J, He J, et al. Vincamajorines A and B, monoterpene indole alkaloids with new carbon skeletons from *Vinca major*. *Tetrahedron Lett*. 2014;55(47):6490–6494. doi:10.1016/j.tetlet.2014.10.011
115. Janot MM, Le Men J, Hammouda Y. Vincamedine, a (new) alkaloid crystallized from *Vinca difformis*. *Compt rend*. 1956;243:85.
116. Janot MM, Le Men J, Fan C. Alkaloids of *Vinca difformis*. II. Presence of sarpagine and an isomer of vincamine. *Ann Pharm Fr*. 1957;15:513.
117. Vachnadze VY, Malikov VM, Mudzhiri KS, Yunusov SY. Vincarine and tabersonine from periwinkle, *Vinca herbacea* growing in Georgia. *Soobshch Akad Nauk Gruz SSR*. 1972;66(1):97–99.

118. Kuchenková MA, Yuldashev PK, Yunusov SY. Alkaloids of *Vinca erecta*. *Dokl Akad Nauk UzSSR*. 1964;21(11):42–45.
119. Meisel H, Doepke W, Gruendemann E. Structure and stereochemistry of vinorine. *Tetrahedron Lett*. 1971;(17):1291–1293.
120. Yagudaev MR, Khalmirzaev MM, Yunusov SY. NMR study of alkaloids. V. <sup>13</sup>C NMR spectra and reconsideration of the structures of 11- and 10-hydroxypleiocarpamines and the structures of new alkaloids from *Vinca erecta*. *Chem Nat Compd*. 1983;19(4):454–458. doi:10.1007/BF00575706
121. Savaskan S, Kompiš I, Hesse M, Schmid H. Alkaloids. 146. Demonstration of deacetyluammiline and 10-methoxydeacetyluammiline in *Vinca minor*. *Helv Chim Acta*. 1972;55(8):2861–2867.
122. Trojánek J, Kobicová Z, McCurry PM, Jr., Dadok J, Pijewska L. On alkaloids. XXXIV. 10-Methoxyvincamidine, a new alkaloid from lesser periwinkle (*Vinca minor* L.). *Acta Univ Palacki Olomuc, Fac Med*. 1980;93:111–118.
123. Il'yasova KT, Malikov VM, Yunusov SY. 11-Hydroxypleiocarpamine – A new alkaloid from *Vinca erecta*. *Chem Nat Compd*. 1970;6(6):728–729. doi:10.1007/BF00565344
124. Uhrin D, Proksa B. Conformational analysis of 4-methylraucubainium and 4-methylstrictaminium chlorides. *J Nat Prod*. 1989;52(3):637–639. doi:10.1021/np50063a027
125. Proksa B, Uhrin D, Grossmann E, Votický Z. New quaternary alkaloids from *Vinca minor*. *Planta Med*. 1989;55(2):188–190. doi:10.1055/s-2006-961921
126. Rakhimov DA, Malikov VM, Yunusov SY. Isolation of kopsinilam and ervincine. *Chem Nat Compd*. 1967;3(5):300–301. doi:10.1007/BF00574649
127. Zhukovich EN, Kikoladze VS, Tskitishvili NZ, Tsitsishvili VG, Vachnadze VY. Alkaloids of *Vinca major* introduced in [Soviet] Georgia. *Khim Prir Soedin*. 1989;(3):434–435.
128. Zhukovich EN, Kikoladze VS, Tskitishvili NZ, Tsitsishvili VG, Vachnadze VY. Alkaloids of *Vinca major* introduced into Georgia. *Chem Nat Compd*. 1989;25(3):378–379. doi:10.1007/BF00597732
129. Grossmann E, Šefčovič P, Szasz K. Picrinine in *Vinca minor*. *Phytochemistry*. 1973;12(8):2058. doi:10.1016/s0031-9422(00)91538-3
130. Proksa B, Grossmann E. High performance liquid chromatographic determination of alkaloids from *Vinca minor* L. *Phytochem Anal*. 1991;2(2):74–76. doi:10.1002/pca.2800020206
131. Janot MM, Le Men J, Aghoramurthy K, Robinson R. The identity of vincamajoridine and akuammine. *Experientia*. 1955;11:343. doi:10.1007/BF02159911
132. Asatinani VS, Mudzhiri MM, Mudzhiri KS. Acuammine and norfluorocurarine from periwinkle, *Vinca herbaceae*, growing in Georgia. *Soobshch Akad Nauk Gruz SSR*. 1971;64(2):341–343.
133. Mudzhiri MM, Vachnadze VY, Mudzhiri KS. Spectrophotometric determination of the alkaloid akuammine in the periwinkle, *Vinca herbacea*. *Soobshch Akad Nauk Gruz SSR*. 1972;67(2):353–355.
134. Kasymov SZ, Yuldashev PK, Yunusov SY. The structure of vinerine and vineridine. *Chem Nat Compd*. 1966;2(4):210–213. doi:10.1007/BF00564092
135. Mokry J, Kompiš I, Spitteller G. Alkaloids from *Vinca minor*. Further minor alkaloids. *Collect Czech Chem Commun*. 1967;32(7):2523–2531. doi:10.1135/ccecc19672523
136. Čekan Z. The alkaloids of the small periwinkle *Vinca minor*. *Izuch i Ispol'z Lekarstv Rastit Resursov SSSR*. 1964:296–298.
137. Čekan Z, Trojánek J, Štrouf O, Kavková K. New studies on myrtle (*Vinca minor*). *Pharm Acta Helv*. 1960;35:96–100.
138. Trojánek J, Štrouf O, Kavková K, Čekan Z. On alkaloids. III. New alkaloids of *Vinca minor*. *Collect Czech Chem Commun*. 1960;25:2045–2048.
139. Il'yasova KT, Malikov VM, Yunusov SY. The structure of vincaricine. *Chem Nat Compd*. 1968;4(5):278. doi:10.1007/BF00568553
140. Rakhimov DA, Il'yasova KT, Malikov VM, Yunusov SY. Structure of vincaridine and vincaricine. *Chem Nat Compd*. 1969;5(6):440–443. doi:10.1007/BF00568586
141. Kuchenková MA, Yuldashev PK, Yunusov SY. Structure of vincaridine. *Khim Prir Soedin*. 1967;3(1):65.
142. Il'yasova KT, Malikov VM, Yunusov SY. The structure of vincarinine. *Chem Nat Compd*. 1971;7(2):155–156. doi:10.1007/BF00568687
143. Sharipov MR, Khalmirzaev M, Malikov VM, Yunusov S. Alkaloids of *Vinca erecta*. *Chem Nat Compd*. 1976;12:355–356. doi:10.1007/BF00567831
144. Sharipov MR, Malikov VM, Yunusov SY. Isolation of 6,7-dehydro-8-oxokopsinine, vincanine N-oxide, and venalstonine from *Vinca erecta*. *Chem Nat Compd*. 1974;10(2):281–281. doi:10.1007/BF00563654
145. Rakhimov DA, Sharipov MR, Aripov KN, Malikov VM, Shakirov TT, Yunusov SY. The polybuffer separation of the alkaloids of *Vinca erecta*. *Chem Nat Compd*. 1970;6(6):724–727. doi:10.1007/BF00565343
146. Vachnadze V, Vachnadze N, Gogitidze N, Mushkiashvili N, McHedlidze K. Biologically Active Alkaloids from Rhizomes with Roots of *Vinca Herbacea* Waldst. et Kit, Growing in Georgia. *Georgian Med News*. 2017;(271):122–127.

147. Abdurakhimova N, Yuldashev PK, Yunusov SY. Pseudokopsinine--a new alkaloid from aerial parts of *Vinca erecta*. *Dokl Akad Nauk UzSSR*. 1964;21(2):29–31.
148. Kasymov SZ, Yuldashev PK, Yunusov SY. Alkaloids of upper parts of *Vinca erecta*. *Dokl Akad Nauk SSSR*. 1965;162(1):102–103.
149. Sharipov MR, Khalmirzaev M, Malikov VM, Yunusov SY. Isolation of *O*-benzoyltombosine and the *N*-oxides of kopsinine and pseudokopsinine. *Chem Nat Compd*. 1974;10(3):422–423. doi:10.1007/BF00563925
150. Khalmirzaev MM, Malikov VM, Yunusov SY. Isolation of pseudokopsinine methochloride and of minovincinine from *Vinca erecta*. *Chem Nat Compd*. 1975;11(2):277–277. doi:10.1007/BF00570701
151. Plat M, Tellion E, Le Men J, Janot MM. Periwinkle alkaloids. XXV. Four new alkaloids of *Vinca minor*: minovincine, methoxyminovincine, minovincinine, and (–)-vincadifformine. *Ann Pharm Fr*. 1962;20:899–906.
152. Plat M, Le Men J, Janot MM, et al. Periwinkles alkaloids. XXVI. Application of mass spectrography to the determination of structure and stereochemistry. 17. Structure of four alkaloids of *Vinca minor*: (–)-vincadifformine, minovincine, minovincinine, and 16 methoxy-minovincine. *Bull Soc Chim Fr*. 1962:2237–2241.
153. Zachystalová D, Štrouf O, Trojánek J. New alkaloids of *Vinca minor*. *Chem Ind*. 1963:610–611.
154. Doepke W, Meisel H, Spitteller G. Alkaloids from *Vinca minor*. *Tetrahedron Lett*. 1968;(58):6065–6066. doi:10.1016/s0040-4039(00)70795-7
155. Pyuskyulev B, Kompiš I, Ognyanov I, Spitteller G. Further studies on alkaloids from *Vinca herbacea*. *Collect Czech Chem Commun*. 1967;32(3):1289–1294. doi:10.1135/ccccc19671289
156. Rakhimov DA, Malikov VM, Yagudaev MR, Yunusov SY. Structures of ervinceine, ervamicine, and ervincinine. *Chem Nat Compd*. 1970;6(2):221–224. doi:10.1007/BF00941687
157. Rakhimov DA, Malikov VM, Yunusov SY. Structure of ervamycin. *Khim Prir Soedin*. 1969;5(4):332–333.
158. Forschag, Forschungs- und Chemie A.-G., zmocněnec. Vincamine-containing sedative and vasoregulator. Žádost č.: FR1970-38892. Patent č.: FR2108993. 1972.
159. Doepke W, Meisel H. 16-Methoxyvincadifformine, a new alkaloid from *Vinca minor*. *Pharmazie*. 1968;23(9):521–522.
160. Rakhimov DA, Malikov VM, Yunusov SY. The structure of ervinceine. *Chem Nat Compd*. 1969;5(4):280–281. doi:10.1007/BF00683869
161. Rakhimov DA, Malikov VM, Yunusov SY. The structure of ervincinine. *Chem Nat Compd*. 1968;4(5):281–282. doi:10.1007/BF00568557
162. Malikov VM, Yunusov SY. Isolation of ervinidine and ervinidinine from *Vinca erecta*. *Chem Nat Compd*. 1967;3(2):119–120. doi:10.1007/BF00567187
163. Farahanikia B, Akbarzadeh T, Jahangirzadeh A, et al. Phytochemical investigation of *Vinca minor* cultivated in Iran. *Iran J Pharm Res*. 2011;10(4):777–785.
164. Mokřý H, Kompiš I, Dubravková L, Šefcovič P. Vincadifformine and minovine, 2 additional racemic alkaloids from *Vinca minor* L. *Experientia*. 1963;19:311.
165. Jusiak L. Separation of *Vinca minor* alkaloids by countercurrent extraction. *Acta Pol Pharm*. 1969;26(3):247–254.
166. Šefcovič P, vynálezce; Isolation of the alkaloid minovincine from *Vinca minor*. Žádost č.: CS1973-5345. Patent č.: CS172538. 1977.
167. Doepke W, Meisel H. Stereochemistry of a new alkaloid from *Vinca minor*. *Tetrahedron Lett*. 1970;(10):749–751.
168. Babaev NA, Aliev AM, Malikov VM. An investigation of the alkaloids of *Vinca herbaceae*. *Chem Nat Compd*. 1975;11(2):283–283. doi:10.1007/BF00570705
169. Zsardon B, Arvay G, Tetenyi P. Alkaloids from *Vinca major* (Apocynaceae). (±)-Vincadifformine. *Acta Chim*. 1972;72(3):355–356.
170. Proksa B, Uhrin D, Grossmann E, Votický Z. Vincarubine, a novel bisindole alkaloid from *Vinca minor* L. *Tetrahedron Lett*. 1986;27(44):5413–5416. doi:10.1016/s0040-4039(00)85225-9
171. Grossmann E, Proksa B, Uhrin D, Votický Z, vynálezci; Method for isolation of the bisindole alkaloid vincarubine. Žádost č.: CS1986-8926. Patent č.: CS259571. 1988.
172. Doepke W, Meisel H, Spitteller G. Dimethoxyeburnamonine, a new alkaloid from *Vinca minor*. *Pharmazie*. 1968;23(2):99.
173. Doepke W, Meisel H, Gruendemann E, Spitteller G. Structure of a new alkaloid from *Vinca minor*. *Tetrahedron Lett*. 1968;(15):1805–1806.
174. Kováčik V, Kompiš I. *Vinca minor* alkaloids. XXIII. Mass spectrometry of eburnamine-type alkaloids. *Collect Czech Chem Commun*. 1969;34(9):2809–2818. doi:10.1135/ccccc19692809
175. Doepke W, Meisel H. Isolation of vincatine and vicesine, two new alkaloids from *Vinca minor*. *Pharmazie*. 1966;21(7):444.
176. Mokřý J, Kompiš I, Šefcovič P, Bauer S. Alkaloids from *Vinca minor*. VI. Vincanorine, its isolation, constitution, and hypothesis of biogenesis. *Collect Czech Chem Commun*. 1963;28:1309–1315.
177. Mokřý J, Kompiš I, Bauerová O, Tomko J, Bauer S. Vincanorine and vincareine. 2 new alkaloids from *Vinca minor*. *Experientia*. 1961;17:354.

