

UNIVERZITA KARLOVA  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ  
Katedra farmakognozie a farmaceutické botaniky



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

DIPLOMOVÁ PRÁCE  
Bc. MARKÉTA VLKOVÁ

Vedoucí diplomové práce:

PharmDr. Marcela Šafratová, Ph.D.

Konzultant:

PharmDr. Rudolf Vrabec, Ph.D.

## **PROHLÁŠENÍ**

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

**Hradec Králové, 2022**

**Bc. Markéta Vlková**

## **PODĚKOVÁNÍ**

Chtěla bych poděkovat vedoucí mé diplomové práce PharmDr. Marcele Šafratové, Ph.D. za pomoc a vstřícnost při jejím vedení a čas který mi věnovala při řešení experimentální části. Také bych ráda poděkovala PharmDr. Rudolfu Vrabcovi, Ph.D. za velkou ochotu, trpělivost a cenné rady při práci v laboratoři a při vypracování mé diplomové práce.

Dále děkuji doc. PharmDr. Jakobovi Chlebkovi, Ph.D. za pomoc s flash chromatografií, PharmDr. Janě Křoustkové, Ph.D. a doc. Kunešovi za změření a interpretaci NMR spekter, PharmDr. Kateřině Hradiské Breiterové, Ph.D. za změření cytotoxicity na buněčných liniích HepG2 a PharmDr. Daniele Suchánkové, Ph.D. za stanovení anticholinestrasové aktivity.

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

## Obsah

<b>SEZNAM OBRÁZKŮ .....</b>	<b>6</b>
<b>SEZNAM TABULEK.....</b>	<b>6</b>
<b>SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK .....</b>	<b>7</b>
<b>1 ÚVOD.....</b>	<b>9</b>
<b>2 CÍL PRÁCE.....</b>	<b>11</b>
<b>3 TEORETICKÁ ČÁST.....</b>	<b>12</b>
3.1 Čeleď apocynaceae.....	12
3.1.1 Botanický popis a morfologie.....	12
3.1.2 Biologicky nejvýznamnější druhy .....	12
3.2 Rod <i>Geissospermum</i> Allemão .....	18
3.2.1 <i>Geissospermum vellosii</i> Allemão .....	19
3.2.2 <i>Geissospermum argenteum</i> Woodson.....	28
3.2.3 <i>Geissospermum reticulatum</i> A.H.Gentry.....	30
3.2.4 <i>Geissospermum sericeum</i> Benth. et Hook.f. ex Miers .....	31
3.2.5 <i>Geissospermum urceolatum</i> A.H.Gentry.....	32
3.3 Alzheimerova choroba.....	34
3.3.1 Popis .....	34
3.3.2 Epidemiologie.....	34
3.3.3 Etiologie.....	34
3.3.4 Neuropatologie a patofyziologie.....	35
3.3.5 Farmakologická léčba .....	37
<b>4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....</b>	<b>40</b>
4.1 Použitý materiál a vybavení.....	40
4.1.1 Rozpouštědla .....	40
4.1.2 Chemikálie .....	40
4.1.3 Detekční činidla .....	40
4.1.4 Pomocný materiál .....	41
4.1.5 Vytvíjecí soustavy pro chromatografii na tenké vrstvě .....	41
4.1.6 Přístrojové vybavení.....	41
4.1.7 Rostlinný materiál .....	42

4.2	Všeobecné postupy .....	43
4.2.1	Příprava rozpouštědel .....	43
4.2.2	Uchovávání vzorků .....	43
4.2.3	Detekce alkaloidů .....	43
4.2.4	Chromatografie .....	43
4.2.5	GC/MS-EI – stanovení čistoty a struktury .....	45
4.2.6	NMR analýza.....	45
4.2.7	Optická otáčivost.....	45
4.3	Izolace alkaloidů z frakce GV-3 .....	47
4.3.1	Příprava roztěru pro flash chromatografii .....	47
4.3.2	Flash chromatografie .....	47
4.4	Stanovení biologické aktivity .....	52
4.4.1	Stanovení anticholinesterasové aktivity .....	52
4.4.2	Stanovení cytotoxicity .....	54
<b>5</b>	<b>VÝSLEDKY.....</b>	<b>55</b>
5.1	Izolované alkaloidy .....	55
5.1.1	1,2-DIDEHYDROASPIDOSPERMIDIN (GV3-C1-A-1).....	55
5.1.2	ZENKEREN (GV3-J1) .....	56
5.1.3	19,20-DIHYDROVINKANIN (GV3-J2) .....	57
5.2	Stanovení biologické aktivity .....	58
5.2.1	Výsledky inhibiční aktivity vůči cholinesterasám .....	58
5.2.2	Výsledky cytotoxicity .....	59
<b>6</b>	<b>ZÁVĚR A DISKUZE .....</b>	<b>60</b>
<b>7</b>	<b>REFERENCE.....</b>	<b>62</b>
<b>8</b>	<b>ABSTRAKT .....</b>	<b>69</b>
<b>9</b>	<b>ABSTRACT .....</b>	<b>70</b>

## SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 <i>Catharanthus roseus</i> (L.) G.Don. (15).....	13
Obrázek 2 <i>Rauwolfia serpentina</i> (L.) Benth., (18) .....	13
Obrázek 3 <i>Vinca minor</i> L. (21) .....	14
Obrázek 4 <i>Strophanthus gratus</i> Baill. (23) .....	15
Obrázek 5 <i>Tabernanthe iboga</i> Baill. (26).....	15
Obrázek 6 <i>Alstonia scholaris</i> (L.) R.Br. (29) .....	16
Obrázek 7 <i>Nerium oleander</i> L. (32) .....	17
Obrázek 8 <i>G. vellosii</i> Allemão (37).....	20
Obrázek 9 GV, větev (37) (vlevo), květ (vpravo) (38) .....	21
Obrázek 10 Stavba květu a listu <i>G. argenteum</i> Woodson (60) .....	29
Obrázek 11 Kontrolní TLC chromatogram s alkaloidů v jednotlivých frakcích po detekci.....	48
Obrázek 12 TLC izolovaných alkaloidů C1-a-1 (nalevo) a J1,J2 (napravo).....	51

## SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Struktury indolových alkaloidů druhu <i>G. vellosii</i> Allemão.....	22
Tabulka 2: Současná farmakoterapie .....	38
Tabulka 3: Složení mobilní fáze při flash chromatografii a rozdělení frakce GV-3 .....	48
Tabulka 4: Rozdělení podfrakce C preparativní TLC.....	49
Tabulka 5: Rozdělení podfrakce C1 preparativní TLC.....	49
Tabulka 6: Výsledky inhibiční aktivity izolovaných alkaloidů vůči cholinesterasám .....	58
Tabulka 7: Výsledky inhibiční aktivity izolovaných alkaloidů vůči cholinesterasám .....	58
Tabulka 8: Výsledné hodnoty cytotoxicity izolovaných alkaloidů.....	59

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ACS	Americká chemická společnost
AD	Alzheimerova demence
ACh	acetylcholin
AChE	acetylcholinesterasa
AKT/p38	signální dráha v keratinocytové buněčné linii
Apo E	apolipoprotein E
APP	amyloidní prekurzorový protein
ATChI	acetylthiocholin jodid
A $\beta$	$\beta$ -amyloid
BChE	butyrylcholinesterasa
BuTChI	butyrylthiocholin jodid
CD3+	proteinový komplex T buněk
CoA	koenzym A
E4/E4	izoformu proteinu apolipoproteinu
ECACC	Evropská sbírka ověřených buněčných kultur
<i>EeAChE</i>	acetylcholinesterasa z koňského séra
EPR	elektronová paramagnetická rezonance
<i>EqBChE</i>	butyrylcholinesterasa z koňského séra
F254	fluorescenční indikátor
FRAP	schopnost plazmy redukovat železité ionty
G2/M	G2 fáze/mitotická fáze
GAE	ekvivalent kyseliny gallové mg/kg
GC	plynová chromatografie
GI <sub>50</sub>	koncentrace, která způsobí 50% inhibici růstu buněk
GV	<i>Geissospermum vellosii</i>
<i>hAChE</i>	lidská acetylcholinesterasa
<i>hBChE</i>	lidská butyrylcholinesterasa
HepG2	buněčná linie hepatokarcinomu
IC <sub>50</sub>	inhibiční koncentrace látky při které je inhibováno 50 % enzymu

IL-6	interleukin 6, pleiotropní prozánětlivý cytokin
JAK	Janus kinázy
STAT	signální transduktor a aktivátor transkripce
KI	kmen chlorochin senzitivní <i>Plasmodium falciparum</i>
MAPK	mitogenem aktivovaná proteinkinasa
ERK1/2	kinasa regulovaná buněčným signálem 1 a 2
MS-EI	hmotnostní spektrometrie – elektronová ionizace
MTT	thiazolyl blue tetrazolium bromid
NMDA	<i>N</i> -methyl-D-aspartátový receptor
NMR	nukleární magnetická rezonance
ORAC	absorpční kapacita kyslíkových radikálů
ORSA	oxacillin-rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i>
p. a.	pro analýzu
p53-p21	tumor supresorový gen – protein, cyklin-dependentních kinas
PSEN1, 2	presenilin 1, 2
T9-96	chlorochin rezistentní kmen <i>Plasmodium falciparum</i>
TLC	tenkovrstvá chromatografie
TNF- $\alpha$	tumor nekrotizující faktor $\alpha$
UV	ultrafialové záření
WCSP	Světový kontrolní seznam vybraných rodin rostlin
$\Delta$ ABL	pokles absorbance slepého vzorku během 1 min
$\Delta$ ASA	absorbance testovaného vzorku během 1 min



# 1 ÚVOD

Znalost rostlin a jejich využití sehrála v historii přírodních léčiv významnou roli, přičemž většina světové populace stále spoléhá na tradiční léčiva z přírodních produktů a léčivých rostlin. Mnohé rostliny jsou často sušeny a případně mohou být dále zpracovány na extrakty - výsledná forma se označuje jako droga. V této formě rostliny posloužily jako suroviny pro izolaci účinných látek uplatňující se v terapii nejrůznějších nemocí. Ve své době měly rozhodující postavení a mnohé z nich nepřestaly být v okruhu zájmu výzkumu přírodních látek ani dnes (1). Na to poukazuje i fakt, že analýza přírodních produktů je esenciální částí vývoje nových léčiv (2).

Podstatnou část z přírodních léčivých látek tvoří početná skupina alkaloidů. Jedná se o chemicky velmi různorodé substance, mezi které se tradičně a konvenčně řadí primárně látky s obsahem dusíku. Počátky výzkumu alkaloidů spadají nejspíše do roku 1817, kdy byl prvně izolován morfin. V posledních desetiletích byly studovány alkaloidy v tisících druzích rostlin, a i přesto je alkaloidů s přínosným farmakologickým a terapeutickým účinkem velmi málo. Mnoho alkaloidů bylo také již plně chemicky syntetizováno, avšak z finančních důvodů je získávání látek z biologických zdrojů stále v popředí (3).

Cílem této diplomové práce byla izolace a biologická studie alkaloidů jihoamerického druhu *Geissospermum vellosii* Allemão (GV). U několika druhů rodu *Geissospermum* byly zaznamenány léčivé a preventivní účinky v tradiční medicíně, což podnítilo následné vědecké výzkumy k jejich bližšímu prostudování. První záznamy pochází již ze čtyřicátých let 19. století, kdy byla ze stromu GV v Brazílii izolována směs alkaloidů nazvána pereirine (4). Postupem let byly izolovány jednotlivé alkaloidy, především indolové, u kterých byly testovány biologické aktivity. Potvrzeny byly aktivity antimalarické, protizánětlivé, antinocicepční, antineoplastické a anticholinesterasové.

Anticholinesterasová aktivita je podstatná pro léčbu Alzheimerovy demence (AD), která představuje závažný problém pro budoucí generace a je považována za globální problém veřejného zdraví. AD je nemoc spojená s vyšším věkem a tvoří přibližně 60 % všech demencí. Populace v Evropě stárne, čímž se zvyšuje počet osob trpící AD. Zdvojnásobení či ztrojnásobení počtu nemocných bude v budoucnu znamenat velkou finanční zátěž na zdravotnictví a vysoké nároky na pečovatelskou službu. Až u 70 % lidí je pravděpodobně diagnostikována AD příliš

pozdě, v pokročilé fázi nemoci, kdy je těžké léčivě zpomalit její průběh a zachovat soběstačnost pacientů.

V současnosti probíhá intenzivní výzkum potenciálních léčiv. Dostupná léčiva tlumí pouze příznaky onemocnění a neřeší jeho komplexní podstatu. V příštích 10 letech nelze pravděpodobně očekávat, že by bylo vyvinuto léčivo řešící podstatu AD, ale mohou se objevit léčiva, která by významně zlepšila symptomatickou léčbu (5).

## 2 CÍL PRÁCE

- 1) Zpracování literární rešerše o druhu GV a jeho účincích.
- 2) Izolace alkaloidů z frakce GV-3 získané po sloupcové chromatografii etherového výtřepku.
- 3) Získání několika čistých alkaloidů v dostatečném množství pro biologické testy.
- 4) Určení struktury izolovaných látek na základě jejich fyzikálně-chemických vlastností.
- 5) Stanovení biologické aktivity a vyhodnocení výsledků.

## 3 TEORETICKÁ ČÁST

### 3.1 ČELEĎ APOCYNACEAE

#### 3.1.1 Botanický popis a morfologie

Čeleď Apocynaceae (toješťovité) patří mezi deset nejpočetnějších čeledí kvetoucích rostlin zahrnující 400 rodů a asi 4500 druhů. Čeleď se vyskytuje převážně v subtropích a tropických oblastech. Jedním ze zástupců hojně rostoucí v naší oblasti je např. barvínek menší (*Vinca minor* L.). Čeleď Apocynaceae zahrnuje mnoho keřů, polokeřů, stromů, vytrvalých bylin, sukulentů a lián (6; 7). V tropických oblastech převládají nejvíce liány (8). Vědce vždy fascinovaly rostliny z této čeledi především jako rozsáhlý zdroj významných látek nacházející uplatnění ve vědě a medicíně. Mezi tyto látky patří zejména alkaloidy, na které je tato čeleď bohatá. S vysokým obsahem alkaloidů ale v mnoha případech souvisí i toxicita. Řada druhů se vyznačuje svými atraktivně vypadajícími květy a listy, proto našla své místo rovněž mezi okrasnými rostlinami (9).

Nejobecnější popis čeledi Apocynaceae uvádí tyto charakteristiky – listy většinou bývají jednoduché, nedělené, v postavení vstřícném, přeslenitém nebo vzácně střídavém. Čepele jsou celokrajné, někdy zubaté se zpeřenou žilnatinou. Palisty vždy chybí nebo se vyskytují jako trny. V pletivech lze nalézt nečlánkované mléčnice, díky kterým se u většiny zástupců vylučuje z větví či stonků latex. Pětčetné květy jsou oboupohlavné, pravidelné, rostou jednotlivě nebo uspořádaně do různých vrcholičnatých květenství. Mají trubicovitý nebo zvonkovitý kalich, součástí bývají i nektaria. Koruna má nálevkovitý, kulovitý tvar a má navzájem srostlé korunní lístky (10). Plody jsou měchýřky, bobule či peckovice rostoucí v párech. Měchýřky se při zrání otevírají a uvolňují křídlatá nebo ochmýřená semena. U některých rodů bývají také semena zploštělá, nebo vyplněná olejovitým endospermem (9; 11; 12).

#### 3.1.2 Biologicky nejvýznamnější druhy

Z hlediska obsahových látek, uplatňující se v lékařství či léčitelství, můžeme jako významné zástupce uvést *Catharanthus roseus* (L.) G.Don, *Vinca minor* L., *Rauwolfia serpentina* (L.) Benth ex Kurz., *Strophantus gratus* Baill., *Alstonia scholaris* (L.) R.Br., *Nerium oleander* L. a *Taberanthé iboga* Baill.

***Catharanthus roseus* (L.) G.Don** (barvínek růžový) (Obrázek 1) obsahuje přibližně 130 monoterpenových indolových alkaloidů. Jedná se o tropickou rostlinu s růžovofialovými květy.

V tradičním indickém lékařství se rostlina používala k léčbě malárie, Hodgkinova lymfomu a také diabetu, ačkoliv bylo vědecky vyvráceno, že by měla jakýkoliv vliv na snížení hladiny cukru v krvi (13). Především je však hlavním zdrojem bioaktivních látek vinblastinu a vinkristinu, které jsou klíčové v konvenční léčbě různých typů rakoviny, nejčastěji leukémie (14).



Obrázek 1 *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. (15)

**Rod *Rauwolfia* L.** se nachází v tropických oblastech Afriky, Asie a latinské Ameriky. V Indii se stala nejčastěji používaným druhem *R. serpentina* (L.) Benth. ex Kurz. (zmijovice hadová) (Obrázek 2). Z kořenů tohoto keře byly získány extrakty obsahující velké procento alkaloidů reserpinu, ajmalicinu, ajmalinu, serpentinu, vomilinu, yohimbinu a řady dalších, které v minulosti našly uplatnění v léčbě hypertenze, neurologických a psychických nemocí. Z důvodu značného zájmu a používání se z něj v současnosti stal ohrožený druh, a proto se tyto alkaloidy začaly také v menším množství získávat z *Rauwolfia hookeri* S.R.Sriniv. & Chithra, *R. micrantha* Hook. fil., *R. tetraphylla* L. a *R. vomitoria* Afzel. (16; 17).



Obrázek 2 *Rauwolfia serpentina* (L.) Benth., (18)

***Vinca minor* L.** (barvínek menší) (Obrázek 3) původně pochází z oblasti severního Španělska, západní Francie a dalších zemí směřujících na východ přes jižní a střední Evropu až po Kavkaz. Postupně byl rozšířen do zbylých částí Evropy a dalších kontinentů. V listech této nízké rostliny s modrofialovými květy je obsaženo vysoké procento indolových alkaloidů erbunaminového typu – vinkaminu a vinkadiforminu. V lidovém léčitelství se rostlina užívala při potížích s prokrvením, na podporu metabolismu mozku, při ztrátách paměti, hypertenzi a některých zánětlivých onemocnění. Vinkamin má vasodilatační účinky a zvyšuje průtok krve v mozku (19; 20).



