

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



DIPLOMOVÁ PRÁCE

**IZOLACE ALKALOIDŮ *VINCA MINOR* A JEJICH BIOLOGICKÁ AKTIVITA II.**  
**ALKALOID ISOLATION FROM *VINCA MINOR* AND THEIR BIOLOGICAL ACTIVITY II.**

Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Anna Hošťálková, Ph.D.

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

Hradec Králové, květen 2023

Vít Míšek

## **Poděkování**

Chtěl bych poděkovat PharmDr. Anně Hošťákové, Ph.D., za pomoc, ochotu, za veškeré materiály a cenné rady, které mi poskytla během vypracovávání diplomové práce, za pomoc při izolaci alkaloidů. Také bych chtěl poděkovat panu doc. PharmDr. Jiřímu Kunešovi, CSc. a PharmDr. Janě Křoustkové Ph.D., za provedení NMR analýzy a interpretaci spekter. Dále bych chtěl poděkovat PharmDr. Daniele Suchánkové za stanovení biologické aktivity alkaloidů. Obecně patří díky také celému kolektivu Katedry farmakognozie a farmaceutické botaniky za příjemné pracovní prostředí a vstřícný přístup.

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

V Hradci Králové, 2023

Vít Míšek

# OBSAH

|   |    |
|---|----|
| OBSAH .....   | 4  |
| SEZNAM OBRÁZKŮ .....  | 6  |
| SEZNAM TABULEK .....  | 6  |
| POUŽITÉ ZKRATKY.....  | 7  |
| 1. ÚVOD .....   | 9  |
| 2. ZADÁNÍ – CÍL PRÁCE .....                                 | 11 |
| 3. TEORETICKÁ ČÁST.....                                     | 12 |
| 3.1 Alzheimerova choroba .....                              | 12 |
| 3.1.1 Příčiny a rizikové faktory Alzheimerovy choroby ..... | 12 |
| 3.1.2 Klinický obraz.....                                   | 14 |
| 3.1.3 Farmakologická terapie .....                          | 15 |
| 3.2 <i>Vinca minor</i> L.....                               | 19 |
| 3.2.1 Taxonomické zařazení .....                            | 19 |
| 3.2.2 Čeleď Apocynaceae .....                               | 19 |
| 3.2.3 Rod <i>Vinca</i> .....                                | 20 |
| 3.2.4 Botanický popis <i>Vinca minor</i> L.....             | 20 |
| 3.2.5 Obsahové látky .....                                  | 21 |
| 4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....                                | 31 |
| 4.1 Příprava před izolací .....                             | 31 |
| 4.1.1 Příprava rozpouštědel .....                           | 31 |
| 4.1.2 Příprava litých desek na preparativní TLC .....       | 31 |
| 4.1.3 Odpařování extraktů a frakcí .....                    | 31 |
| 4.2 Použitá metodika.....                                   | 31 |
| 4.2.1 Tenkovrstvá chromatografie (TLC) .....                | 31 |
| 4.2.2 Detekce alkaloidů .....                               | 32 |
| 4.2.3 Eluce alkaloidů.....                                  | 32 |
| 4.3 Používaný materiál při izolaci látek .....              | 32 |
| 4.3.1 Chemikálie a rozpouštědla .....                       | 32 |