178. Mokřý J, Kompiř I. 14-Epivincamine, a new alkaloid from *Vinca minor*. *Tetrahedron Lett.* 1963;(27):1917–1919. doi:10.1016/s0040-4039(01)90941-4
179. Debska M, Kaczmarek F. Paper chromatographic separation of vincamine and isovincamine. *Planta Med.* 1959;7:241–244.
180. Pailer M, Belohlav L. Alkaloids from *Vinca minor*. *Monatsh Chem.* 1954;85:1055–1059. doi:10.1007/bf00899853
181. Lyapunova PN. A study of the alkaloid constituents of *Vinca minor* growing in the Ukraine. *Izuch i Ispol'z Lekarstv Rastit Resursov SSSR (Leningrad: Med) Sb.* 1964:255–257.
182. Trojáneek J, Hoffmannov J, řtrouf O, řekana Z. Vincaminorine, a new alkaloid of *Vinca minor*. *Collect Czech Chem Commun.* 1959;24:526–529.
183. Bauerov O, Mokřý J, Kompiř I, Bauer S, Tomko J. Alkaloids from vinca minor. II. Evaluation by paper chromatography. *Chem Zvesti.* 1961;15:523–528.
184. Trojáneek J, Kavková K, řtrouf O, řekana Z. Alkaloids. IV. Isolation of vincine, a new alkaloid of *Vinca minor* L. *Collect Czech Chem Commun.* 1961;26:867–873. doi:10.1135/ccccc19610867
185. řekana Z, Trojáneek J, řtrouf O, Kavková K. New alkaloids from *Vinca minor*. *Congr Sci Farm, Conf Comun, 21°*, Pisa. 1962:315–321.
186. Trojáneek J, řtrouf O, Kavková K, řekana Z. Alkaloids. VI. Vincaminine and vincinine, two new alkaloids from *Vinca minor*. *Collect Czech Chem Commun.* 1962;27:2801–2807.
187. řtrouf O, Trojáneek J. Alkaloids. X. Structure of vincine. *Collect Czech Chem Commun.* 1964;29(2):447–456. doi:10.1135/ccccc19640447
188. Zsador B, Dezseri A. Quantitative paper chromatographic determination of some alkaloids in *Vinca minor*. *Herba Hung.* 1967;6(2):209–220.
189. Bojthe-Horvath K, Varga-Balazs M, Clauder O. Biogenesis by *Vinca minor* of pyridocanthine alkaloids. *Planta Med.* 1969;17(4):328–337.
190. Fekete G, Szporny L, Jovanovics K, et al, vynálezci; Richter, Gedeon, Vegyeszeti Gyar R. T., zmocnenci. Isolation of an alkaloid mixture from *Vinca minor*. řadost ř.: HU. Patent ř.: HU2859. 1971.
191. Plat M, Manh DD, Le Men J, et al. Mass spectrometry in structural and stereochemical problems. XII. Periwinkle alkaloids. 24. Structure of vincamine and 11-methoxyvincamine. *Bull Soc Chim Fr.* 1962:1082–1088.
192. Malikov VM, Kasymov SZ, Yunusov SY. The isolation of vincine and *N*-acetylvincine. *Chem Nat Compd.* 1970;6(5):662–662. doi:10.1007/BF00563482
193. Trojáneek J, řtrouf O, Kavková K, řekana Z. Vincaminine and vincinine, two new alkaloids of *Vinca minor*. *Chem Ind.* 1961:790.
194. Kaczmarek F, Lutomski J. Analysis of the alkaloids of *Vinca minor*. *Biul Inst Rosl Lecz.* 1962;8:1–11.
195. Boyadzhiev L, Mecheva D, Yordanov B. Extraction of vincamine from periwinkle (*Vinca minor* L.): I. Obtaining of total extract. *Dokl Bulg Akad Nauk.* 2002;55(12):49–52.
196. Boyadzhiev L, Yordanov B. Pertraction of Indole Alkaloids from *Vinca minor* L. *Sep Sci Technol.* 2004;39(6):1321–1329. doi:10.1081/ss-120030485
197. Robakidze ZV, Mudzhiri MM, Vachnadze VY, Mudzhiri KS. Vincamine from *Vinca minor* L. cultivated in the Georgian SSR. *Soobshch Akad Nauk Gruz SSR.* 1975;80(2):377–379.
198. Robakidze ZV, Vachnadze VY, Mudzhiri KS. Chromatospectrophotometric method for the quantitative determination of vincamine. *Izv Akad Nauk Gruz SSR, Ser Khim.* 1977;3(3):223–228.
199. Yordanov B, Boyadzhiev L. Integrated processes. Extraction and liquid membrane preconcentration of indole alkaloids from *Vinca minor* L. *Dokl Bulg Akad Nauk.* 2005;58(7):771–774.
200. Yordanov B, Dimitrov K, Boyadzhiev L. Extraction and liquid-membrane preconcentration of vincamine from periwinkle (*Vinca minor* L.) leaves. Process modelling. *Chem Biochem Eng Q.* 2009;23(2):135–141.
201. Szasz K, Kovats T, Karacsony ME, Lorincz C, Bayer J. Alkaloids of periwinkle. *Vinca minor*. II. Determination and paper-chromatographic separation of the alkaloids. *Planta Med.* 1959;7:234–240. doi:10.1055/s-0028-1101603
202. Schlittler E, Furlenmeier A. Vincamine, an alkaloid from *Vinca minor* (Apocynaceae). *Helv Chim Acta.* 1953;36:2017–2020. doi:10.1002/hlca.19530360742
203. Onur MA. Spectrophotometric determination of vincamine in *Vinca minor* L. growing in Turkey. *J Fac Pharm Gazi Univ.* 2001;18(1):63–69.
204. Aliev AM, Babaev NA. Alkaloids contained in *Vinca herbacea* growing in Azerbaidzhan. *Farmatsiya.* 1968;17(4):23–27.
205. Babaev NA. *Vinca herbacea* alkaloids from Azerbaidzhan SSR flora. *Tr Vses S'ezda Farm Ist.* 1970:412–415.
206. Dzhakeli EZ, Mudzhiri KS, Sheinker YN. 16-Carboxyherbavine from *Vinca herbacea* growing in Georgia, USSR. *Izv Akad Nauk Gruz SSR, Ser Khim.* 1975;1(2):142–145.
207. Abdurakhimova N, Kasymov SZ, Yunusov SY. Erycinine, a new alkaloid from *Vinca erecta*. *Khim Prir Soedin.* 1968;4(2):135.
208. Ognyanov I. Structure of herbaline, an oxindole alkaloid from *Vinca herbacea*. *Chem Ber.* 1966;99(6):2052.