Obrázek 3 *Vinca minor* L. (21)

***Strophantus gratus* Baill.** (krutikvět cenný) (Obrázek 4) je mohutný liánovitý keř rostoucí v jižní a západní Africe. Některé odrůdy lze také najít v Asii. Domorodí lidé rostlinu využívali při ošetření hadího kousnutí nebo jako šípový jed při lovu. Předpokládané protizánětlivé a antioxidační účinky, pro které byl tento druh tradičně využíván, nebyly zatím mnoha studiemi potvrzeny. Jedna ze studií z roku 2019 testovala účinky ethanolového extraktu z listu na edémech vyvolaných u slepic druhu *Gallus gallus*. Při experimentu byl edém redukován a tím byla prokázána protizánětlivá aktivita extraktu (22). Ze semen se získávají kardioaktivní glykosidy, kde významnou roli má g-strofantin, neboli ouabain, který je historicky používán jako kardiotonikum (7).



Obrázek 4 *Strophanthus gratus* Baill. (23)

***Tabernanthe iboga* Baill.** (iboga) (Obrázek 5) se vyznačuje svými halucinogenními vlastnostmi. Jedná se o africký keř, který byl po staletí součástí spirituálních rituálů některých kmenů. Ořezaná kůra z kořene v malých dávkách zmírňovala únavu, hlad a žízeň. Nejvíce prostudovaný alkaloid izolovaný z této rostliny je alkaloid indolového typu ibogain. Při výzkumech se ukázalo, že má značný vliv na snížení závislosti návykových látek (heroinu, morfinu, kokainu a nikotinu). Mechanismus účinku není plně objasněn, ale věří se, že závislost snižuje metabolit noribogain vazbou na opioidní receptory ( $\mu$  a  $\kappa$ ). Nevýhodou jsou jeho halucinogenní a kardiotoxické účinky, a nákladovost potenciální terapie. V současnosti se pozornost vědců ubírá na jeho syntetický analog tabernanthalog, který se zdá být bezpečnější (24; 25).



Obrázek 5 *Tabernanthe iboga* Baill. (26)

***Alstonia scholaris* (L.) R.Br.** a ***A. macrophylla* Wall.** (Obrázek 6) jsou další tradičně známé stromy této čeledi, uplatňující se v mnoha asijských státech a v Africe. Slouží zde k léčení celé řady nemocí (např. horečky, průjmu, respiračních onemocnění, lepry, malárie a rakoviny), přičemž se v praxi zpracovávají všechny části rostliny, ať už jednotlivě či dohromady. V listech *A. scholaris* (L.) R.Br. jsou například obsaženy iridoidy, kumariny a flavonoidy; v kůře a kořenech zase terpenoidy. Většina látek je pak obsažena ve všech orgánech. V obou druzích najdeme až 70 různých alkaloidů, které jsou nejvíce obsaženy v kůře kmenu. Díky fenotypickým podobnostem se v mnoha zemích druhy zaměňují i přesto, že jsou odlišné. Tyto okolnosti vytváří problémy ve sjednocování informací. Z listu *A. scholaris* (L.) R.Br. byly izolovány indolové alkaloidy pikrinin, scholaricin a vallesamin, u kterých bylo prokázáno, že mají protizánětlivé, antitusické, expektorační a analgetické účinky (27; 28).



Obrázek 6 *Alstonia scholaris* (L.) R.Br. (29)

***Nerium oleander* L.** (oleandr obecný) (Obrázek 7) patří mezi okrasné keře vyskytující se v tropických a subtropických oblastech, a také ve Středomoří. Je významný pro obsah kardioaktivních glykosidů, především oleandrinu a jeho derivátu oleandrigeninu. Tyto látky jsou důvodem jeho toxicity. Listy oleandru mají kardiotonické a antimikrobiální účinky a v lidovém léčitelství se s ním můžeme setkat také jako s protijedem hadího kousnutí. Běžně se dále užívá v lidovém léčitelství k léčbě malárie, lepry, srdečního selhání, na trávení a proti zánětům. Oleandrin má kromě silného efektu na srdce, také schopnosti inhibovat růst některých rakovinných buněk, jmenovitě karcinomu střev, nemalobuněčného karcinomu plic, leukémie, rakoviny kůže, pankreatu a prostaty. K léčbě tumorů a kožních onemocnění se rostlina užívala ve formě prášků a odvarů v arabském léčitelství (30; 31).





Obrázek 7 *Nerium oleander* L. (32)

### 3.2 ROD *GEISSOSPERMUM* ALLEMÃO

Rod *Geissospermum* Allemão je znám od roku 1846, kdy o něm poprvé publikoval článek doktor Francisco Freire Allemão (33). K tomuto rodu bylo postupně přiřazeno dvanáct druhů. Světový kontrolní seznam vybraných čeledí rostlin (WCSP) je významná databáze, která poskytuje přehled o nejnovějších přijatých vědeckých názvech vybraných čeledí rostlin. Databáze uvádí dvě skupiny druhových jmen rodu *Geissospermum* Allemão – ta která byla vytvořena a dnes nahrazena synonymy, a jména, která byla přijata a jsou v současnosti obecně uznávaná (34).

*Geissospermum excelsum* Kuhl. (1935) byl nahrazen synonymem *Aspidosperma carapanauba* Pichon. Tento druh patří také do čeledi Apocynaceae a je rozšířen na území Francouzské Guyany a Peru. *Geissospermum martianum* Miers (1878) je synonymem *Geissospermum laeve* Miers stejně jako *Geissospermum vellosii* Allemão (1846). *Geissospermum ramiflorum* Miers (1878) byl nahrazen synonymem *Aspidosperma ramiflorum* Müll., roustoucí v Bolívii a Brazílii, *Geissospermum myristicifolium* Markgr. (1933) bylo zase obdobně nahrazeno názvem *Aspidosperma myristicifolium* Woodson, rostoucí na území Kostariky, Peru a také Brazílie. *Geissospermum solandri* Miers (1878) je druh, který není uznáván v WCSP databázi a ani k němu není uvedeno žádné synonymum (34).

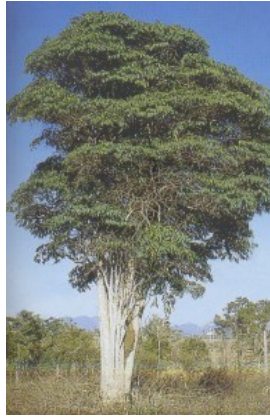
Dnes jsou celosvětově schválené a používané názvy: *Geissospermum argenteum* Woodson, *Geissospermum fuscum* Markgr., *Geissospermum laeve* (Vell.) Miers, *Geissospermum reticulatum* A.H.Gentry, *Geissospermum sericeum* Miers a *Geissospermum urceolatum* A.H.Gentry. Těchto šest druhů se stalo v posledních letech předmětem zájmu mnoha vědeckých týmů a jsou studovány kvůli obsahu řady látek se zajímavou biologickou aktivitou (35).

### 3.2.1 *Geissospermum vellosii* Allemão

<b>ŘÍŠE</b> (Regnum)	<b>Rostliny</b> ( <i>Plantae</i> )
<b>KMEN</b> (Phylum)	<b>Cévnaté rostliny</b> ( <i>Tracheophyta</i> )
<b>ODDĚLENÍ</b> (Divisio)	<b>Krytosemenné rostliny</b> ( <i>Magnoliophyta</i> )
<b>TŘÍDA</b> (Class)	<b>Vyšší dvouděložné</b> ( <i>Eudicots</i> )
<b>ŘÁD</b> (Order)	<b>Hořcotvaré</b> ( <i>Gentianales</i> )
<b>ČELEĎ</b> (Family)	<b>Toješťovité</b> ( <i>Apocynaceae</i> )
<b>ROD</b> (Genus)	<b><i>Geissospermum</i></b>
<b>DRUH</b> (Species)	<b><i>Geissospermum vellosii</i> Allemão</b> ( <i>Synonyma: Geissospermum laeve</i> Miers, <i>Geissospermum martianum</i> Miers, <i>Tabernaemontana leavis</i> Vell.)

Taxonomické zařazení (31)

Tento druh se stal hlavním cílem mnoha vědeckých studií v posledních desetiletích a zájem o něj stále roste primárně pro využití jeho potenciálních účinků v medicíně. Jedná se o tropický strom (Obrázek 8) vyskytující se nejvíce v jižních, jihovýchodních a severovýchodních regionech Brazílie, dále v Surinamu, v Bolívii, v Peru, ve Venezuele, v Guyaně a také ve Francouzské Guyaně (34). Tradičně je nazýván Pao Pereira a v současných databázích je mu přiřazeno synonymum *G. laeve* Miers, přestože bylo v minulosti popsáno několik odlišných znaků mezi těmito druhy (36). Jako další synonyma jsou také uváděny názvy *G. martianum* Miers a *Tabernaemontana leavis* Vell. I když je oficiálně akceptovaným názvem rostliny *G. laeve* (Vell.) Miers, v literatuře se nejčastěji setkáváme právě s označením *G. vellosii* Allemão (34).



Obrázek 8 *G. vellosii* Allemão (37)

### 3.2.1.1 *Botanická charakteristika*

Strom se vyznačuje velkou schopností regenerace. Dosahuje výšky asi 20–30 metrů s průměrem kmene okolo 50 cm. Kůra má světle hnědou až žlutou barvu. Mladé větve mívají rezavou barvu. Listy jsou jednoduché a bývají v postavení střídavém. Spodní (abaxiální) strana bifaciálního listu se odlišuje od druhé strany hnědo-rezavou barvou. Na počátku vývoje listu se objevuje ochlupení na jeho povrchu, které postupem času mizí a list se stává lysým. Květy jsou světle zbarvené a kvetou od září do listopadu (Obrázek 9). Květenství jsou vrcholičnatá a plodem je dužnatá bobule s mléčnou šťávou a 5 až 15 semeny (37). V literatuře se také objevuje podrobný popis rostliny z roku 1878 od Johna Mayerse. John Mayers tehdy shromáždil od botaniků dosavadní informace o jednotlivých objevených druzích. Zajímavé bylo, že zdůrazňoval morfologické rozdíly mezi druhy *Geissospermum laeve* Miers a *Geissospermum vellosii* Allemão, které se dnes ale považují za synonyma (36).



Obrázek 9 GV, větev (37) (vlevo), květ (vpravo) (38)

### 3.2.1.2 Použití

Kůra z kmene působí adstringentně, antipyreticky, hlístopudně, anebo jako tonikum. V tradiční medicíně se po staletí využívá ve formě tinktur k léčbě malárie. Odvary se připravují v případě zažívacích potíží, diabetu, jaterních onemocněních, na různá svědivá, bolestivá místa a pohlavní infekce (39; 40).

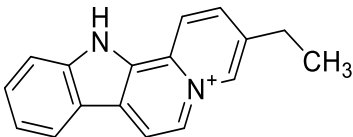
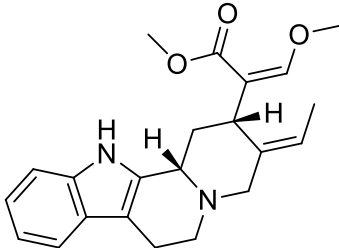
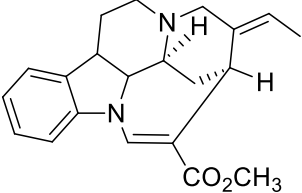
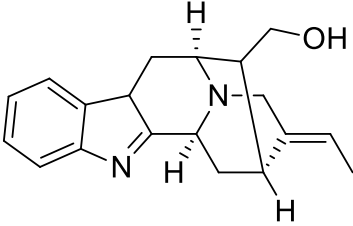
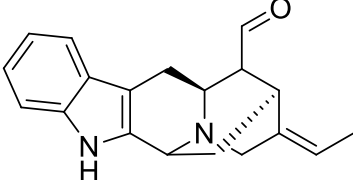
### 3.2.1.3 Obsahové látky

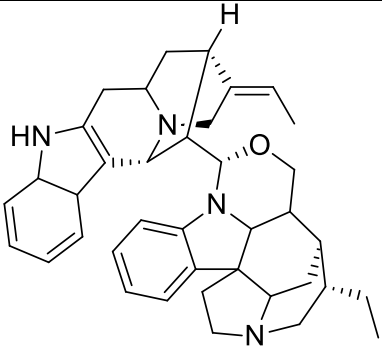
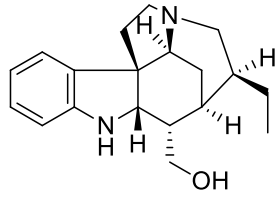
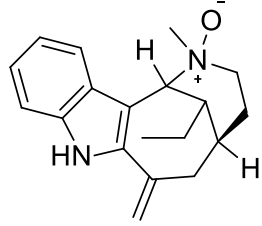
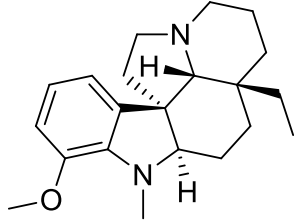
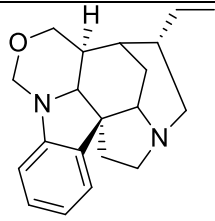
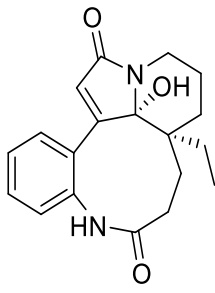
Kůra je bohatá především na indolové alkaloidy, které jsou považovány za hlavní důvod její různorodé biologické aktivity. Celkově je v literatuře popsáno asi 15 alkaloidů, které se dosud podařilo z tohoto druhu izolovat. Hlavní alkaloidy, které v rostlině najdeme, jsou monoterpenové indolové alkaloidy, které se dále dělí do několika podtypů. Výjimkou je alkaloid flavopereirin, který se vyznačuje přítomností heterocyklu  $\beta$ -karbolinu a patří proto do skupiny  $\beta$ -karbolinů (41).

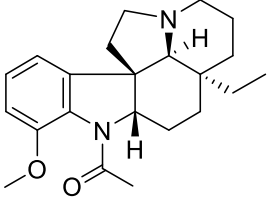
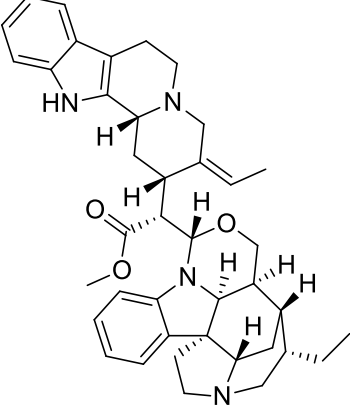
Primárně jsou všechny indolové alkaloidy odvozeny od aminokyseliny tryptofanu. Ten je dále přeměněn dekarboxylací na tryptamin, který je buď hlavním stavebním kamenem, či jsou k němu připojeny další terpenové jednotky, například monoterpeny či diterpeny. Biosyntéza  $\beta$ -karbolinu z tryptofanu probíhá v několika krocích. Reakcí tryptaminu s aldehydem se vytvoří Schiffova báze. V molekule meziprojektu dochází podle Mannichovy reakce k zacyklení. Vzniká tetrahydro- $\beta$ -karbolin, jež se oxidací přemění do zmíněné finální struktury  $\beta$ -karbolinu

(42). Monoterpenové indolové alkaloidy mají společnou strukturu striktosidin, která vzniká kondenzací tryptaminu s iridoidním terpenem sekologaninem. Proměnlivost molekuly striktosidinu přináší celou řadu podtypů monoterpenových alkaloidů. V následující Tabulce 1 jsou některé podtypy přiřazeny k vybraným nejznámějším alkaloidům izolovaným z druhu GV. (43 - 45).

Tabulka 1: Struktury indolových alkaloidů druhu *G. vellosii* Allemão

<b>1 β-KARBOLINOVÉ:</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Flavopereirin (41)</li> </ul>	
<b>2 MONOTERPENOVÉ:</b>	
<b>a) Korynanteanový podtyp</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Geissoschizin (41)</li> </ul>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Apogeissoschizin (41)</li> </ul>	
<b>b) Sarpaginový podtyp</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Vellosiminol (41)</li> </ul>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Vellosimin (41)</li> </ul>	

<ul style="list-style-type: none"> <li>• Geissolosimin (41)</li> </ul>	
<p><b>c) Akuammilinový podtyp</b></p>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Geissoschizolin = pereirin (41)</li> </ul>	
<p><b>d) Uleanový podtyp</b></p>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Pausperadin (41)</li> </ul>	
<p><b>e) Kondylokarpanový podtyp</b></p>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Geissovellin (41)</li> </ul>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Geissoschizon (41)</li> </ul>	
<p><b>f) Rhazinilamový podtyp</b></p>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• (-)-Leukonolam (46)</li> </ul>	

<b>g) Aspidosperminový podtyp</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Aspidospermin (41)</li> </ul>	
<b>h) Korynanteanový a akuammilinový podtyp</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Geissospermin (41)</li> </ul>	



#### 3.2.1.4 Biologická aktivita

**Antinocicepční, protizánětlivá aktivita:** Analgetické účinky GV byly jihoamerickými domorodci často využívány při různých typech bolesti. To podnítilo mnohé výzkumy ke snaze objasnit účinnou látku a mechanismus účinku stojící za tímto působením. Předpokládá se, že indolové alkaloidy mohou zasahovat do serotonergního systému v mozku jež má mimo jiné významnou roli v kontrole bolesti (47).