|       |   |    |
|-------|---|----|
| 4.3.2 | Pomocný materiál .....  | 33 |
| 4.3.3 | Činidlo pro detekci alkaloidů .....                             | 33 |
| 4.3.4 | Vyvíjející soustavy pro TLC.....                                | 33 |
| 4.3.5 | Přístroje .....   | 33 |
| 4.4   | Izolace alkaloidů .....   | 34 |
| 4.4.1 | Extrakce rostlinné drogy a sloupcová chromatografie.....        | 34 |
| 4.4.2 | Rozdělení na frakce .....                                       | 34 |
| 4.4.3 | Izolace jednotlivých alkaloidů.....                             | 35 |
| 4.5   | Analýza struktury.....  | 38 |
| 4.5.1 | GC/MS analýza .....   | 38 |
| 4.5.2 | NMR analýza.....  | 39 |
| 4.5.3 | Optická otáčivost.....  | 39 |
| 4.6   | Stanovení biologické aktivity .....                             | 39 |
| 5.    | VÝSLEDKY .....  | 41 |
| 5.1   | Strukturální analýza získaných látek .....                      | 41 |
| 5.1.1 | VM 259 – E <sub>3C</sub> .....                                  | 41 |
| 5.1.2 | VM 259 – E <sub>2A</sub> + E <sub>2B1</sub> .....               | 42 |
| 5.2   | Stanovení inhibiční aktivity (IC <sub>50</sub> ) alkaloidů..... | 43 |
| 6.    | DISKUSE .....   | 44 |
| 7.    | ZÁVĚR.....  | 46 |
| 8.    | POUŽITÁ LITERATURA.....   | 47 |
| 9.    | ABSTRAKT .....  | 56 |
| 10.   | ABSTRACT .....  | 57 |

## SEZNAM OBRÁZKŮ

|   |    |
|---|----|
| Obrázek č.1: Vzorec donepezilu .....  | 16 |
| Obrázek č.2: Vzorec galanthaminu.....   | 17 |
| Obrázek č.3: Vzorec rivastigminu .....  | 17 |
| Obrázek č.4: Vzorec memantinu .....   | 18 |
| Obrázek č.5: <i>Vinca minor</i> L. – porost a květ [54].....                  | 21 |
| Obrázek č.6: <i>Vinca minor</i> L. – list [54] .....                          | 21 |
| Obrázek č.7: Vzorec ajmalinu .....  | 22 |
| Obrázek č.8: Vzorec akuamminu.....  | 23 |
| Obrázek č.9: Vzorec eburnaminu .....  | 23 |
| Obrázek č.10: Vzorec oxindolu .....   | 24 |
| Obrázek č.11: Vzorec sarpaginu .....  | 25 |
| Obrázek č.12: Vzorec vinkaminu .....  | 26 |
| Obrázek č.13: Vzorec vinblastinu .....  | 26 |
| Obrázek č.14: Vzorec vinkristinu .....  | 27 |
| Obrázek č.15: Vzorec vinorelbinu.....   | 28 |
| Obrázek č.16: Vzorec vindesinu .....  | 28 |
| Obrázek č.17: Vzorec vinfluninu.....  | 29 |
| Obrázek č.18: Vzorec vinpocetinu.....   | 30 |
| Obrázek č.19: Teplotní režim GC/MS analýzy .....                              | 38 |
| Obrázek č.20: Vzorec norvinkorinu .....                                       | 41 |
| Obrázek č.21: GC/MS analýza VM 259 – E <sub>3C</sub> .....                    | 41 |
| Obrázek č.22: Vzorec striktaminu .....  | 42 |
| Obrázek č.23: GC/MS analýza VM 259 – E <sub>2A</sub> + E <sub>2B1</sub> ..... | 42 |

## SEZNAM TABULEK

|  |    |
|--|----|
| Tabulka č.1: Taxonomie <i>Vinca minor</i> L. [55] .....                          | 19 |
| Tabulka č.2: Alkaloidy ajmalinového typu.....                                    | 22 |
| Tabulka č.3: Alkaloidy akuamminového typu .....                                  | 23 |
| Tabulka č.4: Alkaloidy eburnaminového typu.....                                  | 24 |
| Tabulka č.5: Alkaloidy oxindolového typu.....                                    | 24 |
| Tabulka č.6: Alkaloidy sarpaginového typu.....                                   | 25 |
| Tabulka č.7: Frakce VM 259 .....   | 34 |
| Tabulka č.8: Zpracovávaná frakce VM 259.....                                     | 35 |
| Tabulka č.9: Rozdělení frakce VM 259-E .....                                     | 35 |
| Tabulka č.10: Rozdělení frakce VM 259-F .....                                    | 37 |
| Tabulka č.11: Parametry GC/MS analýzy .....                                      | 38 |
| Tabulka č.12: Inhibiční aktivity izolovaných alkaloidů vůči cholinesterasám..... | 43 |