209. Dzhakeli EZ, Mudzhiri KS. Chemical structure of the alkaloid Herbavine isolated from the periwinkle, *Vinca herbacea*, growing in the Georgian SSR. *Soobshch Akad Nauk Gruz SSR*. 1970;57(2):353–356.
210. Chkhikvadze GV, Khalmirzaev MM, Vachnadze VY, Malikov VM, Yunusov SY. Structure of herboxine. *Chem Nat Compd*. 1976;12(2):201–202. doi:10.1007/BF00566344
211. Robakidze ZV, Vachnadze VY, Mudzhiri KS. Isolation of hydroxyindole and  $\alpha$ -methyleneindoline from the aboveground parts of *Vinca minor*. *Soobshch Akad Nauk Gruz SSR*. 1978;89(1):117–120.
212. Ognyanov I, Pyuskyulev B, Kompiš I, et al. Alkaloids from *Vinca herbacea*. X. The structures and stereochemistry of majdine and isomajdine. *Tetrahedron*. 1968;24(13):4641–4648. doi:10.1016/s0040-4020(01)98661-2
213. Khalmirzaev MM, Malikov VM, Yunusov SY. Isolation from *Vinca erecta* of vineridine *N*-oxide and 16-methoxyvincadiformine *N*-oxide. *Chem Nat Compd*. 1973;9(6):776–777. doi:10.1007/BF00565815
214. Khalmirzaev MM, Malikov VM, Yunusov SY. Vinerinine – A new oxindole alkaloid from *Vinca erecta*. *Chem Nat Compd*. 1974;10(3):419–419. doi:10.1007/BF00563923
215. Doepke W, Meisel H, Fehlhaber HW. Structure of vincatine, an oxindole alkaloid from *Vinca minor*. *Tetrahedron Lett*. 1969;(21):1701–1704. doi:10.1016/S0040-4039(01)87985-5
216. Mokry J, Kompiš I. ( $\pm$ )-ind-*N*-Methylquebrachamine, the fourth racemic alkaloid from *Vinca minor*. *Chem Zvesti*. 1963;17:852–860.
217. Mokry J, Kompiš I, Dubravková L, Šefčovič P. Alkaloids of *Vinca minor*. Structure of vincadine and vincaminoreine. *Tetrahedron Lett*. 1962:1185–1188. doi:10.1016/s0040-4039(00)70582-x
218. Garnier J, Mahuteau J. A New Alkaloid Difforine and Normacusine B from *Vinca difformis*. *Planta Med*. 1986;52(1):66–67. doi:10.1055/s-2007-969075
219. Banerji A, Chakrabarty M. Majvinine: a new indole alkaloid of *Vinca major*. *Phytochemistry*. 1977;16(7):1124–1125. doi:10.1016/s0031-9422(00)86771-0
220. Falco M, Garnier-Gosset J, Fellion E, Le Men J. Periwinkle alkaloids. XXIX. Isolation of new alkaloids of *Vinca difformis*. *Ann Pharm Fr*. 1964;22(6–7):455.
221. Aliev AM, Babaev NA. Aquammycin isolated from *Vinca herbacea* growing in the Azerbaidzhan SSR. *Farmatsiya*. 1969;18(5):28–31.
222. Kuchenkova MA, Yuldashev PK, Yunusov SY. Vinervine – A new alkaloid from the aboveground part of *Vinca erecta* Regel. et Schmalh. *Bull Acad Sci USSR, Div Chem Sci*. 1965;14(12):2119–2121. doi:10.1007/BF00845999
223. Rakhimov DA, Malikov VM, Yunusov SY. The structure of vincanicine. *Chem Nat Compd*. 1969;5(5):386–387. doi:10.1007/BF00595115
224. Lyapunova PM, Borisjuk YG. Investigation of *Vinca minor*. I. Alkaloidal constituents. *Farm Zh*. 1961;16:42–47.
225. Potier P, Beugelmans R, Le Men J, Janot MM. Periwinkle alkaloids. XXX. Alkaloids of the roots of *Vinca major*, reserpine, 10-methoxyvellosine. *Ann Pharm Fr*. 1965;23(1):61–64.
226. Ognyanov I, Dalev P, Duchevska KB, Mollow N. New alkaloids from *Vinca herbacea*. *Riv Ital Essenze, Profumi, Piante Off, Aromi, Saponi, Cosmet*. 1965;47(11):600–602.
227. Votický Z, Grossmann E, Tomko J, Massiot G, Ahond A, Potier P. Vinoxetine, an indolic alkaloid of a new type. *Tetrahedron Lett*. 1974;(45):3923–3926.
228. Votický Z, Grossmann E, Potier P. Alkaloids from *Vinca minor* L. XXV. Vinoxetine, a novel type of indole alkaloid. *Collect Czech Chem Commun*. 1977;42(2):548–552. doi:10.1135/cccc19770548
229. Vachnadze VY, Malikov VM, Mudzhiri KS, Yunusov SY. A study of the alkaloids of *Vinca herbaceae*. *Chem Nat Compd*. 1971;7(5):661–661. doi:10.1007/BF00568445
230. Chatterjee A, Banerji A, Chakrabarty M. Monoterpenoid alkaloid from *Vinca major*. *Planta Med*. 1975;28(2):109–111. doi:10.1055/s-0028-1097838
231. Meisel H, Doepke W. Vinomine, a secondary alkaloid of *Vinca minor*. *Pharmazie*. 1971;26(3):182.
232. Nishibe S, Takenaka T, Kodama A, Coskunb M. Flavonoids and cyclitol from *Vinca herbacea*. *Nat Med*. 1998;52(2):201.
233. Fischhof PK, MoslingerGehmayr R, Herrmann WM, Friedmann A, Russmann DL. Therapeutic efficacy of vincamine in dementia. *Neuropsychobiology*. 1996;34(1):29–35. doi:10.1159/000119288
234. Casale R, Giorgi I, Guarnaschelli C. Evaluation of the effect of vincamine teprosilate on behavioural performances of patients affected with chronic cerebrovascular disease. *Int J Clin Pharmacol Res*. 1984;4(4):313–319.
235. Hagstadius S, Gustafson L, Risberg J. The effects of bromvincamine and vincamine on regional cerebral blood flow and mental functions in patients with multi-infarct dementia. *Psychopharmacology*. 1984;83(4):321. doi:10.1007/bf00428538
236. Cook P, James I. Cerebral vasodilators (second of two parts). *N Engl J Med*. 1981;305(26):1560–1564. doi:10.1056/NEJM198112243052604
237. Du T, Yang L, Xu X, et al. Vincamine as a GPR40 agonist improves glucose homeostasis in type 2 diabetic mice. *J Endocrinol*. 2019;240(2):195–214. doi:10.1530/joe-18-0432
238. Nandini HS, Naik PR. Antidiabetic, antihyperlipidemic and antioxidant effect of Vincamine, in streptozotocin-induced diabetic rats. *Eur J Pharmacol*. 2019;843:233–239. doi:10.1016/j.ejphar.2018.11.034



239. Le Poncin-Lafitte M, Rapin JR. Age-associated changes in deoxyglucose uptake in whole brain. *Gerontology*. 1980;26(5):265. doi:10.1159/000212426
240. Wu L, Wu X, Wang K, Zhang J. Vincamine protects PC12 cells against hydrogen peroxide induced apoptosis by upregulation of SO and activation of the PI3K/Akt pathway. *Lat Am J Pharm*. 2016;35(3):510–518.
241. Cazin M, Paluszczak D, Poulain V, et al. Use of alveolar macrophages in antianoxic drug studies. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*. 1988;10(4):231.
242. Zagvazdin Y, Bodo M, Sarkadi A, Szporny L. Cerebroprotective drugs shorten the hypoxia-induced onset of electrical silence in unanesthetized rats. *Pharmacol Res*. 2000;42(3):261–268. doi:10.1006/phrs.2000.0684
243. Moglia A, Alfonsi E, Zandrini C, Pistarini C, Arrigo A. Acute i.v. vincamine teprosilate administration: quantified investigation in elderly subjects. *Int J Clin Pharmacol Res*. 1984;4(4):303–306.
244. Erdő SL, Molnár P, Lakics V, Bence JZ, Tömösközi Z. Vincamine and vincanol are potent blockers of voltage-gated Na<sup>+</sup> channels. *Eur J Pharmacol*. 1996;314(1):69–73. doi:10.1016/S0014-2999(96)00542-0
245. Fayed A-HA. Brain Trace Element Concentration of Rats Treated with the Plant Alkaloid, Vincamine. *Biol Trace Elem Res*. 2010;136(3):314–319. doi:10.1007/s12011-009-8550-3
246. Han J, Qu Q, Qiao J, Zhang J. Vincamine alleviates amyloid- $\beta$  25-35 peptides-induced cytotoxicity in PC12 cells. *Pharmacogn Mag*. 2017;13(49):123–128. doi:10.4103/0973-1296.196309
247. Kurmukov AG, Sultanov MB. Pharmacology of an alkaloid fraction isolated from the aerial parts of *Vinca erecta*. *Farmakol Alkaloidov Serdech Glikozidov*; 1971:47–50.
248. Depresseux JC. The effect of vincamine on the regional cerebral blood flow in man. *Eur Neurol*. 1978;17(2):100–107. doi:10.1159/000114931
249. King GA. Protective effects of vinpocetine and structurally related drugs on the lethal consequences of hypoxia in mice. *Arch Int Pharmacodyn Ther*. 1987;286(2):299–307.
250. Imamoto T, Nukada T, Tada K. Effects of vincamine and its analogs on cerebral circulation in dogs. *No To Shinkei*. 1977;29(3):341.
251. Roquebert J, Demichel P. Inhibition of the  $\alpha_1$ - and  $\alpha_2$ -adrenoceptor-mediated pressor response in pithed rats by raubasine, tetrahydroalstonine and akuammigine. *Eur J Pharmacol*. 1984;106(1):203–205. doi:10.1016/0014-2999(84)90698-8
252. Unger T, Borghi C, Charchar F, et al. 2020 International Society of Hypertension Global Hypertension Practice Guidelines. *Hypertension*. 2020;75:1334–1357. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.120.15026
253. Kashyap P, Kalaiselvan V, Kumar R, Kumar S. Ajmalicine and reserpine: indole alkaloids as multi-target directed ligands towards factors implicated in Alzheimer's disease. *Molecules*. 2020;25(7):1609. doi:10.3390/molecules25071609
254. Rosenkranz V, Wink M. Alkaloids induce programmed cell death in bloodstream forms of trypanosomes (*Trypanosoma b. brucei*). *Molecules*. 2008;13(10):2462–2473. doi:10.3390/molecules13102462
255. Pereira DM, Ferreres F, Oliveira JMA, et al. Pharmacological effects of *Catharanthus roseus* root alkaloids in acetylcholinesterase inhibition and cholinergic neurotransmission. *Phytomedicine*. 2010;17(8):646–652. doi:10.1016/j.phymed.2009.10.008
256. Usia T, Watabe T, Kadota S, Tezuka Y. Cytochrome P450 2D6 (CYP2D6) inhibitory constituents of *Catharanthus roseus*. *Biol Pharm Bull*. 2005;28(6):1021–1024. doi:10.1248/bpb.28.1021
257. Gan L-S, Yang S-P, Wu Y, Ding J, Yue J-M. Terpenoid Indole Alkaloids from *Winchia calophylla*. *J Nat Prod*. 2006;69(1):18–22. doi:10.1021/np0502701
258. Shittu H, Gray A, Furman B, Young L. Glucose uptake stimulatory effect of akuammicine from *Picralima nitida* (Apocynaceae). *Phytochem Lett*. 2010;3(1):53–55. doi:https://doi.org/10.1016/j.phytol.2009.11.003
259. Menzies JRW, Paterson SJ, Duwiejua M, Corbett AD. Opioid activity of alkaloids extracted from *Picralima nitida* (fam. Apocynaceae). *Eur J Pharmacol*. 1998;350(1):101–108. doi:10.1016/s0014-2999(98)00232-5
260. Creed SM, Gutridge AM, Argade MD, et al. Isolation and Pharmacological Characterization of Six Opioidergic *Picralima nitida* Alkaloids. *J Nat Prod*. 2021;84(1):71–80. doi:10.1021/acs.jnatprod.0c01036
261. Mroue MA, Euler KL, Ghuman MA, Alam M. Indole Alkaloids of *Haplophyton crooksii*. *J Nat Prod*. 1996;59(9):890–893. doi:10.1021/np960070c
262. Galarreta BC, Sifuentes R, Carrillo AK, Sanchez L, Amado MdRI, Maruenda H. The use of natural product scaffolds as leads in the search for trypanothione reductase inhibitors. *Bioorg Med Chem* 2008;16(14):6689–6695. doi:10.1016/j.bmc.2008.05.074
263. Deutsch HF, Evenson MA, Drescher P, Sparwasser C, Madsen PO. Isolation and biological activity of aspidospermine and quebrachamine from an *Aspidosperma* tree source. *J Pharm Biomed Anal*. 1994;12(10):1283. doi:10.1016/0731-7085(94)00066-2
264. Mitaine-Offer AC, Sauvain M, Valentin A, Callapa J, Mallie M, Zeches-Hanrot M. Antiplasmodial activity of aspidosperma indole alkaloids. *Phytomedicine*. 2002;9(2):142–145. doi:10.1078/0944-7113-00094
265. Coatti GC, Marcarini JC, Sartori D, Fidelis QC, Ferreira DT, Mantovani MS. Cytotoxicity, genotoxicity and mechanism of action (via gene expression analysis) of the indole alkaloid aspidospermine (antiparasitic) extracted