Bylo provedeno několik studií zabývajících se touto problematikou. Ke stanovení aktivity bylo zvoleno několik klasických modelů bolesti a zánětu *in vivo* (na laboratorních myších), které jsou běžně využívány při testování nových léčiv. Extrakty z *G. vellosii* Allemão byly myším podány perorálně hodinu před chemickým vyvoláním bolesti a spuštění zánětlivých reakcí (kyselinou octovou, formaldehydem, či karagenanem). Výsledky prokázaly antinocicepční a protizánětlivou aktivitu extraktů z kůry. Ukázalo se, že potlačují zánětlivou, viscerální bolest a snižují otok. Naopak bylo vyvráceno působení přes centrální systém, jež se uplatňuje např. u opioidních analgetik. Podle studie z roku 2016 byl protizánětlivý a antinocicepční účinek extraktu stejný jako u léčiva indometacin (48). Studie z roku 2009 zaznamenala v porovnání s aspirinem několikanásobně vyšší antinocicepční aktivitu dichlormetanové frakce a izolovaného alkaloidu 12-methoxy-1-methyl-aspidospermidinu. Předpokládá se, že díky tomuto alkaloidu vykazuje kůra tyto farmakologické vlastnosti (47).

Při zjišťování podílu serotonergního systému na vliv antinocicepčního účinku, byli k experimentu použity selektivní antagonisté 5-HT receptorů. Cílem bylo sledovat snížení antinocicepční aktivity extraktů při jejich současném podávání. Pouze selektivní antagonisté 5-HT<sub>1A</sub> receptorů se podíleli na snížení tohoto účinku (47; 48).

**Antibakteriální a antimalarická aktivita:** Sumární ethanolový extrakt kůry prokázal inhibiční účinek vůči kultuře oxacillin-rezistentní *Staphylococcus aureus* (ORSA) a nabízí tak možnou terapeutickou alternativu pro vývoj nových léčiv v boji proti tomuto multirezistentnímu kmenu (49).

Potenciální uplatnění *G. vellosii* Allemão v léčbě malárie nalézá své počátky v tradiční medicíně, kdy zpracovaný rostlinný materiál sloužil primárně k prevenci tohoto onemocnění. Jeho antimalarická aktivita byla zkoumána poprvé během druhé světové války. Experiment byl proveden na modelech kuřat infikovaných parazitem *Plasmodium gallinaceum*. Výsledkem

bylo potvrzení silné aktivity, která se ukázala být ekvivalentní aktivitě antimalarického léčiva chininu. Novodobější studie zkoumaly působení také vůči ostatním parazitům – *P. berghei* a *P. falciparum*. Ve studii z roku 1999 prokázal extrakt z kůry silnou antimalarickou aktivitu *in vitro* (IC<sub>50</sub> 3,1 µg/ml) vůči kmenům *P. falciparum*, ale při testech *in vivo* na myších modelech, nebyla zaznamenána aktivita vůči *P. berghei* a projevila se vysoká toxicita tohoto extraktu. Ve studii se domnívají, že by za účinkem mohl stát alkaloid flavopereirin, u kterého byla zmiňovaná antimalarická aktivita zaznamenána při zkoumání jiných druhů rodu *Geissospermum* (50). V *in vitro* studii z roku 2011 byla porovnána aktivita sumárního extraktu a jednotlivých izolovaných alkaloidů vůči kmenu *P. falciparum* senzitivním na chlorochin. Nejvýznamnější aktivitu vykazaly alkaloidy geissolosimin, geissospermin, geissoschizolin a geissoschizon. Nejsilnější aktivita byla ale zaznamenána u alkaloidu geissolosiminu, která byla také jako jediná z těchto alkaloidů vyšší než aktivita sumárního extraktu. U ostatních alkaloidů se aktivita odvíjela podle toho, jak byla jejich struktura podobná struktuře geissolosiminu. Geissoschizolin byl i dříve izolován z druhu *G. sericeum* Miers, ale při testování inhibiční aktivity vůči kmenu *P. falciparum* nebyly antimalarické účinky potvrzeny. Studie doporučuje testování těchto alkaloidů *in vivo* a nevylučuje, že by jejich struktury mohly v budoucnu napomoci k tvorbě nových antimalarických léčiv (51).

**Antineoplastická aktivita:** Extrakt z GV je jedním z mnoha rostlinných přípravků využívaných dlouhodobě v tradiční léčbě onkologickými pacienty i bez plně podložených vědeckých závěrů. První studie, zabývající se touto problematikou, zkoumala vliv extraktu kůry nespécifického složení na buněčné linie rakoviny vaječníku buď samostatně, anebo společně s přidáním chemoterapeutikem karboplatinou. Z výchozích dat vyplývá signifikantní inhibiční efekt vůči tumorovým buňkám (*in vitro* i *in vivo*) a zároveň relativně nízký toxický efekt vůči zdravým buňkám. V kombinaci s karboplatinou byla dosažena prakticky plná inhibice růstu tumoru (97 %) a díky použití extraktu se podařilo snížit terapeutické dávky tohoto léčiva, čímž byla snížena i jeho toxicita. Nebylo však objasněno, které sloučeniny v extraktu a mechanismy účinku za tímto výsledkem stojí a jaký byl důvod preferenční cytotoxicity vůči tumorovým buňkám (52). V posledním desetiletí se však situace změnila a velkou pozornost získal alkaloid flavopereirin, u kterého byla zaznamenána antineoplastická aktivita u různých typů nádorů. U kolorektálního karcinomu bylo odhaleno, že aktivuje P53-P21 signalizaci, čímž zastavuje buněčný cyklus a růst rakovinných buněk v G2/M-fázi, a navozuje jejich apoptózu vnější i

vnitřní cestou (53). U rakoviny prsu bylo zjištěno, že zastavuje všechny buněčné cykly a navozuje apoptózu regulací přes AKT/p38 MAPK/ERK1/2 signální cestu (54). Flavopereirin taktéž snižuje životnost a inhibuje IL-6 aktivovanou proliferaci buněk u terapeuticky rezistentního glioblastomu. Zaznamenáno bylo také potlačení proliferace buněk u melanomu. Tento alkaloid také zvyšuje expresi proteinu LASP1 vedoucí k inaktivaci signální dráhy JAK/STAT. Tímto procesem se podílí na inhibici vývoje rakoviny ústní dutiny. Účinky byly testovány *in vitro* i *in vivo* a flavopereirin by tak mohl do budoucna představovat potenciální léčivo pro tato onemocnění (55).

**Anticholinesterasová aktivita:** Tato aktivita hraje důležitou roli v obnově kognitivních funkcí způsobených nedostatkem mediátoru acetylcholinu objevující se při Alzheimerově demenci (AD). V několika studiích byla testována inhibiční aktivita vůči oběma enzymům AChE a BChE u alkaloidního extraktu z kůry *G. vellosii* Allemão a jednotlivých alkaloidů. Studie z roku 2009 se zabývala stanovením anticholinesterasové aktivity *in vitro* a *in vivo*. Zajímavá biologická aktivita byla naměřena u frakce 1 (při pH7), z níž byl následně izolován indolový alkaloid geissospermin. Měřena byla inhibiční aktivita frakce 1 vůči enzymům získaných z více živočišných druhů (z krysí mozkové tkáně, elektrického úhoře a z koňského séra). Inhibice AChE byla 39,3 µg/ml (krysí enzymy) a 2,9 µg/ml (z úhoře). Koňské sérum posloužilo ke změření inhibiční aktivity vůči BChE, která činila IC<sub>50</sub> 1,6 µg/ml. Testy *in vivo* posuzovaly chování a sníženou schopnost učení u myší, které byly předem utlumeny látkou skopolaminem (vyvolá amnézii). Současně aplikovaná frakce 1 v různých koncentracích měla tyto kognitivní funkce posílit a utlumit tak působení skopolaminu. Test potvrdil její účinek, který se zvyšoval s rostoucí koncentrací (10, 30, 60 mg/kg). Další test zkoumal prostorovou paměť myší, opět po podání skopolaminu a různých dávek frakce 1. Měly za úkol projít vodním labyrintem. Pozorována byla rychlost, jakou prošly ve dvou různých dnech. U subjektů léčených frakcí 1 došlo k viditelnému zlepšení prostorové paměti a k dosažení cíle jim stačilo méně času. V závěru studie se testovaly různé koncentrace frakce 1 na výskyt centrálních cholinergních vedlejších účinků a maximálních toxických dávek. Při vyšších koncentracích se příliš vedlejších účinků neprojevovalo. Krátké záchvěvy a třesy nastaly při podání dávky 100 mg/kg. Vyšší dávky (200 a 300 mg/kg), způsobily brzkou smrt subjektů projevující se křečemi celého těla (39).

Nejaktuálnější studie z roku 2020 navazovala na výsledky té předchozí, kdy jejím cílem bylo stanovení anticholinesterasové aktivity a cytotoxicity izolovaných alkaloidů namísto extraktu.

Izolovány byly alkaloidy 3',4',5',6'-tetrahydrogeissospermin, geissoschizolin, geissoschizon a geissospermin. Stanovení inhibice pomocí Ellmanova testu proběhlo *in vitro* za použití enzymu acetylcholinesterasy z úhoře (*EeAChE*), erytrocytární (*hAChE*) z lidské plazmy a enzymu butyrylcholinesterasy z koňského (*EqBChE*) a z lidského (*hBChE*) séra. Aktivity byly porovnány s fyzostigminem, což je selektivní inhibitor AChE, který se kvůli velmi krátkému poločasu a množství nežádoucích účinků využívá spíše jen při experimentech než při léčbě (56). Ve výsledku byla inhibiční aktivita alkaloidů proti AChE mnohonásobně nižší než aktivita fyzostigminu. Geissospermin prokázal jako jediný alkaloid selektivní inhibici vůči BChE oproti ostatním, které byly neselektivní. Dále byla testována cytotoxicita, při které byl netoxický pouze geissoschizolin, což vedlo k jeho dalšímu prostudování. Byly provedeny studie enzymové kinetiky a bylo zkoumáno molekulární dockování alkaloidu s BChE a řada dalších testů. Geissoschizolin se ukázal být velmi zajímavou molekulou. Kromě významné inhibiční aktivity vůči oběma enzymům – *EeAChE* ( $IC_{50} = 5,86 \mu M$ ), *hAChE* ( $IC_{50} = 20,40 \mu M$ ), *EqBChE* ( $IC_{50} = 7,89 \mu M$ ) a *hBChE* ( $IC_{50} = 10,21 \mu M$ ), dokázal také snížit neurozánět (redukci TNF- $\alpha$  a uvolnění NO) a projevil neuroprotektivní schopnosti, které by mohly snížit progresi zánětlivých procesů (57).

### **3.2.2 *Geissospermum argenteum* Woodson**

#### **3.2.2.1 Botanická charakteristika a použití**

*G. argenteum* Woodson je strom vysoký asi 20–30 metrů původem pocházející z Francouzské Guyany (34). Vyznačuje se střídavě postavenými pýřitými listy s krátkými řapíky (Obrázek 10). Existuje několik studií zabývajících se tímto stromem, který je spolu s dalšími druhy *G. sericeum* Miers a *G. laeve* (Vell.) Miers, znám a tradičně užíván amazonskými kmeny v Brazílii jako antimalarikum. Svými účinky dokáže narušit intrahepatální oběh parazita *P. falciparum* (58; 59).



Obrázek 10 Stavba květu a listu *G. argenteum* Woodson (60)

### 3.2.2.2 Obsahové látky

V roce 1978 byla provedena studie, ve které se podařilo extrahovat čtyři alkaloidy ze suchých částí listů a kmenové kůry za pomoci chloroformu a následné alkalizace amoniakem. Dohromady se z rostlinného materiálu podařilo získat 0,8 % směsi alkaloidů aspidosperminového podtypu. Ze směsi byly chromatograficky izolovány alkaloidy: (-)-demethoxyaspidospermin, (-)-aspidospermin, (+)-demethylaspidospermin a (+)-aspidocarpin, který by mohl být důvodem již zmíněné antimalarické aktivity. Silná aktivita byla stanovena ( $IC_{50 K1} = 19 \text{ nM}$ ) po izolaci tohoto alkaloidu z rostliny *Aspidosperma desmanthum* Benth. ex Müll.Arg. (61).

### 3.2.2.3 Biologická aktivita

**Antimikrobiální aktivita:** V roce 2008 byla zkoumána antibakteriální aktivita ethanolových extraktů (macerovaných 7 dní za pokojové teploty) z kůry 10 různých druhů amazonských rostlin, mezi nimiž byl i *G. argenteum* Woodson. Testovala se MIC několika bakterií ze sbírky ATCC (American Type Culture Collection) a ze sbírky nemocničních multirezistentních kmenů v Brazílii. Extrakt z *G. argenteum* Woodson prokázal signifikantní inhibiční aktivitu vůči bakteriálním kmenům *Pseudomonas aeruginosa* a *Staphylococcus aureus* (62). V pozdější studii z roku 2011 byl připraven methanolvý extrakt z listu a kůry. Extrakt byl dále rozdělen

do dvou frakcí (ethylacetátové a vodné-methanolové). Obě frakce prokazovaly částečnou antimikrobiální aktivitu vůči bakterii *S. aureus*. Samotný methanolový extrakt a z něj připravená hexanová frakce byly částečně aktivní i vůči *S. mutans* (35).

### 3.2.3 *Geissospermum reticulatum* A.H.Gentry

#### 3.2.3.1 *Biologická charakteristika a použití*

*G. reticulatum* Woodson je strom, který roste ve všech částech amazonských deštných lesů jižní Ameriky. Tradičně se připravují vodné extrakty z kůry jeho kmene, které jsou využívány k léčbě různých nemocí. Mají především antimalarické, antineoplastické, analgetické, antioxidační a antibakteriální účinky (63).

#### 3.2.3.2 *Obsahové látky*

Z listů a kůry stromu *G. reticulatum* Woodson se vědcům podařilo izolovat 10 alkaloidů: 10-demethoxy-12-hydroxy-17,19-epoxygeissovellin, geissosretikulin, geissospermidin, (Z)-10-demethoxy-12-hydroxygeissovellin, (E)-10-demethoxy-12-hydroxygeissovellin, N-deacetyl-N-butanoylgeissospermidin, 10-methoxygeissospermidin, flavopereirin, 11-methoxygeissospermidin a O-demethylaspidospermin (63).

#### 3.2.3.3 *Biologická aktivita*

**Antiparazitická aktivita:** U studie z roku 2012 byl potvrzen antiparazitický účinek alkaloidního extraktu z listu a kůry. Studie testovala extrakt na parazitech *Trypanozoma cruzii* a *Leishmanii infantum*. Látky obsažené v extraktech z kůry (především indolové alkaloidy) by mohly být potenciálně určeny pro léčbu široce rozšířené Chagasovy nemoci a leishmaniózy. Tato možnost je bohužel zatím nepřijatelná kvůli výskytu nežádoucích účinků. Téma zůstává otevřené pro další výzkumy konkrétních obsahových látek, či od nich odvozených derivátů (63).

**Antioxidační aktivita:** Výzkum byl zaměřen na extrahování fenolických sloučenin a flavonoidů z kůry *G. reticulatum* Woodson. Při experimentu byly připraveny ze suché kůry ethanolové extrakty, tinktury a vodní infuze. Ve výsledku roztoky obsahovaly vysoké hladiny fenolických látek 212–1253 mg GAE/kg (vyjádřeno jako příslušný ekvivalent kyseliny gallové

mg/kg), což znamená, že by kůra z této rostliny mohla být hodnotným zdrojem přírodních antioxidantů. Obsahově bylo ve všech typech extraktů více polyfenolů než flavonoidů. V případě flavonoidů byly ve výsledcích velké rozdíly dány typem rozpouštědla, kdy se více látek uvolňovalo do ethanolu než do vody. Pro zjištění antioxidační aktivity byla provedena další měření. U dříve připravených extraktů, tinktur a infuzí byla měřena absorpční kapacita kyslíkových radikálů (ORAC), schopnost vychytávat volné radikály pomocí elektronové paramagnetické rezonance (EPR) a schopnost plazmy redukovat železité ionty (FRAP). Tato měření potvrdila významnou antioxidační aktivitu kůry (64).

**Cytotoxická a antiproliferativní aktivita:** Vodné a ethanolové extrakty sloužily také pro stanovení cytotoxické a antiproliferativní aktivity. Testovalo se působení na linie nádorových buněk, na proliferaci T-lymfocytů a na vývoj embryí rybek *Danio rerio*. Z výsledků plyne, že ethanolové extrakty z kůry *G. reticulatum* Woodson působí významně cytotoxicky na kultury maligních buněk a inhibují růst zdravých CD3+ lymfocytů. Působením na embrya nebyla prokázána teratogenní aktivita. Studie doporučuje rostlinu pro další zkoumání a nevylučuje potenciální použití ve farmaceutické průmyslu v budoucnu (64). Výše zmíněná studie z roku 2012, testovala působení alkaloidního extraktu a některých alkaloidů na kultury zdravých ovariálních buněk čínských křečků. Extrakt vykazoval střední cytotoxickou aktivitu a stejně tak izolovaný alkaloid *O*-demethylaspidospermin, u kterého byla o něco nižší než u referenčních látek amfotericinu B a nifurtimoxu (63).

Nejnovější poznatky přinesla studie, v níž byl izolován další alkaloid geissospermikulatin. Ze 100 g kůry byl získán v množství 1,8 g. Byla testována aktivita alkaloidu vůči maligním THP-1 buňkám (monocytární lidská buněčná linie z krve pacienta s leukemií). V závěru experimentu byla prokázána jeho cytotoxicita vůči maligním buňkám a zároveň nízká toxicita vůči nemaligním buňkám embryí rybek *Danio rerio*, což znamená slibný potenciál pro další studie (65).

### **3.2.4 *Geissospermum sericeum* Benth. et Hook.f. ex Miers**

#### **3.2.4.1 Botanická charakteristika a použití**

Strom *G. sericeum* Benth. et Hook.f. ex Miers lze nalézt na území Francouzské Guiney, Bolívie a Brazílie (34). Podle místní literatury je popisován jako jedna z nejdůležitějších rostlin

v léčbě malárie. K léčbě a profylaxi této nemoci je strom využíván domorodými kmeny (např. Macuxi, Wai-Wai atd.), které z jeho kůry připravují odvary vždy na konci měsíce. Někdy je také využíván jako abortivum. Je přezdíván jako *quina-quina* a vyznačuje se velmi hořkou chutí, což by podle některých názorů mohlo souviset s jeho toxicitou (35; 66).