- from *Aspidosperma* polyneuron in HepG2 cells. *Cytotechnology*. 2016;68(4):1161–1170. doi:10.1007/s10616-015-9874-9
266. Arruzazabala MdL, Almira JJ, Rojas R, Gonzalez R. Study of some pharmacological effects of aspidospermine. *Rev Cubana Farm*. 1982;16(2):138.
  267. Rojas Martinez RL, Perez Souto N, Cantero Martinez A, Diaz Rondon B, Arruzazabala Valmana ML. Pharmacological screening of some major indole alkaloids extracted from sweet potato lianas (*Strepeliopsis strepelioides* K. Schum). *Rev Cubana Farm*. 1980;14(3):289–301.
  268. Ahmed A, Li W, Chen F-F, et al. Monoterpene indole alkaloids from *Rhazya stricta*. *Fitoterapia*. 2018;128:1–6. doi:10.1016/j.fitote.2018.04.018
  269. Abdul-Hameed ZH, Alarif WM, Sobhi TR, et al. New cytotoxic indole-type alkaloids obtained from *Rhazya stricta* leaves. *S Afr J Botany*. 2021;137:298–302. doi:10.1016/j.sajb.2020.10.020
  270. Lacroix P, Quiniou MJ, Linee P, Le Polles JB. Cerebral metabolic and hemodynamic activities of l-eburnamonine in the anesthetized dog. A comparison with vincamine. *Arzneimittelforschung*. 1979;29(8):1094.
  271. Linee P, Hollands MA, Quiniou P, Gueguen M, Le Polles JB. Experimental approach of activity and mechanism(s) of action of drugs used in cerebral metabolic insufficiency. *Eur Neurol*. 1981;20(3):253. doi:10.1159/000115243
  272. Benoist L, Allain H, Linee P, et al. Significance of proton nuclear magnetic resonance in pharmacological studies of cerebral edema. *J Pharmacol*. 1984;15(2):143.
  273. Drago F, Grassi M, Valerio C, Spadaro F, D'Agata V, Lauria N. Effects of vinburnine on experimental models of learning and memory impairments. *Pharmacol, Biochem Behav*. 1990;37(1):53. doi:10.1016/0091-3057(90)90040-o
  274. Maksay G, Biro T, Kiss B. Vinburnine decelerates [<sup>3</sup>H]N-methylscopolamine binding to recombinant human muscarinic M<sub>1</sub>–M<sub>4</sub> acetylcholine receptors. *Eur J Pharmacol*. 2004;483(2–3):229–232. doi:10.1016/j.ejphar.2003.10.039
  275. Bargheon J, Durocher AM, Lagrange M. Treatment of cerebrovascular deficiencies. Therapeutic evaluation from 129 cases using the double-blind method against placebo. *Sem Hop*. 1984;60(3):169–174.
  276. Jansen W, O'Connolly M, Lehmann E, Mayer M. Experimental clinical studies on the effect of eburnamonine in cerebrovascular disorders. *Pharmacopsychiatry*. 1986;19(5):389–394. doi:10.1055/s-2007-1017276
  277. Le Devehat C, Vimeux M. Pharmacoclinical study of the action of vinburnin versus placebo: study of the hemodynamic, microcirculatory and rheological effects in angiopathy of the lower limbs in diabetes mellitus. *Int Angiol*. 1989;8(1):57–61.
  278. Domini L, Acciavatti A, Galigani C, et al. The effects of the acute administration of vinburnine on blood rheology, oxygen transport and regional circulation under normal conditions and in hypoxemia. *In vivo research. Recenti Prog Med*. 1990;81(11):716–723.
  279. Kitajima M, Anbe M, Kogure N, Wongseripipatana S, Takayama H. Indole alkaloids from *Kopsia jasminiflora*. *Tetrahedron*. 2014;70(47):9099–9106. doi:10.1016/j.tet.2014.10.002
  280. Aliev KU. Pharmacological properties of elegantine preparations. *Farmakol Alkaloidov Seredech Glikozidov*. 1971:195–197.
  281. Kurmukov AG. Pharmacology of majdine and isomajdine. *Farmakol Alkaloidov Seredech Glikozidov*. 1971:43–47.
  282. Guelcin I, Beydemir S, Topal F, et al. Apoptotic, antioxidant and antiradical effects of majdine and isomajdine from *Vinca herbacea* Waldst. and kit. *J Enzyme Inhib Med Chem*. 2012;27(4):587–594. doi:10.3109/14756366.2011.604318
  283. Li Y-Q, Cai J, Cheng J-X, et al. Alstomairines D–G: New monoterpene indole alkaloids with cytotoxic activity from *Alstonia mairei*. *J Mol Struct*. 2022;1253:132277. doi:10.1016/j.molstruc.2021.132277
  284. Mishra DP, Khan MA, Yadav DK, et al. Monoterpene Indole Alkaloids from *Anthocephalus cadamba* Fruits Exhibiting Anticancer Activity in Human Lung Cancer Cell Line H1299. *ChemistrySelect*. 2018;3(29):8468–8472. doi:10.1002/slct.201801475
  285. Si Y-Y, Wang W-W, Feng Q-M, et al. Neuroinflammatory inhibitors from *Gardneria nutans* Siebold & Zuccarini. *RSC Adv*. 2021;11(44):27085–27091. doi:10.1039/d1ra05204g
  286. Zhu W-M, He H-P, Fan L-M, Shen Y-M, Zhou J, Hao X-J. Components of stem barks of *Winchia calophylla* A. DC. and their bronchodilator activities. *J Integr Plant Biol*. 2005;47(7):892–896. doi:10.1111/j.1744-7909.2005.00042.x
  287. Shang J-H, Cai X-H, Zhao Y-L, Feng T, Luo X-D. Pharmacological evaluation of *Alstonia scholaris*: anti-tussive, anti-asthmatic and expectorant activities. *J Ethnopharmacol*. 2010;129(3):293–298. doi:10.1016/j.jep.2010.03.029
  288. Shang J-H, Cai X-H, Feng T, et al. Pharmacological evaluation of *Alstonia scholaris*: Anti-inflammatory and analgesic effects. *J Ethnopharmacol*. 2010;129(2):174–181. doi:10.1016/j.jep.2010.02.011
  289. Liu L, Chen Y-Y, Qin X-J, et al. Antibacterial monoterpene indole alkaloids from *Alstonia scholaris* cultivated in temperate zone. *Fitoterapia*. 2015;105:160–164. doi:10.1016/j.fitote.2015.06.019

290. Dutta SC, Bhattacharya SK, Ray AB. Flower alkaloids of *Alstonia scholaris*. *Planta Med.* 1976;30(1):86. doi:10.1055/s-0028-1097699
291. Mitra S, Prova SR, Sultana SA, et al. Therapeutic potential of indole alkaloids in respiratory diseases: A comprehensive review. *Phytomedicine.* 2021;90:153649. doi:10.1016/j.phymed.2021.153649
292. Luo X, Zhao Y, Shang J, Liu Y, Yang J, vynálezci; Kunming Institute of Botany, The Chinese Academy of Sciences Kunming Beiao Technology Company Limited, zmocněnec. Pharmaceutical composition for treating respiratory diseases. Žádost č.: WO2016-CN105318. Patent č.: WO2017080485. 2017.
293. Luo X, Shang J, Hao X, Wang J, vynálezci; Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences Yunnan Institute of Materia Medica, zmocněnec. Medicine prepared from *Alstonia scholaris* (L.) R. Br. extract for treating respiratory diseases, and preparation method and application thereof. Žádost č.: CN2006-10010940. Patent č.: CN101084951. 2007.
294. Luo X, Zhao Y, Shang J, Liu Y, vynálezci; Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, zmocněnec. Pharmaceutical composition against airway inflammation. Žádost č.: CN2015-10770997. Patent č.: CN105456263. 2016.
295. LiverTox: Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury. Reserpine. Bethesda (MD): National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases. Přístupné 17.3.2022. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK548348/>
296. Kurmukov AG, Akhmedkhodzhaeva KG. Pharmacological study of reserpine. *Farmakol Alkaloidov Serdech Glikozidov.* 1971:33.
297. Orlow SJ, Komatsu LN, vynálezci; New York University, United States, zmocněnec. Indole alkaloid compounds as melanogenesis promoters and uses thereof for enhancing skin pigmentation. Žádost č.: US2013-13885685. Patent č.: US9138433. 2015.
298. Duncan RJ, Nash CB. Effects of the rauwolfia alkaloids, ajmaline, tetraphyllicine, and serpentine, on myocardial excitability. *Arch Int Pharmacodyn Ther.* 1970;184(2):355.
299. Duncan RJ, Nash CB. Electropharmacology of the rauwolfia alkaloids, ajmaline, tetraphyllicine, and serpentine on the canine heart. *Arch Int Pharmacodyn Ther.* 1973;206(1):181.
300. Gendenshtein EI. Effect of some rauwolfia alkaloid and EDTA derivatives on experimental cardiac arrhythmia. *Cor Vasa.* 1966;8(4):271.
301. Beljanski M, Beljanski MS. Selective inhibition of *in vitro* synthesis of cancer DNA by alkaloids of  $\beta$ -carboline class. *Exp Cell Biol.* 1982;50(2):79–87. doi:10.1159/000163131
302. Dutta S, Chowdhury AR, Srivastava SK, Ghosh I, Datta K. Evidence for Serpentine as a novel antioxidant by a redox sensitive HABP1 overexpressing cell line by inhibiting its nuclear translocation of NF- $\kappa$ B. *Free Radical Res.* 2011;45(11–12):1279–1288. doi:10.3109/10715762.2011.610794
303. Cai X-H, Jiang H, Li Y, et al. Cytotoxic Indole Alkaloids from *Melodinus fusiformis* and *M. morsei*. *Chin J Nat Med.* 2011;9(4):259–263. doi:10.1016/S1875-5364(11)60061-7
304. Zheng Z, Ming Y, Su L, Chen L, Li X, Liu S, vynálezci; Xiamen Overseas Chinese Subtropical Plant Introduction Garden, zmocněnec. Application of tabersonine in preparing antitumor agent. Žádost č.: CN2016-11064554. Patent č.: CN106580976. 2017.
305. Li X, Deng Y, Kang L, et al. Cytotoxic active ingredients from the seeds of *Voacanga africana*. *S Afr J Bot.* 2021;137:311–319. doi:10.1016/j.sajb.2020.10.028
306. Zhang X, vynálezce; Jinan Xingyi Medical Technology Co., Ltd., China, zmocněnec. Pharmaceutical composition for treating esophageal cancer and preparation method thereof. Žádost č.: CN2016-10501422. Patent č.: CN106038899. 2016.
307. Shao P, vynálezce; Jinan Xingyi Medical Technology Co., Ltd., zmocněnec. Traditional Chinese medicine pharmaceutical composition for treating malignant tumor and preparation method thereof. Žádost č.: CN2015-10871920. Patent č.: CN105327009. 2016.
308. Kai T, Zhang L, Wang X, et al. Tabersonine Inhibits Amyloid Fibril Formation and Cytotoxicity of A $\beta$ (1–42). *ACS Chem Neurosci.* 2015;6(6):879–888. doi:10.1021/acschemneuro.5b00015
309. Zhang D, Li X, Hu Y, et al. Tabersonine attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury via suppressing TRAF6 ubiquitination. *Biochem Pharmacol.* 2018;154:183–192. doi:10.1016/j.bcp.2018.05.004
310. Shi S, Song L, Liu Y, He Y. Activation of CREB protein With tabersonine attenuates STAT3 during atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Dose-Response.* 2020;18(1):1559325820912067. doi:10.1177/1559325820912067
311. Sun X, Gan L, Li N, Sun S, Li N. Tabersonine ameliorates osteoblast apoptosis in rats with dexamethasone-induced osteoporosis by regulating the Nrf2/ROS/Bax signaling pathway. *AMB Expr.* 2020;10(1):165. doi:10.1186/s13568-020-01098-0
312. Choi YH, Cho HS, Lee SH, vynálezci; LG Household & Health Care Ltd., zmocněnec. Composition comprising tabersonine for promoting hair growth and preventing hair loss. Žádost č.: KR2016-65886. Patent č.: KR2017134109. 2017.

313. Lee SH, Kim DH, Kim HJ, vynálezci; LG Household & Health Care Ltd., zmocněnec. Composition containing tabersonine for improving skin. Žádost č.: KR2015-9889. Patent č.: KR2015087146. 2015.
314. Oliveira EJ, Medeiros IA, Mukherjee R. Hypotensive and spasmolytic effects of normacusine B from *Strychnos atlantica* root. *Phytomedicine*. 1996;3(1):45–49. doi:10.1016/s0944-7113(96)80009-2
315. Sultanov MB, Saidkasymov TK. Pharmacology of the alkaloid tombozine, extracted from the above-ground part of *Vinca erecta*. *Farmakol Alkaloidov Seredech Glikozidov*. 1971:3–17.
316. Feng T, Cai X-H, Liu Y-P, Li Y, Wang Y-Y, Luo X-D. Melodinines A–G, Monoterpenoid Indole Alkaloids from *Melodinus henryi*. *J Nat Prod*. 2010;73(1):22–26. doi:10.1021/np900595v
317. Mukhopadhyay S, Handy GA, Funayama S, Cordell GA. Anticancer Indole Alkaloids of *Rhazya stricta*. *J Nat Prod*. 1981;44(6):696–700. doi:10.1021/np50018a014
318. Soares PRO, Laurindo de Oliveira P, de Oliveira CMA, Kato L, Guillo LA. *In vitro* antiproliferative effects of the indole alkaloid vallesiachotamine on human melanoma cells. *Arch Pharmacol Res*. 2012;35(3):565–571. doi:10.1007/s12272-012-0320-7
319. Li N-P, Liu J-S, Liu J-W, et al. Monoterpenoid indole alkaloids from the fruits of *Gelsemium elegans* and their anti-inflammatory activities. *Bioorg Chem*. 2021;107:104624. doi:10.1016/j.bioorg.2020.104624
320. Sacconnay L, Rycckewaert L, dos Santos Passos C, et al. Alkaloids from *Psychotria* Target Sirtuins: *In Silico* and *In Vitro* Interaction Studies. *Planta Med*. 2015;81(6):517–524. doi:10.1055/s-0034-1383261
321. Passos CS, Simões-Pires CA, Nurisso A, et al. Indole alkaloids of *Psychotria* as multifunctional cholinesterases and monoamine oxidases inhibitors. *Phytochemistry*. 2013;86:8–20. doi:10.1016/j.phytochem.2012.11.015
322. Potier P, Fan CK, vynálezci; Agence Nationale de Valorisation de la Recherche (ANVAR), zmocněnec. Local anesthetic, antitussive, and sedative vincines. Žádost č.: FR1970-21650. Patent č.: FR2117796. 1972.
323. Sturdiková M, Fуска J, Grossmann E, Votický Z. New compounds with cytotoxic and antitumor effects. Part 6: Monomeric indole alkaloids of *Vinca minor* L. and their effect on P388 cells. *Pharmazie*. 1986;41(4):270.
324. Mustofa M, Mallié M, Valentin A, Lewin G. *In vitro* Antiplasmodial Activity and Cytotoxicity of Vincadifformine and Its Semisynthetic Derivatives. *Indones J Biotechnol*. 2006;11(1):878–883. doi:10.22146/ijbiotech.7562
325. Lewin G, Hocquemiller R, Schaeffer C, Lambert P-H, Léonce S, Pierré A. Cytotoxicity of 6,16-Disubstituted analogues of (–)-Vincadifformine. *Bioorg Med Chem Lett*. 2002;12(3):371–374. doi:10.1016/S0960-894X(01)00757-0
326. Racz-Kotilla E. Effects of some alkaloids of *Amsonia tabernaemontana* on blood pressure. *Herba Hung*. 1975;14(1):57–68.
327. Racz G, Racz-Kotilla E. Relationship between the structure of indole alkaloids from *Amsonia tabernaemontana* Walt. and their hypotensive effect. *Rev Med*. 1977;23(2):124–126.
328. Tagieva ZD, Babaev NA, Aliev AM. Study of the antiarrhythmic activity of vincamajine isolated from the essential oil of periwinkles growing in the Azerbaijan SSR. *Azerb Med Zh*. 1979;56(10):11–15.
329. Bhattacharya SK, Bose R, Dutta SC, Ray AB, Guha SR. Neuropharmacological studies on strictamine isolated from *Alstonia scholaris*. *Indian J Exp Biol*. 1979;17(6):598–600.
330. Zhang L, Zhang C-J, Zhang D-B, et al. An Unusual Indole Alkaloid with anti-Adenovirus and anti-HSV Activities from *Alstonia scholaris*. *Tetrahedron Lett*. 2014;55(10):1815–1817. doi:10.1002/chin.201432217
331. Sultanov MB. Mechanism of the emetic effect of the alkaloid vincanidine. *Farmakol Alkaloidov Glikozidov*. 1967:64–68.
332. Sultanov MB. The pharmacology of the alkaloid vincanidine. *Izvest Akad Nauk Uzbek SSR, Ser Med*. 1959;1:29–37.
333. Kurmukov AG, Akhmedkhodzhaeva KG, Sultanov MB. Effect of vincanidine on the central nervous system. *Farmakol Alkaloidov Seredech Glikozidov*. 1971:27–29.
334. Sultanov MB, Ismailov FN. Antilambiotic activity of alkaloids of *Vinca erecta* studied experimentally. *Farmakol Alkaloidov Seredech Glikozidov*. 1971:227–229.
335. Kurmukov AG, Sultanov MB. Encephalographic study of vincanine and strychnine effects on central nervous system. *Uzb Biol Zh*. 1967;11(1):32–36.
336. Kurmukov AG, Sultanov MB. Pharmacology of the alkaloid vineridine extracted from *Vinca erecta*. *Farmakol Farmakoter Alkaloidov Glikozidov*;1966:26–30.
337. Kurmukov AG. Pharmacology of the indole alkaloids akuammine, ajmaline, vinerine, and some derivatives of ervamine and pseudokopsinine. *Farmakol Prir Veschestv*. 1978:32–51.
338. Fadaeinasab M, Basiri A, Kia Y, Karimian H, Ali HM, Murugaiyah V. New Indole Alkaloids from the Bark of *Rauvolfia reflexa* and their Cholinesterase Inhibitory Activity. *Cell Physiol Biochem*. 2015;37(5):1997–2011. doi:10.1159/000438560
339. Guo D, Lu X, Xu X, et al. Therapeutic Effect of Vinorine on Sciatic Nerve Injured Rat. *Neurochem Res*. 2018;43(2):375–386. doi:10.1007/s11064-017-2432-4
340. Zvěřová M. *Alzheimerova demence*. 1. edice. Grada Publishing; 2017.
341. Chen Z-R, Huang J-B, Yang S-L, Hong F-F. Role of Cholinergic Signaling in Alzheimer's Disease. *Molecules*. 2022;27(6):1816. doi:10.3390/molecules27061816

342. Hardy J, Selkoe DJ. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science*. 2002;297(5580):353–356. doi:10.1126/science.1072994
343. Selkoe DJ, Hardy J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO Mol Med*. 2016;8(6):595–608. doi:10.15252/emmm.201606210
344. Yan S, Chen x, Walker D, Schmidt A, Arancio O, Lue L-F. RAGE: A Potential Target for A $\beta$ -Mediated Cellular Perturbation in Alzheimer's Disease. *Curr Mol Med*. 2007;7(8):735–742. doi:10.2174/156652407783220741
345. Avila J, Lucas JJ, Perez M, Hernandez F. Role of tau protein in both physiological and pathological conditions. *Physiol Rev*. Apr 2004;84(2):361–384. doi:10.1152/physrev.00024.2003
346. Plattner F, Angelo M, Giese KP. The roles of cyclin-dependent kinase 5 and glycogen synthase kinase 3 in tau hyperphosphorylation. *J Biol Chem*. 2006;281(35):25457–25465. doi:10.1074/jbc.M603469200
347. Petrovič M, Sedláček M, Horák M, Vyklický L. Neurofarmakologická podstata působení memantinu v léčbě Alzheimerovy demence. *Klin Farmakol Farm*. 2004;18(2):81–89.
348. Rektorová I. Koncepce mírné kognitivní poruchy u Alzheimerovy nemoci a Parkinsonovy nemoci. *Neurol pro Praxi*. 2010;11(6):396–399.
349. Kim GH, Kim JE, Rhie SJ, Yoon S. The Role of Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases. *Exp Neurobiol*. 2015;24(4):325–340. doi:10.5607/en.2015.24.4.325
350. Togo T, Katsuse O, Iseki E. Nitric oxide pathways in Alzheimer's disease and other neurodegenerative dementias. *Neurol Res*. 2004;26:563–566. doi:10.1179/016164104225016236
351. Itzhaki RF, Lathe R, Balin BJ, et al. Microbes and Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis*. 2016;51(4):979–984. doi:10.3233/JAD-160152
352. Hroudová J. Výzkum nových léčiv u Alzheimerovy choroby. *Prakt lékáren*. 2017;13(2e):e3–e10.
353. Hulcová D. *Biologická aktivita alkaloidů Narcissus pseudonarcissus L. cv. Dutch Master (Amaryllidaceae). Disertační práce*. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta; 2018. Přístupné 13.4.2022. <https://dspace.cuni.cz/handle/20.500.11956/103784>
354. Triggler DJ, Mitchell JM, Filler R. The pharmacology of physostigmine. *CNS Drug Rev*. 1998;4(2):87–136. doi:10.1111/j.1527-3458.1998.tb00059.x
355. Korábečný J, Špilovská K, Benek O, Musílek K, Soukup O, Kuča K. Takrin a jeho deriváty v terapii Alzheimerovy choroby. *Čes slov Farm*. 2012;61(5):210–221.
356. SÚKL Oddělení farmakovigilance. Námelové alkaloidy – omezení použití. Přístupné 16.3.2022, <https://www.sukl.cz/namelove-alkaloidy-omezeni-pouziti>
357. Stockburger C, Miano D, Pallas T, Friedland K, Müller WE. Enhanced Neuroplasticity by the Metabolic Enhancer Piracetam Associated with Improved Mitochondrial Dynamics and Altered Permeability Transition Pore Function. *Neural Plast*. 2016;2016:8075903. doi:10.1155/2016/8075903
358. Hall ED. Lazaroids: Mechanisms of Action and Implications for Disorders of the CNS. *Neuroscientist*. 1997;3(1):42–51. doi:10.1177/107385849700300114
359. Tirilazad International Steering Committee. Tirilazad Mesylate in Acute Ischemic Stroke. *Stroke*. 2000;31(9):2257–2265. doi:10.1161/01.STR.31.9.2257
360. Morales-García JA, Calleja-Conde J, Lopez-Moreno JA, et al. *N,N*-dimethyltryptamine compound found in the hallucinogenic tea ayahuasca, regulates adult neurogenesis *in vitro* and *in vivo*. *Transl Psychiatry*. 2020;10(1):331. doi:10.1038/s41398-020-01011-0
361. Hampel H, Mesulam MM, Cuello AC, et al. The cholinergic system in the pathophysiology and treatment of Alzheimer's disease. *Brain*. 2018;141(7):1917–1933. doi:10.1093/brain/awy132
362. Silva T, Reis J, Teixeira J, Borges F. Alzheimer's disease, enzyme targets and drug discovery struggles: from natural products to drug prototypes. *Ageing Res Rev*. May 2014;15:116–145. doi:10.1016/j.arr.2014.03.008
363. de Almeida JP, Saldanha C. Nonneuronal cholinergic system in human erythrocytes: biological role and clinical relevance. *J Membr Biol*. 2010;234(3):227–34. doi:10.1007/s00232-010-9250-9
364. Cahlíková L, Macáková K, Benešová N, Chlebek J, Hošťálková A, Opletal L. Chapter 6 – Natural Compounds (Small Molecules) as Potential and Real Drugs of Alzheimer's Disease: A Critical Review. V: Atta-ur-Rahman, editor. *Studies in Natural Products Chemistry*. Elsevier; 2014:153–194.
365. Ciro A, Park J, Burkhard G, Yan N, Geula C. Biochemical differentiation of cholinesterases from normal and Alzheimer's disease cortex. *Curr Alzheimer Res*. 2012;9(1):138–143. doi:10.2174/156720512799015127
366. García-Ayllón MS, Silveyra MX, Sáez-Valero J. Association between acetylcholinesterase and beta-amyloid peptide in Alzheimer's cerebrospinal fluid. *Chem Biol Interact*. 2008;175(1–3):209–215. doi:10.1016/j.cbi.2008.04.047
367. Sridhar GR, Nirmala G, Apparao A, et al. Serum butyrylcholinesterase in type 2 diabetes mellitus: a biochemical and bioinformatics approach. *Lipids Health Dis*. 2005;4:18. doi:10.1186/1476-511x-4-18
368. Paz ML, Barrantes FJ. Autoimmune Attack of the Neuromuscular Junction in Myasthenia Gravis: Nicotinic Acetylcholine Receptors and Other Targets. *ACS Chem Neurosci*. 2019;10(5):2186–2194. doi:10.1021/acscchemneuro.9b00041