#### 3.2.4.2 *Biologická aktivita*

Ve studii z roku 2002 byla provedena extrakce kůry ve formě prášku (39 g) Soxhletovým extraktorem směsí MeOH a vody (9 : 1), při které bylo získáno 7,1 g extraktu. Z extraktu byly následně izolovány čtyři alkaloidy indolového typu: geissoschizolin, geissoschizolin  $N^4$ -oxid, 1,2-dehydrogeissoschizolin a flavopereirin. Dále byla u těchto alkaloidů a celkového extraktu změřena antimalarická aktivita na chlorochin senzitivní (K1) a chlorochin rezistentní (T9-96) kmen *Plasmodium falciparum* a dále cytotoxicita vůči buněčným liniím lidského epiteliálního karcinomu. Významná antimalarická aktivita byla naměřena u flavopereirinu s  $IC_{50\ K1} = 12\ \mu M$ ,  $IC_{50\ T9-96} = 1,8\ \mu M$  a středně významná u 1,2-dehydrogeissoschizolinu s  $IC_{50\ K1} = 27,2\ \mu M$ ,  $IC_{50\ T9-96} = 35\ \mu M$ . Zbylé dva alkaloidy nebyly významně aktivní. Ani jeden z alkaloidů však nebyl účinnější než léčivo chlorochin s  $IC_{50\ K1} = 0,32\ \mu M$ ,  $IC_{50\ T9-96} = 0,03\ \mu M$ . Střední cytotoxickou aktivitu vykazoval alkaloid flavopereirin ( $IC_{50} = 10,7\ \mu M$ ), ostatní nebyly toxické. Tato studie potvrzuje, že užívání extraktů získaných z *G. sericeum* Benth. et Hook.f. ex Miers domorodými kmeny k léčbě malárie bylo opodstatněné (67).

### 3.2.5 *Geissospermum urceolatum* A.H.Gentry

#### 3.2.5.1 *Botanická charakteristika a použití*

Další druh z rodu *Geissospermum* roste v severní Brazílii a v severovýchodní části Bolívie (34). Kůra z kmene je jako u ostatních druhů pověstná svými léčivými účinky a využívá se v tradičním léčitelství. Dělalí se z ní výluhy k léčbě malárie, horečky a bolesti břicha (68).

#### 3.2.5.2 *Biologická aktivita*

O tomto druhu není dostupných příliš mnoho informací a jsou o něm zmínky pouze v několika studiích. Výsledky z těchto studií nejsou příliš jasné a specifické. V jedné se podařilo izolovat několik látek mezi kterými byl i alkaloid aspidokarpin (izolován i z *G. argenteum*



Woodson), u kterého byla testována antimalarická aktivita *in vitro*. U tohoto alkaloidu byla naměřená inhibiční aktivita vůči kmenu *P. falciparum* ( $IC_{50} = 2,42 \mu\text{g/ml}$ ) (68).

### **3.3 ALZHEIMEROVA CHOROBA**

#### **3.3.1 Popis**

Alzheimerova choroba je neurodegenerativní onemocnění patřící mezi nejčastější typy demence. Německý psychiatr a neuropatolog Alois Alzheimer poprvé přednášel o známkách této nemoci v roce 1906 na lékařské konferenci. Při pitvě své zemřelé pacientky z psychiatrické kliniky objevil v jejím mozku neobvyklý výskyt plaků a vláken. Během několika dalších let prozkoumal mnoho případů s podobnou diagnózou a charakterizoval tyto změny mozkové tkáně, které po něm byly následně pojmenovány (69).

Diagnóza se stanovuje rozpoznáním syndromu demence. Demence znamená snížení intelektových schopností oproti předchozí úrovni. Nezbytným příznakem je porucha paměti a alespoň jedné z dalších kognitivních funkcí. K popisu Syndromu demence může posloužit koncept ABC (A-activities, B-behaviour, C-cognition), jež je dobrou pomůckou při stanovení diagnózy. První písmeno A popisuje potíže při narušení aktivit každodenního života. Pacient přestává zvládat základní a složitější (s pomocí předmětu) činnosti. Písmeno B označuje změny nálady a chování (např. apatie, agrese, atd.) a za C je myšlena porucha především krátkodobé paměti a narušení prostorové orientace (70).

#### **3.3.2 Epidemiologie**

Aktuálně je asi 44 milionů lidí, kteří trpí demencí. Z toho 50–75 % případů se řadí mezi Alzheimerovu demenci (AD). Prevalence tohoto onemocnění bude postupně stoupat s přibývajícím počtem lidí vyššího věku. V nejbližších desetiletích se očekává výrazný nárůst počtu nemocných. Předběžný odhad je ztrojnásobení aktuálního počtu lidí trpících demencí do roku 2050. Problém, kromě ekonomických nákladů na léčbu, bude především v nárocích na pečovatelskou službu (71; 72).

#### **3.3.3 Etiologie**

AD lze rozdělit na dva typy: sporadická a familiární. Familiární forma je vzácnější (méně než 0,5 %) a postihuje nemocné v nižším věku (mezi 30–50 rokem). Hlavním faktorem je genetická zátěž. Dochází k mutaci genů kódující: amyloidní prekurzorový protein (APP), presenilin 1 (PSEN1) a presenilin 2 (PSEN2). Velká role genetiky je připisovaná také sporadickému typu AD, kde se odhaduje její vliv až na 70 %. Týká se především

apolipoproteinu E (Apo E), který se v těle běžně nachází a účastní se metabolismu cholesterolu. U lidí, kteří inklinují ke vzniku nemoci, se vyskytuje specifická alela, která kóduje nebezpečnou izoformu proteinu E4/E4. Další rizikové faktory jsou environmentální. Obezita byla považována za rizikový faktor, ale v poslední době je tento předpoklad spíše zpochybňován. Několik epidemiologických studií potvrzuje jako rizikový faktor vliv vaskulárních poruch, jejichž mechanismus je však zatím neznámý (69; 72).

### 3.3.4 Neuropatologie a patofyziologie

Patogeneze vzniku AD není zatím zcela odhalena. Jsou známy určité biochemické a morfologické změny, díky kterým vzniklo několik hypotéz týkajících se patofyziologie nemoci. Ty nejznámější jsou např. amyloidní hypotéza, hypotéza o genetické variantě ApoE, hypotéza založená na hyperfosforylaci tau-proteinu, hypotéza oxidačního stresu, či hypotéza neurozánětu. Jejich obsah se někdy vzájemně prolíná (73).

Charakteristickými znaky patologického procesu Alzheimerovy choroby jsou agregáty abnormálních proteinů v mozkové tkáni. V první řadě je můžeme odlišit místem výskytu. Uvnitř nervových buněk CNS se nachází intraneuronální neurofibrilární klubka z nerozpustného tau-proteinu. V extracelulárním prostoru (mimo buňku) je nerozpustný protein  $\beta$ -amyloid ve formě plaků. Dále se odlišují časovou posloupností. Nejprve se ukládají klubka tau-proteinu uvnitř buňky a posléze (asi za 10 let) se začnou ve vnějším prostoru hromadit  $\beta$ -amyloidní plaky. V obou případech se léze postupně a systematicky šíří do nezasazených částí mozku. V pozdní fázi choroby se kombinace  $\beta$ -amyloidních plaků a dystrofických neuritů s klubíčky tau-proteinu označují jako neuritické plaky (74).

Patologický proces AD je specifický tím, že jakmile začne, tak dochází postupně jen ke zhoršení. Nemůže přejít v remisi, regresi, ani se spontánně zlepšit. Zahrnuje velmi dlouhé období, ve kterém ještě nelze onemocnění klinicky poznat, a relativně krátkou finální fázi vyznačující se symptomy. Ztráta kognitivních a exekutivních funkcí se manifestuje pouze v pokročilém věku. Jelikož s rostoucím věkem přibývá mnoho dalších patologií, a díky tomu, že je diagnostika Alzheimerovy choroby složitá a souvisí mnohdy s ostatními nemocemi, je někdy AD považována za syndrom a součást celkové demence. Klinické příznaky se vyvíjejí nenápadně a poškození nervových buněk vede k postupné ztrátě jejich základních funkcí, které se projeví až po překročení určité hranice poškození (74).

Postižena bývají specifická predilekční místa v subkortikálních jádrech a korových oblastech. Dochází ke ztenčení mozkové kůry, k atrofii v oblasti hipokampu a rozšíření mozkových komor. Zvláštní je, že se patologie rozvíjí pouze v některých typech buněk. Dokonce i ty, které se nachází v těsné blízkosti postižených, tak mnohdy zůstávají morfologicky a fyziologicky v pořádku. Patologie se projeví dysfunkcí a mírným úbytkem neuronů. Zasaženy bývají neurony glutamatergní, gabaerní, dopaminerní, norgadrenergí, serotonerní, histaminerní a cholinerní (74). První neurotransmitterový systém, který bývá postižen je cholinerní, jež produkuje acetylcholin. Tento systém je důležitý především pro kognitivní funkce (paměť, řeč, vnímání, prostorová orientace a další). Později bývají při Alzheimerově nemoci ovlivněny i ostatní systémy (69).

#### 3.3.4.1 *Tau-protein, taupatie*

Tau-protein je bílkovina, která fyziologicky pomáhá stabilizovat síť cytoskeletu a podílí se na funkčním transportním systému axonu navázáním na aktinové filamenty mikrotubulů. Její biologickou aktivitu reguluje stupeň fosforylace (2–3 moly fosfátu na 1 mol proteinu), přičemž v mozku nemocných pacientů byla odhalena třikrát až čtyřikrát vyšší fosforylace. Spolu s dalšími chemickými změnami, jako například polymerizace, se z tau-proteinu vytvoří heliakální filamenta, která jsou v párovém složení součástí patofyziologických neurofibrilárních klubek. Taupatií se souhrnně označují poruchy s výskytem patologických lézí, jejichž základní komponentou je hyperfosforylovaný tau-protein (75).

#### 3.3.4.2 *$\beta$ -amyloid*

Prekurzor  $\beta$ -amyloidu je protein, který se fyziologicky podílí na složení buněčné membrány. Dělí se na dvě hlavní izoformy odlišující se konečnou aminokyselinou – A $\beta$ -40 (kratší) a A $\beta$ -42 (delší). Za fyziologické situace v mozku převažuje kratší izoforma. A $\beta$ -42 se rychle agreguje a převažuje v patologických placích, díky čemuž je její hladina při onemocnění nižší. Tento fakt bývá využíván při klinickém vyšetření (75).

#### 3.3.4.3 *Centrální acetylcholinerní systém*

Acetylcholin (ACh) má klíčovou úlohu v kognitivních funkcích člověka. Je součástí fyziologické cesty, ve které přenáší informace (cholinerní transmise) mezi jednotlivými

nervovými buňkami. Cholinergní systém zahrnuje více postupných dějů – syntézu ACh, jeho uvolnění ze zásobních vezikul, přenos informace vazbou na cholinergní receptory, biologický rozklad ACh a recyklace cholinu pro novou syntézu. Snížené množství ACh vede k deficitu cholinergní transmise a tím k poruše kognitivních funkcí.

U AD je postižena především presynaptická část acetylcholinergního neuronu, která je zodpovědná za syntézu ACh. Dále je snížena aktivita cholin-acetyltransferasy a pyruvát-dehydrogenázového komplexu. Přítomnost proteinu  $\beta$ -amyloidu rovněž může ovlivnit biosyntézu ACh změnou energetického metabolismu buňky, čímž může vyvolat nedostatek pyruvátu, který následně není dodán do enzymového komplexu.

Jedním z důležitých procesů cholinergního systému, na který se cílí v léčbě AD, je rozklad ACh v synapsi na cholin a kyselinu octovou. Fyziologický rozklad zajišťuje enzym acetylcholinesterasa (AChE), dělí se na několik izoform. Hlavní jsou izoformy G4 a G1. U zdravého člověka převažuje především izoforma G4, zatímco u nemocného s AD je to přesně naopak. Vedle AChE je při AD podstatný také enzym butyrylcholinesterasa (BChE), tvořený aktivovanými gliovými elementy v oblasti plaků, a který má za fyziologických podmínek funkci ve štěpení ACh naprosto minoritní. U AD je uvolnění ACh z presynaptických zakončení sníženo a postupně klesá počet molekul AChE a zároveň roste počet molekul BChE, která v pozdější fázi choroby přebírá úlohu ve štěpení ACh. Bylo také pozorováno, že v amyloidních placích se často vyskytuje AChE a nejspíš se podílí i na tvorbě amyloidních fibril svým periferním anionickým místem. Poškození se také předpokládá u cholinergních receptorů na buňkách uvolňujících excitační aminokyseliny (glutamát a aspartát). Regulace jejich uvolňování je rovněž důležitá pro kognitivní funkce. Současná léčba se zaměřuje především na snížení rozkladu ACh, k čemuž se používají inhibitory cholinesteras (73; 76).

### **3.3.5 Farmakologická léčba**

Náklady na léčbu AD se stále zvyšují a vlády po celém světě začaly v posledních letech podporovat výzkumy na hledání nových léčiv. Při současné léčbě lze pouze dočasně tlumit symptomy (73).

Tabulka 2: Současná farmakoterapie

<b>Inhibitory acetylcholinesterasy (mírná/střední fáze)</b>	donepezil, rivastigmin, galanthamin
<b>Antagonisté NMDA receptorů (střední/těžká fáze)</b>	memantin

*Donepezil* je specifický a reverzibilní inhibitor AChE, který vykazuje tisíckrát nižší afinitu vůči BChE. V počátcích léčby se užívá nižší dávka (5 mg/den) a v případě kladného účinku pozorovaného během 6–9 týdnů se dávka může zvýšit na maximálních 10 mg/den. Cholinergní nežádoucí účinky (nauzena, zvracení, bolest hlavy, poruchy spánku, či jiné zažívací potíže) bývají mírné a přechodné, nejčastěji se vyskytující na počátku léčby. Postupné navyšování dávky jejich výskyt snižuje (73).

*Rivastigmin* je neselektivní inhibitor AChE a BChE a řadí se mezi tzv. pseudoireverzibilní inhibitory, jež jsou charakterizovány velmi pomalou disociací enzym-rivastigminového komplexu. Využívá se také k léčbě demence s idiopatickou Parkinsonovou chorobou a jako jediný je dostupný i ve formě transdermálních náplastí. Specifickým účinkem rivastigminu je preferenční inhibice G1 izoformy AChE v hipokampu a mozkové kůře; rovněž je potvrzeno i možné snížení tvorby amyloidního prekurzorového proteinu. Dávkování je opět postupné z důvodu lepší adherence k léčbě (1,5; 3; 4,5; 6 mg/ 2× denně). Lépe snášeny bývají transdermální náplasti než tablety. Užíváním rivastigminu s jídlem snižuje projevy nežádoucích účinků, především zvracení a nevolnost (73).

*Galanthamin* je selektivní kompetitivní a reverzibilní inhibitor AChE rovněž zesilující účinek ACh na nikotinové receptory (pravděpodobně alosterickou modulací), zejména na izoformy v hipokampu a mozkové kůře. Úvodní dávka (8 mg/den) bývá po čtyřech týdnech nahrazena udržovací dávkou (16 mg/den). Pro lepší biologickou dostupnost, se doporučuje užívat galanthamin s jídlem. Nežádoucí účinky jsou cholinergního charakteru. Galanthamin zvyšuje produkci žaludečních kyselin, proto při jeho užívání se zvyšuje riziko vzniku vředů. Uplatnění by toto léčivo mohlo nalézt i při léčbě jiných onemocnění. Testují se účinky při schizofrenii, závislostech, Parkinsonovy choroby a dalších (73).

*Memantin* se od ostatních léčiv odlišuje mechanismem účinku. Je to nekompetitivní antagonist NMDA (*N*-methyl-D-aspartát) receptorů. Na tyto receptory se váže glutamát, což je primární excitační neurotransmitter v mozku. S AD je spojována abnormální aktivita NMDA receptorů, kdy dochází k nadměrné aktivaci, vyvolání patologických procesů a excitotoxicitě

(specifické smrti neuronu) (77). Memantin navázáním na receptor inhibuje jeho aktivitu. Vedle NMDA receptorů interaguje i s receptory serotonergními, dopaminovými, aj. Léčivo existuje ve dvou lékových formách – tabletách a perorálním roztoku. Maximální dávky (20 mg/den) je vhodné dosáhnout postupným navyšováním o 5 mg každý týden. Interakcí memantinu s některými myorelaxancii se může potencovat jejich sedativní účinek a s léčivy amantadinem, ketaminem, dextromethorfanem či fenytoinem se nedoporučuje společné užití z důvodu farmakotoxické psychózy (73).

## 4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 4.1 POUŽITÝ MATERIÁL A VYBAVENÍ

#### 4.1.1 Rozpouštědla

- **Aceton** -  $\text{CH}_3\text{COCH}_3$  ACS (VWR International, Francie)
- **Amoniak (25% vodný roztok)** -  $\text{NH}_3$  p. a. (Lach-Ner, Neratovice)
- **Acetonitril** -  $\text{MeCN}$  p. a. (Lach-Ner, Neratovice )
- **Benzin lékařský RN** - (PENTA, Praha)
- **Cyklohexan** -  $\text{C}_6\text{H}_{12}$  p. a. (PENTA, Praha)
- **Diethylamin** -  $\text{Et}_2\text{NH}$  p. a. (PENTA, Praha)
- **Ethanol 95%** -  $\text{EtOH}$  (lihoval Chrudim)
- **Ethylacetát** -  $\text{EtOAc}$  p. a. (PENTA, Praha)
- **Chloroform** -  $\text{CHCl}_3$  p. a. (PENTA, Praha)
- **Methanol** -  $\text{MeOH}$  GC/MS, (VWR International, Francie)
- **Toluen** -  $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_3$  p. a. (PENTA, Praha)
- **Voda destilovaná** -  $\text{H}_2\text{O}$  (UK, Farmaceutická fakulta, Katedra analytické chemie, HK)

#### 4.1.2 Chemikálie

- **Dusičnan bismutitý** -  $[\text{Bi}(\text{NO}_3)_3]$  p. a. (Lachema, Brno)
- **Jodid draselný** -  $\text{KI}$  p. a. (Lach-Ner, Neratovice)
- **Kyselina vinná** -  $\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_6$  p. a. (Balex, Pardubice)
- **Síran hořečnatý** -  $\text{MgSO}_4$  p. a. (PENTA, Praha)
- **Uhličitan sodný** -  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  p. a. (PENTA, Praha)

#### 4.1.3 Detekční činidla

- **Dragendorffovo činidlo** – v čase potřeby byl připraven detekční roztok smícháním 5 ml zásobního roztoku s roztokem 10 g kyseliny vinné rozpuštěné v 50 ml vody. Dříve připravený zásobní roztok se skládal ze směsi dvou roztoků smíchaných v poměru 1 : 1. První roztok obsahoval 1,7 g zásaditého dusičnanu bismutitého a 20 g kyseliny vinné



v 80 ml vody. Druhý roztok obsahoval 16 g jodidu draselného ve 40 ml vody. Připravený zásobní roztok byl uchováván v ledničce.

#### 4.1.4 Pomocný materiál

- **Křemelina** Celite C 535 John's Manville (Sigma-Aldrich, Praha)
- **Analytické TLC desky** (Merck, Německo)
  - Silica gel 60 F<sub>254</sub> 20 × 20 cm
- **Analytické TLC desky** (Merck, Německo)
  - Aluminium oxide 60 F<sub>254</sub> 20 × 20 cm
- **Silikagel** Kieselgel 60 GF254 (Merck, Německo)
- **Vata** (přečištěná přes chloroform)

#### 4.1.5 Využívané soustavy pro chromatografii na tenké vrstvě

- **S1:** C<sub>6</sub>H<sub>12</sub> : EtOAc (95 : 5)
- **S2:** C<sub>6</sub>H<sub>12</sub> : Et<sub>2</sub>NH : MeOH (95 : 5 : 5)
- **S3:** C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>CH<sub>3</sub> : Et<sub>2</sub>NH (95 : 5)
- **S4:** C<sub>6</sub>H<sub>12</sub> : C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>CH<sub>3</sub> : Et<sub>2</sub>NH (40 : 10 : 2)
- **S5:** C<sub>6</sub>H<sub>12</sub> : EtOAc : Et<sub>2</sub>NH (80 : 20 : 4)

#### 4.1.6 Přístrojové vybavení

- **Analytické váhy** (KERN & SOHN GmbH, Německo)
- **Flash chromatograf** BÜCHI Sepacore flash system X10, kontrolní jednotka BÜCHI C-620, sběrač frakcí BÜCHI C-660, detektore UV C-640 a pumpa BÜCHI C-605
- **Magnetická míchačka** MR3001 K (Heidolph Instruments GmbH & CO)
- **Plynový chromatograf** Agilent Technologies 7890A s MS-EI spektrometrem Agilent Technologies 5975 (Agilent Technologies, Santa Clara, California USA)
- **Polarimetr** P3000 (A. Krüss Optronic, Hamburg, Německo)
- **Rotační vakuová odparka** (RVO 004, INGOS, Praha)
- **Spektrometr** Varian VNMR S500 (Varian, Palo Alto, California, USA)
- **UV reader** Synergy HT (Biotek, USA)

#### **4.1.7 Rostlinný materiál**

K fytochemické studii byla vybrána rostlina GV z důvodu významné anticholinesterasové aktivity zjištěné při předchozí screeningové studii. Ve dne 10.10. 2018 bylo přivezeno 43 kg sušené kůry od firmy Amazon Herbs Surinam. Vzorek rostlinného materiálu byl uložen na Katedře farmakognozie a farmaceutické botaniky pod kódem AL-674. Zpracování kůry a extrahování směsi alkaloidů bylo provedeno v rámci diplomové práce A. Bulákové (78), samotná práce probíhala na předem vybrané frakci GV- 3 o hmotnosti 1,37 g.

## 4.2 VŠEOBECNÉ POSTUPY

### 4.2.1 Příprava rozpouštědel

Většina zakoupených rozpouštědel byla před použitím přečištěna destilací a přeplněna do zásobních láhví z tmavého skla. Nádoby byly správně označeny a uchovávány na bezpečném místě při laboratorní teplotě a bez přímého světla.

### 4.2.2 Uchovávání vzorků

Separované frakce a čisté alkaloidy byly vždy po odpaření rozpouštědla a po vysušení v exikátoru uchovávány v označených vialkách v lednici při teplotě 2–8 °C.

### 4.2.3 Detekce alkaloidů

Nejprve byly zóny detekovány pod UV lampou při  $\lambda = 254$  nm a  $\lambda = 366$  nm. Všechny viditelné skvrny byly označeny tužkou při analytické TLC. V případě preparativní TLC byl špachtlí vyryt obrys požadované zóny s alkaloidem. Nanesením Dragendorffova činidla v digestoři byla potvrzena přítomnost alkaloidů zbarvením skvrny do oranžova/hněda a zároveň tím byly nalezeny skvrny s nečistotami, jejichž barva se po postříkání nezměnila. U preparativní TLC byla činidlem postříkána pouze malá část desky, která nebyla dále využita.

### 4.2.4 Chromatografie

#### 4.2.4.1 Analytická chromatografie na tenké vrstvě

Vzorky byly nejprve rozpuštěny v malém objemu chloroformu a ethanolu. K analytické chromatografii byly použity komerčně vyráběné hliníkové desky s naneseným silikagelem Silica gel 60 F<sub>254</sub> 20 × 20 cm (Merck, Německo), které byly následně upraveny na požadovanou velikost. Malé množství vzorku bylo kapilárou nanášeno ve formě tenké linky asi 1 cm od konce desky a 0,5 cm od okraje či vedlejší linky. Následně byly desky vloženy svisle do eluční komory nasycené parami mobilní fáze. Vyvinuté desky byly vysušeny teplým vzduchem. Oddělené zóny byly detekovány UV světlem při vlnových délkách:  $\lambda = 254$  nm a  $\lambda = 366$  nm. Přítomnost alkaloidů byla detekována Dragendorffovým činidlem jako hnědo-oranžové skvrny. Analytická

TLC sloužila k porovnání účinnosti separace připravených mobilních fází, které byly poté použity pro preparativní chromatografii.

#### 4.2.4.2 Příprava litých desek pro preparativní TLC

Byla připravena suspenze z 6,5 g silikagelu a 20,5 ml destilované vody. Na skleněné desky velikosti 15 × 15 cm byla aplikována promíchaná suspenze a pomocí skleněné tyčinky se zahnutým koncem byla rovnoměrně rozmístěna po celé desce. Po nanesení silikagelu byly desky před použitím sušeny nejméně 24 hodin při laboratorní teplotě.

#### 4.2.4.3 Preparativní chromatografie na tenké vrstvě

K separaci byly použity předem připravené skleněné desky s adsorbentem (silikagel) nebo komerčně vyráběné desky s adsorbentem oxidem hlinitým. K aplikaci posloužilo nanášecí pero. Dělená směs byla nanášena v 5–8% roztoku  $\text{CHCl}_3$  a EtOH 1 : 1 souvislou čarou nejméně půl centimetru od obou konců desky. Vyvíjení probíhalo vždy v komorách předem nasycených zvolenou směsí rozpouštědel. Po vyvíjení byly pomocí UV lampy detekovány zóny s jednotlivými frakcemi, které byly spolu s adsorbentem vyškrabány z desek pro další zpracování.

#### 4.2.4.4 Přečistění a odpaření rozpouštědla

Zóny obsahující alkaloidy se stejným retenčním faktorem ze všech použitých desek byly spojeny a eluovány v chromatografické koloně. Do místa zúžení kolony byl vložen kousek vaty, pro zachycení křemeliny a silikagelu. Množství křemeliny bylo v poměru (1 : 1) se suchým vzorkem. Kolona byla promývána dostatečným množstvím směsí  $\text{CHCl}_3$  a EtOH připraveného v poměru (1 : 1), do doby kdy se přestaly z kolony eluovat alkaloidy. Průběžně probíhala kontrola přítomnosti alkaloidů pomocí detekce Dragendorffovým činidlem.

Na rotační vakuové odparce bylo z extraktů odpařeno rozpouštědlo při teplotě okolo 40 °C. Vzorek byl z baňky odebrán rozpuštěním v malém množství rozpouštědla, převedením do vialky a následným odpařením rozpouštědla na vodní lázni při teplotě 60 °C. Výsledné množství suchého vzorku bylo zváženo.

#### 4.2.5 GC/MS-EI – stanovení čistoty a struktury

K analýze hmotnostních spekter byl použit plynový chromatograf Agilent 7890A GC 5975 s hmotnostním detektorem při elektronové ionizaci 70 eV a teplotním programem 100-180 °C (7 minut), 180 °C (1 minuta) a 180-300 °C (24 minut). Byla použita kolona Hp-5 MS (30 m 0,25 mm 0,25 μm, Agilent Technologies, USA). Jako mobilní fáze – nosný plyn, bylo použito helium o průtokové rychlosti 1 ml/min. Nástřik vzorku byl proveden při teplotě 180 °C v objemu 1 μl methanického roztoku (splitovací poměr 1:10).

Identifikace látek proběhla porovnáním jejich spekter se spektry komerční knihovny NIST 11 (National Institute of Standards and Technology Library USA), s daty publikovanými v odborné literatuře a také se standardy, které již byly na pracovišti dříve izolovány.

#### 4.2.6 NMR analýza

Změření a interpretace spekter bylo provedeno na katedře organické chemie přístrojem Varian VNMR S500 za laboratorní teploty 25 °C. K měření byly použity rozpouštědla deuterovaný methanol (CD<sub>3</sub>OD) a deuterovaný chloroform (CDCl<sub>3</sub>). Frekvence magnetického pole byla 500 MHz pro <sup>1</sup>H a 126 MHz pro <sup>13</sup>C. Signál byl detekován širokopásmovou dvoukanálovou gradientní sondou a chemické posuny δ byly měřeny v jednotkách ppm (pars per milion). Hodnoty chemického posunu pro CDCl<sub>3</sub> jsou u atomů <sup>1</sup>H δ = 7,26 ppm a u atomů <sup>13</sup>C δ = 77,0 ppm. Pro rozpouštědlo CD<sub>3</sub>OD je posun atomů <sup>1</sup>H δ = 3,30 ppm a atomů <sup>13</sup>C δ = 49,0 ppm.

#### 4.2.7 Optická otáčivost

Pro kvalitativní stanovení látek bývá měřena optická otáčivost, která je pro každou látku charakteristická. K měření byl využit polarimetr P3000. Od každého vzorku byl do vialky odebrán 1 mg látky a rozpuštěn v 1 ml methanolu. Vzorek J1 byl rozpuštěn v 1 ml chloroformu. Před každým měřením vzorku byla změřena optická otáčivost čistého rozpouštědla (slepý pokus). Vzorky byly převedeny do měřící kvety a uzavřeny na obou koncích skleněnými čočkami, přichycenými šrouby. Každý vzorek byl 5× změřen, hodnoty byly zprůměrovány a byla vypočtena specifická otáčivost podle vzorce (79):

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

$\alpha$ ...optická otáčivost [°]

$t$ ...teplota při měření [°C]

$D$ ...spektrální linie D sodíkového světla (589,3 nm)

$c$ ...koncentrace látky v g/l

$l$ ... síla měřené vrstvy [dm]

Výsledky specifické optické otáčivosti byly u jednotlivých alkaloidů porovnány s literaturou.

### **4.3 IZOLACE ALKALOIDŮ Z FRAKCE GV-3**

Předmětem mé práce byla izolace alkaloidů z frakce GV 32-42 (GV-3), jejíž prvotní množství činilo 1,3 g. Pomocí analytické chromatografie na tenké vrstvě (TLC) byla zjištěna vhodná směs mobilní fáze pro rozdělení extraktu metodou flash chromatografie. Vzorek GV-3 byl rozdělen na 11 podfrakcí označené písmeny A–K.

#### **4.3.1 Příprava roztěru pro flash chromatografii**

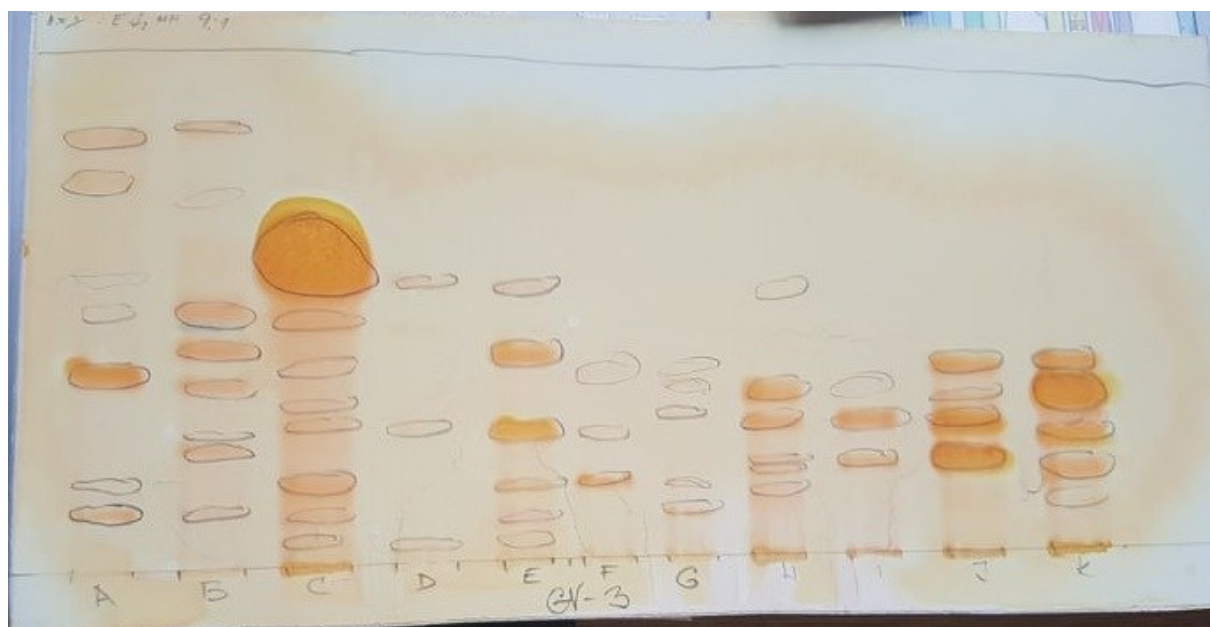
Do baňky se vzorkem bylo přidáno malé množství chloroformu na rozpuštění a promytí. Na odpařovací misce byla vytvořena směs smícháním 2,2 g silikagelu (SILIKAGEL 60, 0,04–0,063 mm) a chloroformového roztoku. Po dobu 20 minut bylo ze směsi odpařováno rozpouštědlo na vodní lázni (100 °C) za intenzivního míchání. Bylo docíleno jemného, světle hnědého prášku. Zbytková vlhkost byla ze směsi odstraněna v exsikátoru.

#### **4.3.2 Flash chromatografie**

Flash chromatografie byla použita na místo sloupcové chromatografie pro rozdělení primárního extraktu. Izokratická eluce probíhala ve dvou krocích se skokově měnící se koncentrací mobilní soustavy (Tabulka 3). Mobilní fáze byla pomocí tlakové pumpy přiváděna do kolony ze dvou zásobních láhví. V prvním kroku byla použita soustava cyklohexan / ethylacetát, v druhém methanol / ethylacetát. Počítačem byla řízena požadovaná koncentrace mobilní fáze měnící se v průběhu dělení. V programu bylo také možné kontrolovat změnu tlaku, která značila stoupající odpor v koloně a případné ucpání filtru. Průtoková rychlost byl nastavena na 25 ml/min a kolona byla před měřením promyta mobilní fází pro odstranění nežádoucího vzduchu a deaktivaci silikagelu. Kolona obsahovala 34,4 g silikagelu a před ní byla připojena předkolona se směsí extraktu a silikagelu (připravená roztěrem). Detekce píků byla prováděna při 254 nm, 270 nm, 280 nm a 366 nm. Konečné frakce byly jímány do speciálních zkumavek a podle kontrolní TLC byly pospojovány frakce, které byly kvantitativně stejné (Obrázek 11).

Tabulka 3: Složení mobilní fáze při flash chromatografii a rozdělení frakce GV-3

čas [min]	rozpuštědlo [%]		frakce	hmotnost [mg]
	Cyklohexan	ethylacetát		
<b>1. krok</b>			<b>A</b>	22,2
0.–10.	80	20	<b>B</b>	14,2
10.–16.	75	25	<b>C</b>	558,6
16.–22.	70	30	<b>D</b>	27,1
22.–28.	60	40	<b>E</b>	32,6
28.–34.	50	50	<b>F</b>	1,9
34.–40.	35	65	<b>G</b>	37,7
40.–46.	20	80	<b>H</b>	40,6
46.–52.	0	100	<b>I</b>	10,1
<b>2. krok</b>	<b>Ethylacetát</b>	<b>methanol</b>	<b>J</b>	92
0.–3.	100	0	<b>K</b>	84,8
3.–9.	99	1		
9.–15.	98	2		
15.–21.	95	5		
21.–27.	90	10		
27.–33.	80	20		
33.–39.	65	35		
39.–45.	50	50		
45.–51.	0	100	<b>celkem</b>	921,8



Obrázek 11 Kontrolní TLC chromatogram s alkaloidů v jednotlivých frakcích



Každá z frakcí obsahovala více než jeden alkaloid, a proto byla práce dále zaměřena na izolaci alkaloidů z podfrakcí C a J (Obrázek 11), které obsahovaly největší množství vzorku (Tabulka 3).

Pro separaci **podfrakce C**, jejíž množství činilo 558,6 mg, bylo využito 12 litých desek. K chromatografii byla vybrána soustava S2. Separované alkaloidy byly přečištěny od silikagelu pomocí vodní vývěvy, která urychlila promývání směsi rozpouštědlem. Došlo k rozdělení na 5 podfrakcí označených C1 až C5, jejichž množství je uvedeno v Tabulce 4.