369. Bajgar J. Organophosphates/nerve agent poisoning: mechanism of action, diagnosis, prophylaxis, and treatment. *Adv Clin Chem.* 2004;38:151–216. doi:10.1016/s0065-2423(04)38006-6
370. Liston DR, Nielsen JA, Villalobos A, et al. Pharmacology of selective acetylcholinesterase inhibitors: implications for use in Alzheimer's disease. *Eur J Pharmacol.* 2004;486(1):9–17. doi:10.1016/j.ejphar.2003.11.080
371. Amat-ur-Rasool H, Ahmed M, Hasnain S, Carter WG. Anti-Cholinesterase Combination Drug Therapy as a Potential Treatment for Alzheimer's Disease. *Brain Sci.* 2021;11(2):184. doi:10.3390/brainsci11020184
372. Cahliková L, Vrabec R, Pidaný F, et al. Recent Progress on Biological Activity of Amaryllidaceae and Further Isoquinoline Alkaloids in Connection with Alzheimer's Disease. *Molecules.* 2021;26(17):5240. doi:10.3390/molecules26175240
373. Sussman JL, Harel M, Frolow F, et al. Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: a prototypic acetylcholine-binding protein. *Science.* 1991;253(5022):872–879. doi:10.1126/science.1678899
374. Cheung J, Rudolph MJ, Burshteyn F, et al. Structures of human acetylcholinesterase in complex with pharmacologically important ligands. *J Med Chem.* 2012;55(22):10282–10286. doi:10.1021/jm300871x
375. Wang X-J, Wu H-X, Ye S-S, Pan L, Qian Y. Expression of recombinant human acetylcholinesterase and its application in screening its inhibitors. *Yao xue xue bao = Acta pharm Sin.* 2014;49:50–54.
376. Wu C, Zhang G, Zhang Z-W, et al. Structure–activity relationship, *in vitro* and *in vivo* evaluation of novel dienyl sulphonyl fluorides as selective BuChE inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease. *J Enzyme Inhib Med Chem.* 2021;36(1):1860–1873. doi:10.1080/14756366.2021.1959571
377. Chlebek J. *Study of biological activity of isolated alkaloids from Corydalis cava (Fumariaceae). Disertační práce.* Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta; 2012. Přístupné 13.4.2022. <https://dspace.cuni.cz/bitstream/handle/20.500.11956/42022/140020028.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
378. Wang R, Reddy PH. Role of Glutamate and NMDA Receptors in Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis.* 2017;57(4):1041–1048. doi:10.3233/JAD-160763
379. Kornhuber J, Wiltfang J, Kornhuber J. The role of glutamate in dementia. *J Neural Transm Suppl.* 1998;53:277–287. doi:10.1007/978-3-7091-6467-9\_24
380. SÚKL. Státní ústav pro kontrolu léčiv. Přístupné 14.12.2022. <https://www.sukl.cz/>
381. Athar T, Al Balushi K, Khan SA. Recent advances on drug development and emerging therapeutic agents for Alzheimer's disease. *Mol Biol Rep.* 2021;48(7):5629–5645. doi:10.1007/s11033-021-06512-9
382. Hernández F, Avila J. The role of glycogen synthase kinase 3 in the early stages of Alzheimers' disease. *FEBS Lett.* 2008;582(28):3848–3854. doi:10.1016/j.febslet.2008.10.026
383. Hooper C, Killick R, Lovestone S. The GSK3 hypothesis of Alzheimer's disease. *J Neurochem.* 2008;104(6):1433–1439. doi:10.1111/j.1471-4159.2007.05194.x
384. Martinez A, Perez DI. GSK-3 inhibitors: a ray of hope for the treatment of Alzheimer's disease? *J Alzheimers Dis.* 2008;15(2):181–191. doi:10.3233/jad-2008-15204
385. Martinez A, Alonso M, Castro A, Perez C, Moreno FJ. First non-ATP competitive glycogen synthase kinase 3 beta (GSK-3 beta) inhibitors: Thiadiazolidinones (TDZD) as potential drugs for the treatment of Alzheimer's disease. *J Med Chem.* 2002;45(6):1292–1299. doi:10.1021/jm011020u
386. Naerum L, Nørskov-Lauritsen L, Olesen PH. Scaffold hopping and optimization towards libraries of glycogen synthase kinase-3 inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett.* 2002;12(11):1525–1528. doi:10.1016/s0960-894x(02)00169-5
387. Leclerc S, Garnier M, Hoessel R, et al. Indirubins inhibit glycogen synthase kinase-3 beta and CDK5/P25, two protein kinases involved in abnormal tau phosphorylation in Alzheimer's disease - A property common to most cyclin-dependent kinase inhibitors? *J Biol Chem.* 2001;276(1):251–260. doi:10.1074/jbc.M002466200
388. Hulcová D, Breiterová K, Siatka T, et al. Amaryllidaceae Alkaloids as Potential Glycogen Synthase Kinase-3 $\beta$  Inhibitors. *Molecules.* 2018;23(4):719. doi:10.3390/molecules23040719
389. Meijer L, Thunnissen AM, White AW, et al. Inhibition of cyclin-dependent kinases, GSK-3 $\beta$  and CK1 by hymenialdisine, a marine sponge constituent. *Chem Biol.* 2000;7(1):51–63. doi:10.1016/S1074-5521(00)00063-6
390. Hamann M, Alonso D, Martín-Aparicio E, et al. Glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) inhibitory activity and structure-activity relationship (SAR) studies of the manzamine alkaloids. Potential for Alzheimer's disease. *J Nat Prod.* 2007;70(9):1397–1405. doi:10.1021/np060092r
391. Svarcbašs R, Jäntti M, Kilpeläinen T, et al. Prolyl oligopeptidase inhibition activates autophagy via protein phosphatase 2A. *Pharmacol Res.* 2020;151:104558. doi:10.1016/j.phrs.2019.104558
392. Szeltner Z, Polgár L. Structure, function and biological relevance of prolyl oligopeptidase. *Curr Protein Pept Sci.* 2008;9(1):96–107. doi:10.2174/138920308783565723
393. Garcia-Horsman JA, Mannisto PT, Venalainen JI. On the role of prolyl oligopeptidase in health and disease. *Neuropeptides.* 2007;41(1):1–24. doi:10.1016/j.npep.2006.10.004
394. Polgár L. The prolyl oligopeptidase family. *Cell Mol Life Sci.* 2002;59(2):349–362. doi:10.1007/s00018-002-8427-5