Tabulka 4: Rozdělení podfrakce C preparativní TLC

Podfrakce	Hmotnost [mg]
C1	384,1
C2	28,1
C3	6,2
C4	23,2
C5	16,9

K další izolaci byla vybrána podfrakce C1, která byla preparativní chromatografií dělena v mobilní soustavě S3 za použití 10 litých desek. Podfrakce byla rozdělena na tři zóny, označené C1-a, C1-b a C1-c (Tabulka 5).

Tabulka 5: Rozdělení podfrakce C1 preparativní TLC

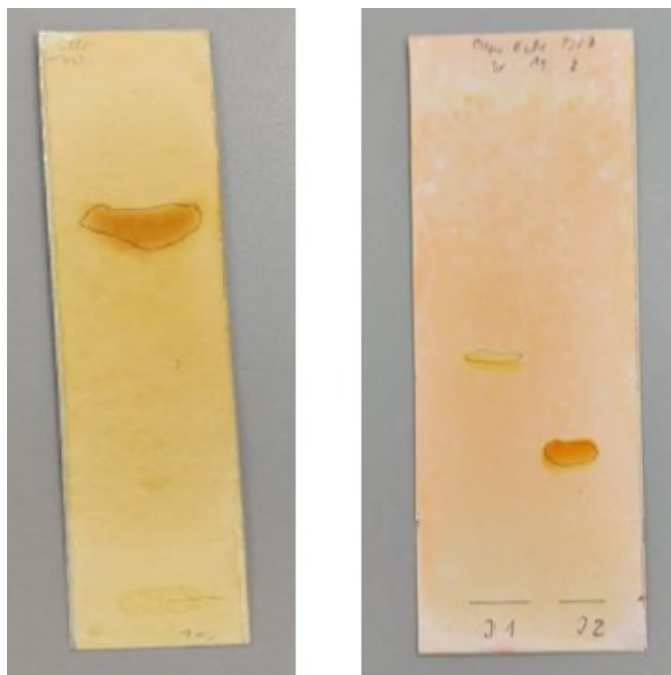
Podfrakce	Množství [mg]
C1-a	258,0
C1-b	21,0
C1-c	16,6

Podfrakce C1-a se při analytické TLC stále dělila na několik zón. Analýzou na plynovém chromatografu byla zjištěna přítomnost pouze jednoho hlavního alkaloidu, čímž byla potvrzena možnost, že se alkaloid rozkládá v kontaktu s adsorbentem silikagelem. Vzorek C1-a bylo ještě potřeba přečistit před strukturální analýzou od minoritních nečistot.

Izolovaný alkaloid bylo potřeba přečistit předtím, než u něj byla určena struktura analýzou NMR. Přečištění probíhalo vytřepáváním do ethylacetátu v dělicí nálevce. Extrakt byl rozpuštěn v 5 % HCl a přidáním malého množství ethylacetát byly vytvořeny dvě oddělené fáze. Následně byl po částech přidáván roztok 10 % Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> až do doby, kdy bylo lakmusovým papírkem potvrzeno alkalické prostředí ve vodné fázi. Ethylacetátová fáze byla doplněna rozpouštědlem, aby zhruba odpovídala množství vodné fázi. Vytřepávání do ethylacetátu bylo 2× opakováno a získané výtřepky byly sloučeny do jednoho. Pomocí vakuové odparky bylo odpařeno rozpouštědlo a pro odstranění posledních zbytků vody byl k roztoku přidán síran hořečnatý.

Podfrakce C1-a stále nedosahovala čistoty vhodné pro strukturní analýzu, a proto byla přečištěna preparativní TLC za použití 6 komerčních desek s adsorbentem oxidem hlinitým. Z celkového množství 258 mg bylo na chromatografii z ekonomických důvodů odebráno 91,4 mg vzorku. Podfrakce byla rozpuštěna v 0,8 ml ethanolu a 0,8 ml chloroformu. Na základě analytické TLC byla vybrána mobilní soustava S4. Z chromatogramů byla odebrána jedna zóna, která byla eluována z oxidu hlinitého. Rozpouštědlo byla odpařeno na vakuové odparce a posléze na vodní lázni. Byla izolována žluto-bílá krystalická látka (C1-a-1) v množství 35,3 mg. (Obrázek 12)

**Podfrakce J** (92 mg) byla rozpuštěna v malém objemu chloroformu a rozdělena preparativní TLC na dvě zóny v mobilní soustavě S5 (2×). K separaci byly použity komerční hliníkové desky se silikagelem. Odebrané zóny byly opět přečištěny v chromatografické koloně za použití vodní vývěvy. Rozpouštědlo bylo odpařeno pomocí vakuové odparky. Byly získány dvě čisté krystalické látky označené J1 (4,14 mg) a J2 (29,5 mg) (Obrázek 12).



Obrázek 12 TLC izolovaných alkaloidů C1-a-1 (nalevo) a J1,J2 (napravo)

## 4.4 STANOVENÍ BIOLOGICKÉ AKTIVITY

### 4.4.1 Stanovení anticholinesterasové aktivity

#### 4.4.1.1 Chemikálie a činidla

- **Acetylthiocholin jodid** - ATChI p. a. (Sigma Aldrich, Praha)
- **Butyrylthiocholin jodid** - BuTChI p. a. (Sigma Aldrich, Praha)
- **Chlorid sodný** - NaCl p. a. (Lachema, Brno)
- **Dimethylsulfoxid** - DMSO p. a. (Sigma Aldrich, Německo)
- **Dihydrogenfosforečnan draselný bezvodý** -  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   
p. a. (Lach-Ner, Neratovice)
- **Dihydrogenfosforečnan sodný dihydrát** -  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$   
p. a. (ing. Švec – Penta, Praha)
- **5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina  $\geq 98\%$**  - DTNB  
p. a. (Sigma Aldrich, Praha)
- **Hydrogenfosforečnan disodný bezvodý** -  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$   
p. a. (ing. Švec – Penta, Praha)

#### 4.4.1.2 Příprava činidel a pufru pro stanovení inhibiční aktivity vůči hAChE a hBChE

- **100 mM fosfátový pufr o pH 7,4**

Pufr byl připraven smísením zásobních roztoků A (57 ml), B (243 ml) a vody (300 ml). Pro přípravu 200 mM roztoku A bylo rozpuštěno 24,0 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  v 1 l vody a 200 mM roztoku B zase 28,4 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  v 1l vody.

- **Roztok 5mM DTNB**

Slabě nažloutlý roztok byl připraven rozpuštěním DTNB ve fosfátovém pufru (100mM, pH 7,4). Množství látek bylo zvoleno tak, aby vznikl 5 mM roztok. Činidlo bylo uchovááno při 4 °C maximálně 1 týden.

- **Roztok 10mM ATChI**

ATChI bylo rozpuštěno ve vodě v takovém množství, aby bylo dosaženo koncentrace 10 mM a aby byla zachována čírost roztoku. Činidlo bylo uchováváno při 4 °C maximálně 1 týden.

- **Roztok 10mM BuTChI**

BuTChI bylo rozpuštěno ve vodě v takovém množství, aby bylo dosaženo koncentrace 10 mM a aby byla zachována čírost roztoku. Činidlo bylo uchováváno při 4 °C maximálně 1 týden.

#### 4.4.1.3 Příprava rekombinantních enzymů

Enzymy AChE a BChE pro toto stanovení byly připraveny rekombinantní technologií na Katedře chemie, Přírodovědné fakulty, Univerzity Hradec Králové. Enzymy se nacházely na nosném médiu, které bylo naředěno fosfátovým pufrém v takovém množství, aby byla hodnota absorbance pro AChE 0,08–0,15 a pro BChE 0,15–0,20. Připravená směs byla rozpipetována do eppendorfek a uchovávaná v mrazáku při -22 °C do doby použití.

#### 4.4.1.4 Stanovení procenta inhibice a inhibiční koncentrace $IC_{50}$

Nejprve bylo změřeno procento inhibice u všech izolovaných alkaloidů v rámci screeningového měření při určité koncentraci. Inhibiční koncentrace  $IC_{50}$  byla stanovena pouze pokud byla inhibice vyšší než 50 % při 100  $\mu$ M (koncentrace vzorku v jamce). Stanovení bylo započato napipetováním 8,3  $\mu$ l čistého média do 6 jamek mikrotitrační destičky. Po přidání 283  $\mu$ l 5 mM DTNB a 8,3  $\mu$ l DMSO byl roztok promícháván na mikrotřepačce po dobu 1 minuty a poté inkubován 5 minut při 37 °C v komoře readeru. Následně byl přidán substrát (ATChI či BuTChI) a při vlnové délce 412 nm byla změřena absorbance a stanovena aktivita enzymů. V druhém případě bylo postupováno obdobně, ale místo 8,3  $\mu$ l DMSO byl napipetován roztok látky příslušné koncentrace. DMSO byl napipetován samostatně do jedné řady jako slepý vzorek.

Ke změření absorbance byla využita Ellmanova spektrofotometrická metoda (80), kdy byl sledován její nárůst za 1 minutu. Hodnoty  $IC_{50}$  jsou vypočítány ze získaných hodnot poklesu aktivity AChE nebo BChE nelineární regresí v programu GraphPaD Prism (verze pro Windows;

výrobce GraphPaD Software, San Diego, CA, USA). Procento inhibice bylo vypočteno pomocí vzorce:

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

kde  $\Delta ABL$  znamená pokles absorbance slepého vzorku během 1 min a  $\Delta ASA$  znamená absorbance testovaného vzorku během 1 min.

Výsledné hodnoty inhibiční koncentrace alkaloidů byla porovnána se standardy, galanthamin a fyzostigmin (Tabulka 6 a 7).

## 4.4.2 Stanovení cytotoxicity

### 4.4.2.1 Chemikálie a činidla

- **Dimethylsulfoxid - DMSO** p. a. (Sigma Aldrich, Německo)
- **Thiazolyl blue tetrazolium bromid – MTT** (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- **RPMI 1640 Medium, no phenol red** (BioTech, Prague, Czech Republic)

### 4.4.2.2 Stanovení viability buněk po expozici alkaloidy

Ke změření cytotoxicity byla využita buněčná linie jaterního karcinomu HepG2 získaná od společnosti ECACC (Health Protection Agency Culture Collections, Salisbury, UK). Buněčné linie byly umístěny do 96 jamek, přičemž v jedné bylo přibližně 50000 buněk. Inkubace probíhala po dobu 24 hodin. Vzorky s alkaloidy byly rozpuštěny v různých koncentracích DMSO. Na část buněk v destičce byly aplikovány testované látky a druhá část posloužila jako standard. Obě skupiny buněk byly inkubovány při 37 °C po dobu 24 hodin v prostředí s 5% obsahem CO<sub>2</sub>. Po inkubaci byl k vzorkům přidán roztok MTT v RPMI 1640 médiu a následovala další inkubace po dobu 30 minut za stejných podmínek. Vzniklé formazanové krystaly byly rozpuštěny v DMSO a u vzorků byla změřena absorbance při vlnové délce 570 nm přístrojem Synergy Neo2 Multi-Mode Reader NEO2SMALPHAB; BioTek, Vermont, USA. Hodnoty IC<sub>50</sub> byly vypočteny nelineární regresí v programu GraphPad Prism software (version 9; GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA). Výsledkem experimentu byla inhibiční koncentrace, která snížila viabilitu (životaschopnost) buněk jaterního karcinomu z maximální viability na poloviční (IC<sub>50</sub>).

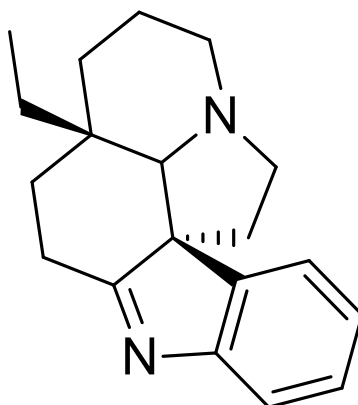
## 5 VÝSLEDKY

### 5.1 IZOLOVANÉ ALKALOIDY

Výsledkem izolace z frakce GV-3 byly tři čisté alkaloidy. Látky byly analyzovány GC/MS-EI a NMR metodami. Podle získaných dat byly určeny jejich struktury, které se shodovaly s daty nalezenými v literatuře. U alkaloidů GV3-J1 a GV3-J2 z důvodu nedostatku dat nemohla být určena absolutní konfigurace.

#### 5.1.1 1,2-DIDEHYDROASPIDOSPERMIDIN (GV3-C1-A-1)

Synonymum: eburenin



#### Sumární vzorec

$C_{19}H_{24}N_2$

#### Molekulová hmotnost

280,41

#### GC/MS-EI analýza

$[M+H]^+m/z$  (%) = 70(22), 115(22), 124(18), 125(27), 128 (18), 154(13), 156(17), 157(14), 167(14), 168(17), 169(13), 180(15), 181(20), 182(20), 183(12), 194(39), 195(17), 196(11), 197(12), 208(31), 210(94), 211(24), 212(11), 222(13), 251(43), 252(16), 279(12), 280(100), 281(25)

#### NMR analýza

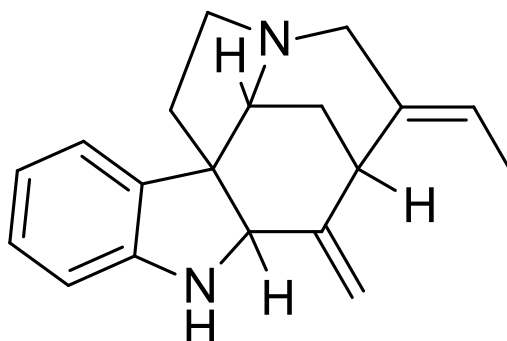
Spektra  $^1H$  i  $^{13}C$  byla ve shodě s referenční literaturou (81).

#### Optická otáčivost

$[\alpha]_D^{24,8} = +174,3^\circ$  (MeOH; c = 0,1)

### 5.1.2 ZENKEREN (GV3-J1)

Synonymum: Deoxydihydronorfluorokurarin



#### Sumární vzorec

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

#### Molekulová hmotnost

278,39

#### GC/MS-EI analýza

[M+H]<sup>+</sup>m/z (%) = 77(22), 82(10), 91(18), 93(9), 108(9), 115(16), 117(12), 120(9), 122(36), 130(33), 131(33), 143(23), 144(38), 148(40), 150(9), 167 (14), 168(10), 180(20), 181(19), 182(10), 193(9), 194(15), 206(11), 208(9), 225(15), 249(11), 263(24), 277(19), 278(100), 279(21)

#### NMR analýza

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ: 7,06 (dd, J = 7,5 Hz, J = 1,2 Hz, 1H), 7,01 (td, J = 7,5 Hz, J = 1,2 Hz, 1H), 6,71 (td, J = 7,5 Hz, J = 1,2 Hz, 1H), 6,61 (dd, J = 7,5 Hz, J = 1,2 Hz, 1H), 5,62–5,54 (m, 1H), 5,16 (bs, 1H), 5,07–5,06 (m, 1H), 4,10 (bs, 1H), 3,67 (d, J = 13,7 Hz, 1H), 3,41–3,37 (m, 1H), 3,35 (d, překryv, J = 13,7 Hz, 1H), 3,33–3,25 (m, překryv, 1H), 3,23 (bs, 1H), 3,02 (dt, J = 11,3 Hz, J = 6,8 Hz, 1H), 2,27 (dt, J = 13,7 Hz, J = 6,8 Hz, 1H), 2,20–2,11 (m, 1H), 2,06 (dt, J = 13,7 Hz, J = 2,8 Hz, 1H), 1,98 (dt, J = 13,7 Hz, J = 3,5 Hz, 1H), 1,67 (d, J = 6,8 Hz, 3H).

<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ: 151,8, 150,9, 134,3, 129,2, 123,2, 121,9, 120,0, 114,0, 110,5, 69,6, 65,5, 56,3, 54,9, 46,8, 42,0, 39,7, 26,6, 12,9.

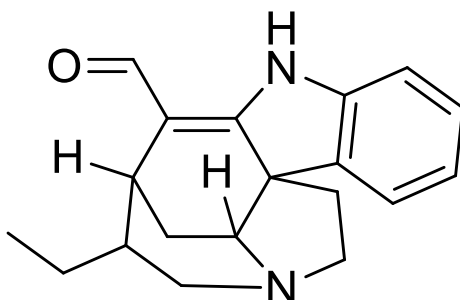
#### Optická otáčivost

Vzorek nebylo možné ve standardních rozpouštědlech rozpustit v požadované koncentraci.



### 5.1.3 19,20-DIHYDROVINKANIN (GV3-J2)

Synonymum: 2,16-Didehydrokuran-17-al



#### Sumární vzorec

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

#### Molekulová hmotnost

294,39

#### GC/MS-EI analýza

[M+H]<sup>+</sup>m/z (%) = 70(14), 84(29), 94(15), 99(17), 123(48), 139(8), 154(13), 166(12), 167(58), 168(66), 169(8), 180(36), 181(17), 182(22), 194(16), 195(19), 196(19), 197(20), 207(9), 208(17), 209(15), 210(31), 221(8), 224(9), 225(100), 226(21), 238(8), 265(12), 294(41), 295(8)

#### NMR analýza

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 10,05 (bs, 1H), 9,15 (s, 1H), 7,23 (dd, J = 7,5 Hz, J = 1,2 Hz, 1H), 7,16 (td, J = 7,5 Hz, J = 1,2 Hz, 1H), 6,97 (td, J = 7,5 Hz, J = 1,2 Hz, 1H), 6,87 (dd, J = 7,5 Hz, J = 1,2 Hz, 1H), 3,96–3,91 (m, 1H), 3,09 (td, J = 11,5 Hz, J = 6,8 Hz, 1H), 3,02–2,89 (m, 3H), 2,85 (dd, J = 11,5 Hz, J = 6,8 Hz, 1H), 2,14 (ddd, J = 13,1 Hz, J = 3,6 Hz, J = 2,5 Hz, 1H), 1,98 (t, J = 12,0 Hz, 1H), 1,89 (dd, J = 13,1 Hz, J = 6,8 Hz, 1H), 1,78–1,67 (m, 1H), 1,41 (ddd, J = 13,1 Hz, J = 3,6 Hz, J = 2,5 Hz, 1H), 1,37–1,27 (m, 1H), 1,23–1,13 (m, 1H), 1,00 (t, J = 7,4 Hz, 3H).

<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 190,3, 172,8, 143,8, 136,0, 127,6, 122,0, 120,0, 110,4, 108,1, 61,5, 57,2, 54,3, 51,0, 43,4, 38,9, 33,1, 31,6, 26,3, 11,5.

#### Optická otáčivost

$[\alpha]_D^{24,5} = -887,1^\circ$  (MeOH; c = 0,1)

## 5.2 STANOVENÍ BIOLOGICKÉ AKTIVITY

### 5.2.1 Výsledky inhibiční aktivity vůči cholinesterasám

U všech izolovaných alkaloidů bylo měřeno procento inhibice při koncentraci 100  $\mu\text{M}$  vůči acetylcholinesterase a butyrylcholinesterase. Inhibiční koncentrace byla stanovena u alkaloidů, které byly v dostatečném množství a u kterých dosahovala procento inhibice hodnoty vyšší než 50 %. Kromě naměřených hodnot alkaloidů jsou v Tabulce 6 a 7 také uvedeny hodnoty standardů.

Tabulka 6: Výsledky inhibiční aktivity izolovaných alkaloidů vůči cholinesterasám

alkaloid	AChE	
	% inhibice, 100 $\mu\text{M}$	IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{M}$ )
1,2-didehydroaspidospermidin	0,17 $\pm$ 2,73	-
zenkeren	2,49 $\pm$ 1,25	-
19,20-dihydrovinkanin	4,64 $\pm$ 3,52	-
galanthamin	94,88 $\pm$ 0,43	2,01 $\pm$ 0,14
fyzostigmin	100	0,20 $\pm$ 0,01

Tabulka 7: Výsledky inhibiční aktivity izolovaných alkaloidů vůči cholinesterasám

alkaloid	BChE	
	% inhibice, 100 $\mu\text{M}$	IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{M}$ )
1,2-didehydroaspidospermidin	89,20 $\pm$ 0,38	10,71 $\pm$ 2,72
zenkeren	58,30 $\pm$ 2,01	-
19,20-dihydrovinkanin	58,58 $\pm$ 1,89	75,69 $\pm$ 22,33
galanthamin	68,23 $\pm$ 1,24	33,69 $\pm$ 2,66
fyzostigmin	100	0,30 $\pm$ 0,01

## 5.2.2 Výsledky cytotoxicity

Viabilita buněk jaterního karcinomu byla měřena po inkubaci s izolovanými alkaloidy ve třech různých koncentracích. Naměřené hodnoty cytotoxicity a hodnoty standardu doxorubicinu jsou uvedeny v Tabulce 8.

Tabulka 8: Výsledné hodnoty cytotoxicity izolovaných alkaloidů

Alkaloid	Viabilita %		
	c (50 $\mu\text{M}$ )	c (10 $\mu\text{M}$ )	c (1 $\mu\text{M}$ )
<b>1,2-didehydroaspidospermidin</b>	79,59 $\pm$ 2,56	98,22 $\pm$ 2,64	100,85 $\pm$ 4,88
<b>zenkeren</b>	98,14 $\pm$ 3,23	99,93 $\pm$ 4,82	102,19 $\pm$ 4,75
<b>19,20-dihydrovinkanin</b>	86,01 $\pm$ 2,59	90,24 $\pm$ 8,46	-*
<b>Doxorubicin</b> <b>(IC<sub>50</sub> = 30,30 <math>\pm</math> 1,74 <math>\mu\text{M}</math>)</b>	-	66,04 $\pm$ 4,07	83,00 $\pm$ 1,23

\* vzorek nebylo možné v požadované koncentraci rozpustit

## 6 ZÁVĚR A DISKUZE

U extraktu z kůry rostliny GV i z ní izolovaných alkaloidů byla v několika studiích zaznamenána významná anticholinesterasová aktivita *in vitro* i *in vivo* (39; 57). Na základě těchto poznatků byl alkaloidní extrakt v rámci zaměření výzkumné skupiny ADINACO podroben screeningové studii na stanovení anticholinesterasové aktivity. Výsledky (AChE =  $15,19 \pm 0,96$   $\mu\text{g/ml}$ , BChE =  $0,37 \pm 0,049$   $\mu\text{g/ml}$ ) byly v souladu s předchozími studiiemi a vedly k vybrání této rostliny pro izolaci nových alkaloidů odpovědných za tuto aktivitu, včetně zhodnocení jejich toxicity.

Izolace alkaloidů započala zpracováním sušené kůry z kmene a získáním primární ethanolového extraktu. Z extraktu byla vytřepáváním do etheru a přečišťováním získána směs alkaloidů, kterou se podařilo pomocí sloupcové chromatografie rozdělit na 16 frakcí. Z frakce GV-3 byly v rámci této práce izolovány 3 alkaloidy v dostatečném množství k dalšímu testování - 1,2-didehydroaspidospermidin (GV3-C1-a-1), zenkeren (GV3-J1) a 19,20-dihydrovinkanin (GV3-J2). V literatuře je o těchto alkaloidech jen velmi málo informací a žádné studie nezmiňují jejich izolaci z druhu *G. vellosii* Allemão. Alkaloid 1,2-didehydroaspidospermidin byl poprvé izolován roku 1963 z druhu *Aspidosperma quebracho blanco* Schltldl (82). Je také obsažen v rostlinách *Rhazya stricta* Decne. (83), *Kopsia arborea* Blume (84) a *Rauvolfia serpentina* (L.) Benth. ex Kurz (85). Zenkeren byl poprvé izolován z druhu *Strychnos zenkeri* Gilg et Baker roku 1997 (86). O 19,20-dihydrovinkaninu se okrajově zmiňují 3 články, nejstarší z roku 1963, jejichž obsah je bohužel nedostupný (87 - 89). U alkaloidů zenkerenu a 19,20-dihydrovinkaninu byly také prvně popsány NMR spektra, které nebyly prozatím zmíněny v žádných zdrojích. Z tohoto důvodu u těchto dvou alkaloidů nemohla být na základě NMR dat určena absolutní konfigurace. K její určení je v budoucnu potřeba provést x-ray analýzu, či změření cirkulárního dichroismu.

V rámci této práce byla u těchto alkaloidů stanovena biologická aktivita *in vitro* vůbec poprvé. Nejprve bylo zjištěno procento inhibice enzymů AChE a BChE při koncentraci 100  $\mu\text{M}$ . Inhibice AChE byla u všech enzymů  $\leq 5$  %, což značí nevýznamnou aktivitu a nebyl zde důvod ke stanovení inhibiční koncentrace. V případě druhého enzymu byly zaznamenány hodnoty  $\geq 50$  %. Nejlepší výsledek inhibiční koncentrace vůči BChE vykazoval alkaloid 1,2-didehydroaspidospermidin s  $\text{IC}_{50} = 10,71 \pm 2,72$   $\mu\text{g/ml}$ . Tato aktivita je vyšší než např. u známého léčiva galanthaminu s  $\text{IC}_{50} = 33,69 \pm 2,66$ . Inhibiční koncentrace nebyla stanovena u

alkaloidu zenkerenu, z důvodu nedostatečného množství. 19,20-dihydrovinkanin nevykazoval v porovnání se standardy signifikantní anticholinesterasovou aktivitu.

Hepatotoxicita byla u alkaloidů stanovena při třech koncentracích (50, 10 a 1  $\mu\text{M}$ ), kdy byla sledována životaschopnost buněčných linií HepG2 po 24hodinovém působení alkaloidů. Hodnoty viability se pohybovaly v rozmezí 80 – 100 %. Nejnižší toxicitu z alkaloidů prokázal zenkeren. U měření alkaloidu 19,20-dihydrovinkaninu při koncentraci 1  $\mu\text{M}$  vyšly nekonzistentní hodnoty, avšak lze předpokládat, že by byla hodnota vyšší než 90% podle předchozích koncentrací. Z uvedených výsledků plyne, že izolované alkaloidy by neměly být hepatotoxické, avšak pro přesnější zhodnocení toxicity je třeba detailnějších studií.

V dostatečném množství byly izolovány dva alkaloidy, u kterých bude možné pokračovat ve stanovení dalších biologických testů související s patofyziologií AD jako např. inhibice enzymu prolyl-oligopeptidasy, či glykogen synthasy kinasy 3 $\beta$ . V blízké budoucnosti u nich bude rovněž testována i antimalarická aktivita.

## 7 REFERENCE

1. Spilková, Jiřina. *Farmakognozie*. Praha : Univerzita Karlova v Praze, nakladatelství Karolinum, 2016. 978-80-246-3264-3.
2. Dey, Prasanta a Kundu, Amit. Analysis of alkaloids (indole alkaloids, isoquinoline alkaloids, tropane alkaloids). *Recent Advances in Natural Products Analysis*. Elsevier, 2020.
3. K. Sim, Stephen. *Medicinal Plant Alkaloids : An Introduction for Pharmacy Students (2nd Edition)*. Toronto : University of Toronto Press, 2019. 1-4875-8476-8.
4. MAIA, Lenize F., Márcia R. ALMEIDA, Dhieniffer F. CARVALHO, et al. Tracking pereirine and flavopereirine in pau-pereira using Raman and SERS spectroscopies. *New Journal of Chemistry*. vol. 43, 2019, Sv. 11200-11208, issue 28.
5. Musílek, Kamil a Komárková, Lenka. *Ekonomická zátěž léčby a péče o osoby s demencí*. Hradec Králové : Technologická agentura České republiky, 2018. TL01000300.
6. Dey, Abhijit, Mukherjee, Anuradha a Chaudhury, Madhubrata. Alkaloids From Apocynaceae. *Studies in Natural Products Chemistry*. 2017, Sv. doi:10.1016/B978-0-444-63931-8.00010-2, stránky 373-488.
7. Jahodář, Luděk. *Farmakobotanika*. Vyd. 3., upr. a dopl. Praha : Karolinum, 2011.
8. Livshultz, Tatyana, a další. Generic delimitation in Apocynaceae (Apocynaceae). *Taxon*. vol. 67, 2018, issue 2, doi: 10.12705/672.5.
9. Petruzzello, Melissa a Encyclopaedia, Editors of. Britannica. [Online] 2 2020. [Citace: 22. 1 2022.] <https://www.britannica.com/plant/Apocynaceae>.
10. Apocynaceae. Zhenghao Xu a Le Chang. *Identification and Control of Common Weeds: Volume 3*. Singapore : Springer Singapore, 2017, doi:10.1007/978-981-10-5403-7\_4.
11. McDonough, Kevin. Trees of Western North America. *Reference Reviews*. vol. 31, 2017, Sv. 24-25, issue 3, doi: 10.1108/RR-12-2016-0287.
12. Plant Systematics. Michael G. Simpson. *Diversity and Classification of Flowering Plants*. Academic Press, 2010, doi:10.1016/B978-0-12-374380-0.50008-7.
13. Martino, Emanuela, Casamassima, Giuseppe a Castiglione, Sonia. *Vinca* alkaloids and analogues as anti-cancer agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. vol. 28, 2018, Sv. 2816-2826, issue 17, doi:10.1016/j.bmcl.2018.06.044.
14. Naeem, M., Aftab, Tariq a Masroor, M. *Catharanthus roseus Current Research and Future Prospects*. Springer, Cham, 2017. 978-3-319-51620-2, doi:10.1007/978-3-319-51620-2.
15. Saunders, Bob. GardensOnline. *Catharanthus roseus*. [Online] GardensOnLine. [Citace: 23.2.2022.] [https://www.gardensonline.com.au/gardenshed/plantfinder/show\\_2762.aspx](https://www.gardensonline.com.au/gardenshed/plantfinder/show_2762.aspx).

16. REHMAN, Summia, JAN, Bushra a RASHID, Irfan. *Genome editing: applications for medicinal and aromatic plants. Medicinal and aromatic plants: expanding their horizons through omics*. London : Academic Press, 2021. 9780128195901, doi:10.1016/B978-0-12-819590-1.00006-9.
17. KUMAR, BRIJESH. *Phytochemistry of plants from genus Rauvolfia*. Florida : Boca Raton, 2020. 1-000-07154-5.
18. Vinayaraj. wikimedia. *Rauvolfia serpentina*. [Online] 9. 8 2013. [Citace: 23. 2 2022.] [https://commons.wikimedia.org/wiki/Category:Rauvolfia\\_serpentina#/media/File:Rauvolfia\\_serpentina.JPG](https://commons.wikimedia.org/wiki/Category:Rauvolfia_serpentina#/media/File:Rauvolfia_serpentina.JPG).
19. Khanavi, Mahnaz, Pourmoslemi, Shabnam a Farahanikia, Behnaz. Cytotoxicity of *Vinca minor*. *Pharmaceutical Biology*. vol. 48, 2009, Sv. 96-100, issue 1, doi: 10.3109/13880200903046187.
20. BHAMBHANI, Sweta, Kirtikumar R. KONDHARE, Ashok P. Diversity in Chemical Structures and Biological Properties of Plant Alkaloids. *Molecules*. vol. 26, 2021, Sv. 3374, issue 11, 10.3390/molecules26113374.
21. *Vinca minor*. *MyPalmShop*. [Online] Gardenpalms Europe BV. [Citace: 23. 2 2022.] <https://www.mypalmshop.nl/vinca-minor>.
22. OFORI – BAAH, Samuel, Lawrence Sheringham BORQUAYE a Tianzhu ZANG. Ethanolic leaf extract from *Strophanthus gratus* (Hook.) Franch. (Apocynaceae) exhibits anti-inflammatory and antioxidant activities. *Cogent Biology*. vol. 5, 2019, Sv. 2331-2025, issue 1.
23. *STROPHANTHUS GRATUS*. *nova*. [Online] Nova-Photo-Graphik GmbH, 16. 12 1998. [Citace: 23. 2 2022.] <https://nova.co.at/marsNova/en/instance/picture/STROPHANTHUS-GRATUS.xhtml?oid=65335>.
24. MENDES, Fúlvio Rieli, Dianne da Rocha PRADO. *Innovations in the Treatment of Substance Addiction*. Cham : Springer International Publishing, 2016. 978-3-319-43170-3, 10.1007/978-3-319-43172-7\_4.
25. PETERS, Jamie, David E OLSON. Engineering Safer Psychedelics for Treating Addiction. *Neuroscience Insights*. vol. 16, 2021, Sv. 2633-1055, doi: 10.1177/26331055211033847.
26. about iboga. *iboga.io*. [Online] iboga.io. [Citace: 23. 2 2022.] <http://iboga.io/about-iboga/>.
27. KHYADE, Mahendra S., Deepak M. KASOTE, Nityanand P. VAIKOS. *Alstonia scholaris* (L.) R. Br. and *Alstonia macrophylla* Wall. ex G. Don. *Journal of Ethnopharmacology*. vol. 153, 2014, Sv. 03788741, issue 1, doi:10.1016/j.jep.2014.01.025.
28. ZHAO, Yun-Li, Shi-Biao PU, Yan QI, Bai-Fen WU. Pharmacological effects of indole alkaloids from *Alstonia scholaris* (L.) R. Br. on pulmonary fibrosis in vivo. *Journal of Ethnopharmacology*. vol. 267, 2021, Sv. 03788741, doi:10.1016/j.jep.2020.113506.
29. lobster20. Blackboard tree, devil tree, *alstonia scholaris* linn. r. br., flowers, herbs, thailand has medicinal properties. *123RF*. [Online] [Citace: 24. 2 2022.]

[https://www.123rf.com/photo\\_50238149\\_blackboard-tree-devil-tree-alstonia-scholaris-linn-r-br-flowers-herbs-thailand-has-medicinal-propert.html?vti=mvj1hk9aexfwy2ha-3-158](https://www.123rf.com/photo_50238149_blackboard-tree-devil-tree-alstonia-scholaris-linn-r-br-flowers-herbs-thailand-has-medicinal-propert.html?vti=mvj1hk9aexfwy2ha-3-158).

30. MISHRA, Vinay Kumar, Braj Kishore RATHOUR, Sunil K. MISHRA. Cardenolide and pregnatriene compounds from the roots of *Nerium oleander*. *Natural Product Research*. vol. 35, 2021, Sv. 1478-6419, issue 21, doi: 10.1080/14786419.2020.1747460.

31. CAO, Yuan-Lin, Meng-Han ZHANG, Yun-Fang LU, Chen-Yang LI. Cardenolides from the leaves of *Nerium oleander*. *Fitoterapia*. vol. 127, 2018, Sv. 0367326X, doi: 10.1016/j.fitote.2018.03.004.

32. *Oleander (Nerium oleander)*. *onzaden*. [Online] Onszaden. [Citace: 29. 8 2022.] [https://onzaden.com/Nerium\\_oleander](https://onzaden.com/Nerium_oleander).

33. Allemão, F.F. *Plantas Novas do Brasil 707*. 1846.

34. world checklist of selected Plant families WCSP. *Kew.org*. [Online] Royal Botanic Gardens, Kew, 3.. 4. 2017. [Citace: 17.. 3. 2022.] <http://wcsp.science.kew.org/>.

35. CAMARGO, Marlene Rodrigues Marcelino, Rodrigo César das Neves AMORIM, Luiz Francisco Rocha. Chemical composition, ethnopharmacology and biological activity of *Geissospermum* Allemão species (Apocynaceae Juss.). *Revista Fitos*. vol. 8, 2013, Sv. 1808-9569, issue 2, doi:10.5935/1808-9569.20130002.

36. John Miers. Ed. Williams, Norgate. *Geissospermum laeve [archive] dans On the Apocynaceae of South America : with some preliminary remarks on the whole family...* London, 1878.