395. Laitinen KS, van Groen T, Tanila H, Venäläinen J, Männistö PT, Alafuzoff I. Brain prolyl oligopeptidase activity is associated with neuronal damage rather than beta-amyloid accumulation. *Neuroreport*. 2001;12(15):3309–3312. doi:10.1097/00001756-200110290-00032
396. Hannula MJ, Myöhänen TT, Tenorio-Laranga J, Mannisto PT, Garcia-Horsman JA. Prolyl oligopeptidase colocalizes with  $\alpha$ -synuclein,  $\beta$ -amyloid, tau protein and astroglia in the post-mortem brain samples with Parkinson's and Alzheimer's diseases. *Neuroscience*. 2013;242:140–150. doi:10.1016/j.neuroscience.2013.03.049
397. Lambeir AM. Interaction of Prolyl Oligopeptidase with alpha-Synuclein. *CNS Neurol Disord – Drug Targets*. 2011;10(3):349–354. doi:10.2174/187152711794653878
398. Tarrago T, Kichik N, Segui J, Giralt E. The natural product berberine is a human prolyl oligopeptidase inhibitor. *ChemMedChem*. 2007;2(3):354–359. doi:10.1002/cmdc.200600303
399. Tarragó T, Kichik N, Claasen B, Prades R, Teixidó M, Giralt E. Baicalin, a prodrug able to reach the CNS, is a prolyl oligopeptidase inhibitor. *Bioorg Med Chem*. 2008;16(15):7516–7524. doi:10.1016/j.bmc.2008.04.067
400. Hošťálková A, Opletal L, Kuneš J, et al. Alkaloids from *Peumus boldus* and their acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase and prolyl oligopeptidase inhibition activity. *Nat Prod Commun*. 2015;10(4):577–580.
401. Chlebek J, Novák Z, Kassemová D, et al. Isoquinoline Alkaloids from *Fumaria officinalis* L. and Their Biological Activities Related to Alzheimer's Disease. *Chem Biodivers*. 2016;13(1):91–99. doi:10.1002/cbdv.201500033
402. Hulcová D, Maříková J, Korábečný J, et al. Amaryllidaceae alkaloids from *Narcissus pseudonarcissus* L. cv. Dutch Master as potential drugs in treatment of Alzheimer's disease. *Phytochemistry*. 2019;165:112055. doi:10.1016/j.phytochem.2019.112055
403. Chlebek J, Simone A, Hošťálková A, et al. Application of BACE1 immobilized enzyme reactor for the characterization of multifunctional alkaloids from *Corydalis cava* (Fumariaceae) as Alzheimer's disease targets. *Fitoterapia*. 2016;109:241–247. doi:10.1016/j.fitote.2016.01.008
404. Farlow MR, Thompson RE, Wei L-J, et al. A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Phase II Study Assessing Safety, Tolerability, and Efficacy of Bryostatin in the Treatment of Moderately Severe to Severe Alzheimers Disease. *J Alzheimer's Dis*. 2019;67(2):555–570. doi:10.3233/jad-180759
405. Wang X, Kim J-R, Lee S-B, et al. Effects of curcuminoids identified in rhizomes of *Curcuma longa* on BACE-1 inhibitory and behavioral activity and lifespan of Alzheimer's disease *Drosophila* models. *BMC Complement Altern Med*. 2014;14:88. doi:10.1186/1472-6882-14-88
406. Marumoto S, Miyazawa M.  $\beta$ -secretase inhibitory effects of furanocoumarins from the root of *Angelica dahurica*. *Phytother Res*. 2010;24(4):510–513. doi:10.1002/ptr.2967
407. Choi YH, Yoo MY, Choi CW, et al. A new specific BACE-1 inhibitor from the stem bark extract of *Vitis vinifera*. *Planta Med*. 2009;75(5):537–540. doi:10.1055/s-0029-1185311
408. Jeon S-Y, Bae K, Seong Y-H, Song K-S. Green tea catechins as a BACE1 ( $\beta$ -Secretase) inhibitor. *Bioorg Med Chem Lett*. 2003;13(22):3905–3908. doi:10.1016/j.bmcl.2003.09.018
409. Jung HA, Min B-S, Yokozawa T, Lee J-H, Kim YS, Choi JS. Anti-alzheimer and antioxidant activities of coptidis Rhizoma alkaloids. *Biol Pharm Bull*. 2009;32(8):1433–1438. doi:10.1248/bpb.32.1433
410. Cai Z. Monoamine oxidase inhibitors: promising therapeutic agents for Alzheimer's disease (Review). *Mol Med Rep*. 2014;9(5):1533–1541. doi:10.3892/mmr.2014.2040
411. Ramsay RR, Popovic-Nikolic MR, Nikolic K, Uliassi E, Bolognesi ML. A perspective on multi-target drug discovery and design for complex diseases. *Clin Transl Med*. 2018;7(1):3. doi:10.1186/s40169-017-0181-2
412. Schedin-Weiss S, Inoue M, Hromádková L, et al. Monoamine oxidase B is elevated in Alzheimer disease neurons, is associated with  $\gamma$ -secretase and regulates neuronal amyloid  $\beta$ -peptide levels. *Alzheimer's Res Ther*. 2017;9(1):57. doi:10.1186/s13195-017-0279-1
413. Patil PO, Bari SB, Firke SD, Deshmukh PK, Donda ST, Patil DA. A comprehensive review on synthesis and designing aspects of coumarin derivatives as monoamine oxidase inhibitors for depression and Alzheimer's disease. *Bioorg Med Chem*. 2013;21(9):2434–2450. doi:10.1016/j.bmc.2013.02.017
414. Carradori S, D'Ascenzio M, Chimenti P, Secci D, Bolasco A. Selective MAO-B inhibitors: a lesson from natural products. *Mol Divers*. 2014;18(1):219–243. doi:10.1007/s11030-013-9490-6
415. Munier R. Separation of alkaloids and their *N*-oxides by microchromatography on paper. *Bull Soc Chim Biol*. 1953;35:1225.
416. Bouz L. *Biologická aktivita sekundárních metabolitů rostlin V. Alkaloidy Vinca minor L. Diplomová práce*. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta; 2016. Přístupné 11.4.2022. <https://dspace.cuni.cz/handle/20.500.11956/74724>
417. Vítovcová A. *Biologická aktivita sekundárních metabolitů rostlin IV. Alkaloidy Vinca minor L. Diplomová práce*. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta; 2016. Přístupné 11.4.2022. <https://dspace.cuni.cz/handle/20.500.11956/77529>
418. Kučerová J. *Biologická aktivita sekundárních metabolitů rostlin VI. Alkaloidy Vinca minor L. Diplomová práce*. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta; 2016. Přístupné 11.4.2022. <https://dspace.cuni.cz/handle/20.500.11956/77535>

419. Marečková L. *Biologická aktivita sekundárních metabolitů rostlin VII. Alkaloidy Vinca minor L. Diplomová práce.* Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta; 2018. Přístupné 11.4.2022. <https://dspace.cuni.cz/handle/20.500.11956/101639>
420. Vrabec R, Maříková J, Ločárek M, et al. Monoterpene indole alkaloids from *Vinca minor* L. (Apocynaceae): Identification of new structural scaffold for treatment of Alzheimer's disease. *Phytochemistry*. 2021;194:113017. doi:10.1016/j.phytochem.2021.113017
421. Baki A, Bielík A, Molnár L, Szendrei G, Keserü GM. A High Throughput Luminescent Assay for Glycogen Synthase Kinase-3 $\beta$  Inhibitors. *Assay Drug Dev Technol*. 2007;5(1):75–84. doi:10.1089/adt.2006.029
422. Havelek R, Seifrtová M, Kralovec K, et al. The effect of Amaryllidaceae alkaloids haemanthamine and haemanthidine on cell cycle progression and apoptosis in p53-negative human leukemic Jurkat cells. *Phytomedicine*. 2014;21(4):479–490. doi:10.1016/j.phymed.2013.09.005
423. Havelek R, Muthna D, Tomšík P, et al. Anticancer potential of Amaryllidaceae alkaloids evaluated by screening with a panel of human cells, real-time cellular analysis and Ehrlich tumor-bearing mice. *Chem Biol Interact*. 2017;275:121–132. doi:10.1016/j.cbi.2017.07.018
424. BioVision I. Ready-to-use Cell Proliferation Colorimetric Reagent, WST-1. Přístupné 14.12.2021. <https://www.biovision.com/ready-to-use-cell-proliferation-colorimetric-reagent-wst-1.html>
425. Di L, Kerns EH, Fan K, McConnell OJ, Carter GT. High throughput artificial membrane permeability assay for blood–brain barrier. *Eur J Med Chem*. 2003;38(3):223–232. doi:10.1016/S0223-5234(03)00012-6
426. Hošťálková A, Maříková J, Opletal L, et al. Isoquinoline Alkaloids from *Berberis vulgaris* as Potential Lead Compounds for the Treatment of Alzheimer's Disease. *J Nat Prod*. 2019;82(2):239–248. doi:10.1021/acs.jnatprod.8b00592
427. Nachon F, Carletti E, Ronco C, et al. Crystal structures of human cholinesterases in complex with huprine W and tacrine: elements of specificity for anti-Alzheimer's drugs targeting acetyl- and butyryl-cholinesterase. *Biochem J*. 2013;453(3):393–399. doi:10.1042/bj20130013
428. Soukup O, Jun D, Žďárová-Karasová J, et al. A resurrection of 7-MEOTA: a comparison with tacrine. *Curr Alzheimer Res*. 2013;10(8):893–906. doi:10.2174/1567205011310080011
429. Tan PW, Seayad J, Dixon DJ. Expedient and Divergent Total Syntheses of *Aspidosperma* Alkaloids Exploiting Iridium(I)-Catalyzed Generation of Reactive Enamine Intermediates. *Angew Chem Int Ed*. 2016;55(43):13436–13440. doi:10.1002/anie.201605503
430. Li G, Piemontesi C, Wang Q, Zhu JP. Stereoselective Total Synthesis of Eburnane-Type Alkaloids Enabled by Conformation-Directed Cyclization and Rearrangement. *Angew Chem Int Ed*. 2019;58(9):2870–2874. doi:10.1002/anie.201813920
431. Mokry J, Kompiš I, Šefčovič P. The structural and biogenetical relationship of vincamine, vincanorine, and eburnamonine. *Tetrahedron Lett*. 1962;3(10):433–437. doi:10.1016/s0040-4039(00)70897-5
432. Kuehne ME, Huebner JA, Matsko TH. Studies in biomimetic alkaloid syntheses. 4. An alternative route to secodine intermediates providing syntheses of minovine, vincadifformine, ervinceine, and N(a)-methylervinceine. *J Org Chem*. 1979;44(14):2477–2480. doi:10.1021/jo01328a030
433. Kutney JP, Bunzli-Trepp U, Chan KK, et al. Total synthesis of indole and dihydroindole alkaloids. 14. A total synthesis of vindoline. *J Am Chem Soc*. 1978;100(13):4220–4224. doi:10.1021/ja00481a035
434. Ali E, Chakraborty PK, Chakravarty AK, Pakrashi SC. Synthesis and Stereochemistry of ( $\pm$ )-Vincatine. *Heterocycles*. 1982;19(9):1667–1671. doi:10.3987/R-1982-09-1667
435. Danieli B, Lesma G, Palmisano G, Riva R, Tollari S. Absolute Configuration of (–)-Vincatine, the Unique 2,16-Seco *Aspidosperma* Alkaloid. *J Org Chem*. 1984;49(3):547–551. doi:10.1021/jo00177a033
436. Kalaus G, Juhasz I, Greiner I, et al. Synthesis of vinca alkaloids and related compounds. 90. New results in the synthesis of alkaloids with the aspidospermane skeleton. First total synthesis of ( $\pm$ )-3-oxominovincine. *J Org Chem*. 1997;62(26):9188–9191. doi:10.1021/jo9713464
437. Laforteza BN, Pickworth M, MacMillan DWC. Enantioselective Total Synthesis of (–)-Minovincine in Nine Chemical Steps: An Approach to Ketone Activation in Cascade Catalysis. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2013;52(43):11269–11272. doi:10.1002/anie.201305171
438. Varga S, Angyal P, Martin G, Egyed O, Holczbauer T, Soós T. Total Syntheses of (–)-Minovincine and (–)-Aspidofractinine through a Sequence of Cascade Reactions. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2020;59(32):13547–13551. doi:10.1002/anie.202004769
439. Doepke W, Meisel H. 16-Methoxyvincadifformine, a new alkaloid from *Vinca minor*. *Pharmazie*. 1968;23(9):521–522.
440. Atta-ur-Rahman, Abbas SA, Nighat F, et al. Chemical-constituents of *Alstonia macrophylla*. *J Nat Prod*. 1991;54(3):750–754. doi:10.1021/np50075a002
441. Horning BD, MacMillan DWC. Nine-Step Enantioselective Total Synthesis of (–)-Vincorine. *J Am Chem Soc*. 2013;135(17):6442–6445. doi:10.1021/ja402933s