37. LORENZI, HARRI. *ARVORES BRASILEIRAS*. Brazil : INSTITUTO PLANTARUM DE ESTUDOS DA FLORA LTDA., 1998. 85-86714-07-0.

38. Ballati, Arianna. NORD E SUD DEL MONDO PT.3. *ongood*. [Online] ongood, 22. 4 2022. [Citace: 14. 7 2022.] <https://ongood.eu/evidenza/nord-e-sud-del-mondo-pt-3/>.

39. LIMA, Josélia A., Rodrigo Saar COSTA, Rosangela A. EPIFÂNIO. *Geissospermum vellosii* stembark. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. vol. 92, 2009, Sv. 00913057, issue 3, doi:10.1016/j.pbb.2009.01.024.

40. Fern, Ken. Tropical Plants Database. *Useful Tropical Plants*. [Online] Useful Tropical Plants Database, 3. 7 2021. [Citace: 4. 3 2022.] <[tropical.theferns.info/viewtropical.php?id=Geissospermum+laeve](http://tropical.theferns.info/viewtropical.php?id=Geissospermum+laeve)>.

41. da Silva e Silva, João Victor, Cordovil Brígido, Heliton Patrick a Oliveira de Albuquerque, Kelly Cristina. Flavopereirine—An Alkaloid Derived from *Geissospermum vellosii*—Presents Leishmanicidal Activity In Vitro. *Molecules*. vol. 24, 2019, Sv. 1420-3049, issue 4.

42. El-sayed, Mardia T, Hamdy, Nehal A a Osman, Dalia A. Indoles as anticancer agents. *Advances in Modern Oncology Research*. 2424-7855, 2015, Sv. vol. 1, issue 1.



43. De Luca, Vincenzo a Salim, Vonny. Towards Complete Elucidation of Monoterpene Indole Alkaloid Biosynthesis Pathway: *Catharanthus roseus* as a Pioneer System. Nathalie GIGLIOLI-GUIVARCH. *New light on alkaloid biosynthesis and future prospects*. Amsterdam : Netherlands: Academic Press, 2013.
44. O'Connor, Sarah E. a Maresh, Justin J. Chemistry and biology of monoterpene indole alkaloid biosynthesis. *Natural Product Reports*. vol. 23, 2006, Sv. 0265-0568, issue 4.
45. Buckingham, John, Baggaley, Keith H. a Roberts, Andrew D. *Dictionary of Alkaloids*. New York : Taylor & Francis Group, 2010. 978-1-4200-7769-8.
46. FOX RAMOS, Alexander E., Charlotte ALCOVER, Laurent EVANNO, et al. Revisiting Previously Investigated Plants. *Journal of Natural Products*. vol. 80, 2017, Sv. 1007-1014, issue 4.
47. WERNER, Juliana A.T., Sara M. OLIVEIRA, Daniel F. MARTINS. Evidence for a role of 5-HT1A receptor on antinociceptive action from *Geissospermum vellosii*. *Journal of Ethnopharmacology*. vol. 125, 2009, Sv. 03788741, issue 1, 10.1016/j.jep.2009.05.026.
48. LIMA, JOSÉLIA A., THIAGO W.R. COSTA, LEANDRO L. SILVA. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of a *Geissospermum vellosii* stem bark fraction. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. vol. 88, 2016, Sv. 1678-2690, issue 1.
49. Rosa Maria Correa Saraiva, Edinilza da Silva Borges , Fabrício Alexopulos Ferreira. ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF MEDICINAL PLANTS AGAINST MULTIDRUG-RESISTANT BACTERIA. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research (IJPSR)*. 2012, Sv. 4841-4847, 39, doi: 10.13040/IJPSR.0975-8232.3(12).4841-47.
50. MUÑOZ, V., M. SAUVAIN, G. BOURDY. A search for natural bioactive compounds in Bolivia through a multidisciplinary approach. *Journal of Ethnopharmacology*. vol. 69, 2000, Sv. 03788741, issue 2, doi:10.1016/S0378-8741(99)00148-8.
51. MBEUNKUI, Flaubert, Mary H. GRACE, Carmen LATEGAN. In vitro antiplasmodial activity of indole alkaloids from the stem bark of *Geissospermum vellosii*. *Journal of Ethnopharmacology*. vol. 139, 2012, Sv. 03788741, issue 2, doi:10.1016/j.jep.2011.11.036.
52. YU, Jun, Qi CHEN. The plant extract of Pao pereira potentiates carboplatin effects against ovarian cancer. *Pharmaceutical Biology*. vol. 52, 2013, Sv. 1388-0209, issue 1, doi:10.3109/13880209.2013.808232.
53. LI, Jhy-Ming, Yun-Ching HUANG, Yi-Hung KUO. Flavopereirine Suppresses the Growth of Colorectal Cancer Cells through P53 Signaling Dependence. *Cancers*. vol. 11, 2019, Sv. 2072-6694, issue 7, doi:10.3390/cancers11071034.
54. YEH, Hsuan-Te, Yi-Sheng TSAI, Ming-Shan CHEN, Yi-Zhen LI. Flavopereirine induces cell cycle arrest and apoptosis via the AKT/p38 MAPK/ERK1/2 signaling pathway in human breast cancer cells. *European Journal of Pharmacology*. vol. 863, 2019, Sv. 00142999, doi:10.1016/j.ejphar.2019.172658.

55. XU, Junwu, Zhiyuan WU, Jian HUANG. Flavopereirine Suppresses the Progression of Human Oral Cancer by Inhibiting the JAK-STAT Signaling Pathway via Targeting LASP1. *Drug Design, Development and Therapy*. Volume 15, 2021, Sv. 1177-8881, doi:10.2147/DDDT.S284213.
56. Mehta, Mona, Adem, Abdu a Sabbagh, Marwan. New Acetylcholinesterase Inhibitors for Alzheimer's Disease. *International Journal of Alzheimer's Disease*. 2090-8024, 2012, Sv. vol. 2012.
57. LIMA, Josélia A., Thiago Wilson R. COSTA, Anna C.C. DA FONSECA. Geissoschizoline, a promising alkaloid for Alzheimer's disease. *Bioorganic Chemistry*. vol. 104, 2020, Sv. 00452068.
58. PACCIONI, Jean-Pierre a Henri-Philippe HUSSON. Alcaloides de *Geissospermum argenteum* (apocynaceae). *Phytochemistry*. vol. 17, 1978, Sv. 00319422, issue 12, doi:10.1016/S0031-9422(00)89308-5.
59. BERTANIA, S., G. BOURDYB, I. LANDAUA, J.C. ROBINSONC, Ph. ESTERRED. Evaluation of French Guiana traditional antimalarial remedies. *Journal of Ethnopharmacology*. vol. 98, 2005, Sv. 03788741, 1-2, doi:10.1016/j.jep.2004.12.020.
60. Gama, Vanessa. Coleta botânica. *Museu da Amazônia*. [Online] Museu da Amazônia. [Citace: 15. 3 2022.] <http://museudaamazonia.org.br/pt/2015/12/10/arvores/>.
61. ANDRADE-NETO, Valter F de, Adrian M POHLIT, Ana Cristina S PINTO, et al. In vitro inhibition of Plasmodium falciparum by substances isolated from Amazonian antimalarial plants. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. vol. 102, 2007, Sv. 359-366, issue 3.
62. Correia AF, Segovia JF, Gonçalves MC. Amazonian plant crude extract screening for activity against multidrug-resistant bacteria. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 12(6), 2008, 369-80.
63. REINA, M., W. RUIZ-MESIA, M. LÓPEZ-RODRÍGUEZ, L. RUIZ-MESIA. Indole Alkaloids from *Geissospermum reticulatum*. *Journal of Natural Products*. vol. 75, 2012, Sv. 0163-3864, issue 5, doi: 10.1021/np300067m.
64. SAJKOWSKA-KOZIELEWICZ, Joanna J., Paweł KOZIELEWICZ, Nicholas M. BARNES. Antioxidant, Cytotoxic, and Antiproliferative Activities and Total Polyphenol Contents of the Extracts of *Geissospermum reticulatum* Bark. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. vol. 2016, 2016, Sv. 1942-0900, doi: 10.1155/2016/2573580.
65. SAJKOWSKA-KOZIELEWICZ, Joanna J., Paweł KOZIELEWICZ, Katerina MAKAROVA. Geissospermiculatine, a New Alkaloid from *Geissospermum reticulatum* Bark. *Molecules*. vol. 26, 2021, Sv. 1420-3049, issue 1, doi: 10.3390/molecules26010143.
66. MILLIKEN, William. Traditional anti-malarial medicine in Roraima, Brazil. *Economic Botany*. vol. 51, 1997, Sv. 0013-0001, issue 3, doi:10.1007/BF02862091.
67. STEELE, Jonathan C. P., Nigel C. VEITCH, Geoffrey C. KITE. Indole and  $\beta$ -Carboline Alkaloids from *Geissospermum sericeum*. *Journal of Natural Products*. vol. 65, 2002, Sv. 0163-3864, issue 1, doi:10.1021/np0101705.

68. Oliveira, Bruna de. *Composição química e atividade antimalárica de Geissospermum urceolatum A. H. Gentry (Apocynaceae)*. Brasil : Instituto de Ciências Biológicas, 2018.
69. ZVĚŘOVÁ, Martina. *Alzheimerova demence*. Praha : Grada Publishing, 2017. 978-80-271-0561-8.
70. Čechová, Linda, Bartoš, Aleš a Doležil, David. Alzheimerova nemoc a mírná kognitivní porucha: diagnostika a léčba. *Neurologie pro praxi*. 12, 2011, 3.
71. JANOUTOVÁ, Jana, Martina KOVALOVÁ, Petr AMBROZ. Alzheimer's disease, appeal to public health. *Psychiatrie pro praxi*. vol. 20, 2019, Sv. 12130508, issue 3, doi:10.36290/psy.2019.032.
72. LANE, C. A., J. HARDY a J. M. SCHOTT. Alzheimer's disease. *European Journal of Neurology*. vol. 25, 2018, Sv. 13515101, issue 1, doi:10.1111/ene.13439.
73. KORÁBEČNÝ, Jan, Ondřej SOUKUP, Martin VALIŠ. *Alzheimerova nemoc, patofyziologie, klinika, farmakoterapie*. Praha : Maxdorf, 2020. 978-80-7345-643-6.
74. BRAAK, Heiko., Kelly. DEL TREDICI. *Neuroanatomy and Pathology of Sporadic Alzheimer's Disease*. Cham : Springer International Publishing, 2015. 3-319-12679-2, doi:10.1007/978-3-319-12679-1.
75. Hort, J., a další. Tau protein a beta amyloid v likvoru u Alzheimerovy choroby a normy odvozené od kognitivně zdravých kontrol. *Česká a slovenská neurologie a neurochirurgie*. 70/103, 2007, Sv. 30-36, 1.
76. Jiráček, Roman . Současné trendy v kognitivní farmakoterapii Alzheimerovy choroby. *Neurologie pro praxi*. 2002, Sv. 101-105, 2.
77. LIU, Jinping, Lirong CHANG, Yizhi SONG. The Role of NMDA Receptors in Alzheimer's Disease. *Frontiers in Neuroscience*. vol. 13, 2019, Sv. 1662-453X.
78. BULÁKOVÁ, Anna. *Izolácia alkaloidov druhu Geissospermum vellosii Alemão a štúdium ich biologickej aktivity I*. [Diplomová práca] Hradec Králové, 2020. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra farmakognozie. Vedoucí práce Šafratová, Marcela.
79. Klimeš, Jiří. *Kontrolně-analytické hodnocení léčiv lékopisnými metodami*. Hradec Králové : Nucleus HK, 2011. 978-80-87009-29-1.
80. ELLMAN, George L., K.Diane COURTNEY, Valentino ANDRES a Robert M. FEATHERSTONE. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*. vol. 7, 1961, Sv. 88-95, issue 2.
81. DELAYRE, Bastien, Cyril PIEMONTESE, Qian WANG a Jieping ZHU. TiCl<sub>3</sub>-Mediated Synthesis of 2,3,3-Trisubstituted Indolenines. *Angewandte Chemie International Edition*. vol. 59, 2020, Sv. 13990-13997, issue 33.

82. Smith, G. F. a Wahid, M. A. 760. The isolation of ( $\pm$ )- and (+)-vincadifformine and of (+)-1,2-dehydroaspidospermidine from *Rhazya stricta*. *J. Chem. Soc.* vol. 0, 1963, Sv. 4002-4004, issue 0.
83. ABDUL-HAMEED, Zainab H., Walied M. ALARIF, Tariq R. SOBHI. New cytotoxic indole-type alkaloids obtained from *Rhazya stricta* leaves. *South African Journal of Botany*. vol. 137, 2021, Sv. 298-302.
84. WU, Yuqiu, Mariko KITAJIMA, Noriyuki KOGURE, Yunsong WANG. Two New Aspidosperma Indole Alkaloids from Yunnan *Kopsia arborea*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. vol. 58, 2010, Sv. 961-963, issue 7.
85. SHELUDKO, Yuri, Irina GERASIMENKO, Olga PLATONOVA, Yunsong WANG,. Divergence of the Indole Alkaloid Pattern in Two Somatic Hybrid Plant Cell Subcultures of *Rauvolfia serpentina*  $\times$  *Rhazya stricta*. *Planta Medica*. vol. 66, 2000, Sv. 656-659, issue 7.
86. Thepenier, P. & Jacquier, M.J. & Massiot. *Strychnos zenkeri* alkaloids. *Bulletin de la Societe Royale des Sciences de Liege*. 1997, 66. 341-344. .
87. Petrov, K. I., Pervykh, V. G. a Bol'shakova, N. K. Infrared absorption spectra of the alunite-type basic salts of Ga. *Zhurnal Neorganicheskoi Khimii*. 1966, Sv. 1392-6, 11(6).
88. Soedinenii, Khimiya Prirodnikh. Integral intensities of the infrared NH, C:C, and C:O stretching vibration bands in the *Vinca* alkaloids spectra. *Khimiya Prirodnikh Soedinenii* . 185-92, 1966, 2(3).
89. Budzikiewicz, H., a další. Mass spectrometry in structural and stereochemical problems. XIX. Akuammicine and related alkaloids. *Tetrahedron*. 19(8), 1963, 1265-76.

## 8 ABSTRAKT

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakognozie a farmaceutické botaniky

*Kandidát:* Markéta Vlková

*Školitel:* PharmDr. Marcela Šafratová, Ph.D.

*Název diplomové práce:* Izolace alkaloidů druhu *Geissospermum vellosii* Allemão a studium jejich biologické aktivity V.

Studie byla podpořena projekty SVV 260 550 a PROGRES Q42.

*Klíčová slova:* *Geissospermum vellosii*, izolace, indolové alkaloidy, Alzheimerova choroba, AChE, BChE, cytotoxicita, Apocynaceae

Strom GV, běžně rostoucí v Amazonských deštných pralesích, obsahuje početné množství indolových alkaloidů, které by mohly potenciálně přispět k léčbě neurodegenerativních onemocnění jako je Alzheimerova choroba. Diplomová práce navazuje na dřívější studii skupiny ADINACO, ve které byl z 43 kg sušené drcené kůry připraven etherový alkaloidní extrakt a také rozdělen sloupcovou chromatografií na 16 frakcí (GV). Práce pokračuje rozdělením frakce GV-3 (1,37g) na 11 podfrakcí (A–K) za použití flash chromatografie. Na základě výsledků analytické TLC, byla dále práce zaměřena na podfrakce C a J, ze kterých byly izolovány 3 alkaloidy pomocí preparativní TLC. Analýzou NMR a GC/MS-EI byly určeny struktury látek a byla ověřena jejich čistota. Izolované látky byly identifikovány jako 19,20-dihydrovinkanin, 1,2-didehydroaspidospermidin a zenkeren. Anticholinesterasová aktivita byla stanovena testováním vůči lidské rekombinantní acetylcholinesterase (*hAChE*) a butyrylcholinesterase (*hBChE*). Inhibice *hAChE* byla nízká u všech alkaloidů, naproti tomu inhibice *hBChE* byla signifikantně vyšší. Nejlepší inhibiční aktivitu prokázal alkaloid 1,2-didehydroaspidospermidin s  $IC_{50} = 10,7 \mu M$  (*hBChE*). U alkaloidů byla také měřena schopnost inhibice růstu buněčných linií jaterního karcinomu HepG2. Žádná z látek nebyla významně hepatotoxická.

## 9 ABSTRACT

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacognosy and Pharmaceutical Botany

*Candidate:* Markéta Vlková

*Supervisor:* PharmDr. Marcela Šafratová, Ph.D.

*Title of Diploma Thesis:* Isolation of alkaloids of the species *Geissospermum vellosii* Allemão and study of their biological activity V.

The study was supported by projects SVV 260 550 and PROGRES Q42

*Key words:* *Geissospermum vellosii*, isolation, indol alkaloids, Alzheimer's disease, AChE, BChE, cytotoxicity, Apocynaceae

The *Geissospermum vellosii*, a tree traditionally growing in the Amazon rainforest is rich in indole alkaloids, which showed a potential effect in the treatment of cognitive degeneration such as Alzheimer's disease. In the previous study of ADINACO group, a diethylether alkaloidal extract from 43 kg of dried crushed stem bark was prepared and separated by column chromatography into 16 fractions (GV). In this study, we used flash chromatography to further separate the fraction GV-3 (1.37 g) into 11 subfractions (A–K). Based on control TLC, we focused on subfractions C and J, from which three alkaloids were isolated by preparative TLC. The NMR and GC/MS-EI techniques determined the structure and confirmed the purity of the obtained compounds. The compounds were identified as 19,20-dihydrovincanine, 1,2-didehydroaspidospermidine and zenkerene. In order to study antineurodegenerative activities, the alkaloids were tested against human acetylcholinesterase (*hAChE*) and butyrylcholinesterase (*hBChE*). The measured inhibition for the *hAChE* was negligible, but the inhibition activity against *hBuChE* was substantially higher for all compounds. The best activity presented 1,2-didehydroaspidospermidine with  $IC_{50} = 10.7 \mu\text{M}$  for *hBChE*. All compounds were also assessed to be non-cytotoxic on hepatocarcinoma cells lines HepG2.