442. Williams D, Qu Y, Simionescu R, De Luca V. The assembly of (+)-vincadifformine- and (-)-tabersonine-derived monoterpene indole alkaloids in *Catharanthus roseus* involves separate branch pathways. *Plant J*. 2019;99(4):626–636. doi:10.1111/tj.14346
443. Zeng X, Shukla V, Boger DL. Divergent Total Syntheses of (-)-Pseudocopsinine and (-)-Minovincinine. *J Org Chem*. 2020;85(23):14817–14826. doi:10.1021/acs.joc.0c02493
444. Kim J-Y, Suhl C-H, Lee J-H, Cho C-G. Directed Fischer Indolization as an Approach to the Total Syntheses of (+)-Aspidospermidine and (-)-Tabersonine. *Org Lett*. 2017;19(22):6168–6171. doi:10.1021/acs.orglett.7b03078
445. Ma HC, Xie XG, Jing P, Zhang WW, She XG. Concise total synthesis of (±)-aspidospermidine. *Org Biomol Chem*. 2015;13(18):5255–5259. doi:10.1039/c5ob00228a
446. Xu H, Huang H, Zhao C, Song C, Chang J. Total Synthesis of (+)-Aspidospermidine. *Org Lett*. 2019;21(16):6457–6460. doi:10.1021/acs.orglett.9b02346
447. Hong AY, Vanderwal CD. A sequential cycloaddition strategy for the synthesis of Alsmaphorazine B traces a path through a family of *Alstonia* alkaloids. *Tetrahedron*. 2017;73(29):4160–4171. doi:10.1016/j.tet.2016.11.004
448. Martin CL, Nakamura S, Otte R, Overman LE. Total Synthesis of (+)-Condylocarpine, (+)-Isocondylocarpine, and (+)-Tubotaiwine. *Org Lett*. 2011;13(1):138–141. doi:10.1021/ol102709s
449. Sierra P, Novotný L, Samek Z, Buděšínský M, Dolejš L, Bláha K. Plant-substances. 46. Alkaloids of *Rauvolfia salicifolia* Griseb species. *Collect Czech Chem Commun*. 1982;47(11):2912–2921. doi:10.1135/cccc19822912
450. Mamatas-Kalamaras S, Sévenet T, Thal C, Potier P. Alcaloïdes d'*Alstonia quaternata*. *Phytochemistry*. 1975;14(8):1849–1854. doi:10.1016/0031-9422(75)85309-X
451. Atta-ur-Rahman, Zaman K, Perveen S, et al. Alkaloids from *Rhazya stricta*. *Phytochemistry*. 1991;30(4):1285–1293. doi:10.1016/s0031-9422(00)95218-x
452. Aclinou P, Massiot G, Menhour B. Total Synthesis of Crooksine. *Nat Prod Lett*. 1994;5(3):197–200. doi:10.1080/10575639408044059
453. Yagudaev MR. The NMR study of alkaloids. VI. A comparison of the stereochemistries of pseudocopsinine and 14,15-dihydrovindoline by <sup>13</sup>C NMR spectroscopy. *Chem Nat Compd*. 1984;20(3):311–314. doi:10.1007/BF00575755
454. Chen ZT, Xiao T, Tang P, Zhang D, Qin Y. Total synthesis of akuammiline alkaloid (+)-strictamine. *Tetrahedron*. 2018;74(11):1129–1134. doi:10.1016/j.tet.2018.01.034
455. Wenkert E, Liu S. Total Synthesis of (±)-Aspidofractinine and (±)-Aspidospermidine. *J Org Chem*. 1994;59(25):7677–7682. doi:10.1021/jo00104a023
456. Kunwittaya S, Nantasenamat C, Treeratanapiboon L, Srisarin A, Isarankura-Na-Ayudhya C, Prachayasittikul V. Influence of logBB cut-off on the prediction of blood-brain barrier permeability. *Biomed Appl Technol J*. 2013;1:16–34.
457. Shi B-B, Chen J, Bao M-F, Zeng Y, Cai X-H. Alkaloids isolated from *Tabernaemontana bufalina* display xanthine oxidase inhibitory activity. *Phytochemistry*. 2019;166:112060. doi:10.1016/j.phytochem.2019.112060
458. Abdbl-Mogib M, Basaif SA, Ezmirly ST. Aspidospermidine and dehydroaspidospermidine from *Rhazya stricta*. *J Saudi Chem Soc*. 1998;2(2):141–143.
459. Wong S-K, Yeap JS-Y, Tan C-H, et al. Arbolodinines A-C, biologically-active aspidofractinine-aspidofractinine, aspidofractinine-strychnan, and kopsine-strychnan bisindole alkaloids from *Kopsia arborea*. *Tetrahedron*. 2021;78:131802. doi:10.1016/j.tet.2020.131802
460. Jacquier MJ, Vercauteren J, Massiot G, Le Men-Olivier L, Puset J, Sevenet T. Alkaloids of *Alstonia plumosa*. *Phytochemistry*. 1982;21(12):2973–2977.
461. Crooks PA, Robinson B, Smith GF. Isolation and structure of an indole alkaloid of biogenetic interest from *Tabernaemontana cumminsii*. *Chem Commun (London)*. 1968;963(20):1210. doi:10.1039/c19680001210
462. Robert GMT, Ahond A, Poupat C, et al. *Aspidosperma* from Guiana: alkaloids from *Aspidosperma marcgravianum*. *J Nat Prod*. 1983;46(5):694–707. doi:10.1021/np50029a018
463. Palmisano G, Santagostino M, Riva S, Sisti M. Indole alkaloids – enantiocontrolled synthesis and absolute-configuration of (+)-decarbomethoxy-15,20-16,17-tetrahydrosecodeine. *Tetrahedron Asymmetry*. 1995;6(6):1229–1232. doi:10.1016/0957-4166(95)00150-n
464. Amat M, Escolano C, Llor NR, et al. Alkylation of phenylglycinol-derived bicyclic lactams. Enantioselective synthesis of 3-alkylpiperidines. *Arkivoc*. 2005:115–123. doi:10.3998/ark.5550190.0006.912
465. Tarrago T, Kichik N, Segui J, Giralt E. The Natural Product Berberine is a Human Prolyl Oligopeptidase Inhibitor. *ChemMedChem*. 2007;2:354–359. doi:10.1002/cmdc.200600303
466. Pauwels O, Kiss R, Pasteels JL, Atassi G. Cytotoxicity, cell cycle kinetics and morphonuclear-induced effects of *Vinca* alkaloid anticancer agents. *J Pharm Pharmacol*. 1995;47(10):870–875. doi:10.1111/j.2042-7158.1995.tb05756.x
467. Vašíčková A. *Alkaloidy Vinca minor L. a jejich biologická aktivita (inhibice lidských cholinesteras) V. Diplomová práce*. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta; 2020. Přístupné 12.4.2022. <https://dspace.cuni.cz/handle/20.500.11956/118052>

468. Hojgrová V. *Alkaloidy Vinca minor L. a jejich biologická aktivita VIII. Diplomová práce*. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta; 2021. Přístupné 12.4.2022. <https://dspace.cuni.cz/handle/20.500.11956/126045>
469. Šípková P. *Biologická aktivita sekundárních metabolitů rostlin X. Alkaloidy Vinca minor L. Diplomová práce*. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta; 2019. Přístupné 12.4.2022. <https://dspace.cuni.cz/handle/20.500.11956/108788>
470. Pavuková S. *Alkaloidy Vinca minor L. a ich biologická aktivita II. Diplomová práce*. Univerzita Karlova; 2021. Přístupné 12.4.2022. <https://dspace.cuni.cz/handle/20.500.11956/126026>
471. Klátilová A. *Alkaloidy Vinca minor (Apocynaceae) a jejich biologická aktivita. Diplomová práce*. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta; 2018. Přístupné 12.4.2022. <https://dspace.cuni.cz/handle/20.500.11956/102704>
472. Valová D. *Alkaloidy Vinca minor L. a jejich biologická aktivita III. Diplomová práce*. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta; 2020. Přístupné 12.4.2022. <https://dspace.cuni.cz/handle/20.500.11956/118036>
473. Jurkaninová M. *Alkaloidy Vinca minor L. a jejich biologická aktivita I. Diplomová práce*. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta; 2019. Přístupné 12.4.2022. <https://dspace.cuni.cz/handle/20.500.11956/109659>

# 10 PŘEHLED PUBLIKACÍ, KONFERENCÍ A STÁŽÍ

## 10.1 Původní práce

Vrabec R, Maříková J, Ločárek M, et al. Monoterpene indole alkaloids from *Vinca minor* L. (Apocynaceae): Identification of new structural scaffold for treatment of Alzheimer's disease. *Phytochemistry*. 2022;194:113017. doi:10.1016/j.phytochem.2021.113017 (IF<sub>2020</sub> = 4,072)

**Podíl na práci při:** izolaci alkaloidů, měření a interpretaci NMR a MS spekter, měření optické otáčivosti, přípravě a editaci rukopisu.

Vrabec R, Vokurková D, Tůmová L, Cheel J. *Ex-vivo* Immune-stimulating Activity of *Scutellaria baicalensis* and Its Major Flavonoids on Human Immune Cells. *Rec Nat Prod*. 2022;16(2):188–193. doi:10.25135/rnp.264.21.02.1976 (IF<sub>2020</sub> = 1,735)

**Podíl na práci při:** laboratorním zpracování materiálu, měření dat a psaní rukopisu.

Cahlíková L, Vrabec R, Pidaný F, et al. Recent Progress on Biological Activity of Amaryllidaceae and Further Isoquinoline Alkaloids in Connection with Alzheimer's Disease. *Molecules*. 2021;26(17):5240. doi:10.3390/molecules26175240 (IF<sub>2020</sub> = 4,412)

**Podíl na práci při:** metodologii, formální analýze, průzkumu, přípravě a editaci rukopisu.

## 10.2 Konference

### 10.2.1 Krátké ústní přednášky

Vrabec R, Maříková J, Korábečný J, et al. Alkaloids of *Vinca minor* L. – Identification of new anti-Alzheimer's structural scaffold. prezentováno na: 12. Postgraduální a 10. Postdoktorandská konference; 2022; Hradec Králové, Česká republika.

Vrabec R, Opletal L, Ločárek M, et al. Isolation of alkaloids from *Vinca minor* L. and their inhibitory activity on human cholinesterases. prezentováno na: 10. Postgraduální a 8. Postdoktorandská konference; 2020; Hradec Králové, Česká republika.

Vrabec R, Vokurková D, Tůmová L, Cheel J. Immunomodulation activity of *Scutellaria baicalensis* and *Azorella compacta*. prezentováno na: 9. Postgraduální a 7. Postdoktorandská konference; 2019; Hradec Králové, Česká republika.

### 10.2.2 Krátké online přednášky

Vrabec R, Maříková J, Korábečný J, et al. Indole alkaloid from *Vinca minor* L. with promising activity against Alzheimer's disease. prezentováno na: 49 konference Syntéza a analýza léčiv; 2021; Hradec Králové, Česká republika.

Vrabec R, Hulcová D, Maříková J, et al. Indole alkaloids from *Vinca minor* L. and their biological activity. prezentováno na: 11. Postgraduální a 9. Postdoktorandská konference; 2021; Hradec Králové, Česká republika.

### 10.2.3 Postery

Vrabec R, Opletal L, Ločárek M, Jenčo J, Kuneš J. Inhibiční aktivita alkaloidů z *Vinca minor* L. proti lidským cholinesterasám. prezentováno na: 48. konference Syntéza a analýza léčiv; 2019; Bratislava, Slovenská republika.

Vrabec R, Vokurková D, Tůmová L, Cheel J. Immunomodulační aktivita *Scutellaria baicalensis* a *Azorella compacta*. prezentováno na: 23. seminář spolku Pelero – Aktuální otázky pěstování léčivých, aromatických a kořeninových rostlin; 2018; Olomouc, Česká republika.

## 10.3 Stáž

Tříměsíční stáž pod programem Erasmus+ proběhla ve výzkumné skupině Medicinální Chemie prof. Wolfganga Sippla na Institutu Farmacie Univerzity Martina-Luthera v Halle, Spolková republika Německo, v období od 1.11.2021 do 31.1.2022. Část skupiny, ve které se stáž uskutečnila, se věnuje vývoji léčiv pomocí *in silico* metod jako je molekulární docking, molekulární dynamika, virtuální screening aj.