## POUŽITÉ ZKRATKY

| Zkratka          | Význam zkratky   | Český význam zkratky                                |
|------------------|--|---|
| AChE             | acetylcholinesterase                                   | acetylcholinesterasa                                |
| Ach              | acetylcholine  | acetylcholin  |
| AD               | Alzheimer's disease                                    | Alzheimerova choroba                                |
| APOE             | apolipoprotein E                                       | apolipoprotein E                                    |
| APP              | amyloid precursor protein                              | amyloidový prekurzorový protein                     |
| A $\beta$ peptid | amyloid- $\beta$ peptide                               | amyloid- $\beta$ peptid                             |
| BPSD             | behavioral and psychological symptoms of dementia      | behaviorálních a psychologických příznaků demence   |
| BuChE            | butyrylcholinesterase                                  | butyrylcholinesterasa                               |
| DTNB             | 5,5-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid)                   | 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina             |
| ESI              | electrospray ionization                                | elektrosprejová ionizace                            |
| FDA              | food and drug administration                           | úřad pro kontrolu potravin a léčiv                  |
| G1/2/4           | globular forms 1/2/4                                   | globulární forma 1/2/4                              |
| GC               | gas chromatography                                     | plynová chromatografie                              |
| ChAT             | choline acetyltransferase                              | cholinacetyltransferasa                             |
| MCI              | mild cognitive impairment                              | mírná kognitivní porucha                            |
| MS               | mass spectrometry                                      | hmotnostní spektrometrie                            |
| NFT              | neurofibrillary tangles                                | neurofibrilární klubka                              |
| NIST             | National Institute of Standards and Technology Library | Národní institut standardů a technologická knihovna |
| NMDA             | <i>N</i> -methyl-D-aspartic acid                       | <i>N</i> -methyl-D-aspartátová kyselina             |

|       |                                       |   |
|-------|---------------------------------------|---|
| NMDAR | <i>N</i> -methyl-D-aspartate receptor | <i>N</i> -methyl-D-aspartátový receptor |
| NMR   | nuclear magnetic resonance            | nukleární magnetická rezonance          |
| PSEN1 | presenilin 1                          | presenilin 1                            |
| PSEN2 | presenilin 2                          | presenilin 2                            |
| TLC   | thin layer chromatography             | tenkovrstvá chromatografie              |



# 1. ÚVOD

Neurodegenerativní onemocnění jsou charakterizována předčasným zánikem nebo degenerací nervových buněk. Většina se převážně projevuje demencí. Demence je hlavní příčina invalidity a patří mezi sedm nejčastějších příčin úmrtí na světě. V současné době trpí demencí více než 55 milionů lidí a v ČR v roce 2021 bylo okolo 161 tisíc lidí trpících tímto onemocněním. Každý rok se objevuje stále více nových případů nemoci, přičemž většina zemí na tento vývoj není připravena. [1,2]

Riziko vzniku demence se zvyšuje s rostoucím věkem, mohou ji ale vyvolat také genetické faktory, poranění hlavy, cévní onemocnění, infekce, faktory prostředí a jako jedna z nejčastějších příčin Alzheimerova choroby. Alzheimerova choroba (AD) je charakteristická pozvolným rozvojem kognitivní dysfunkce, dopadem na běžné denní funkce a neuropsychiatrickými symptomy. Lidé se mohou dožít vyššího věku díky neustálému vývoji moderní léčby a možnosti jejího využití se rozšiřují. [1,2]

Onemocnění je často spojováno s akumulací proteinů amyloid- $\beta$  ( $A\beta$ ) a  $\tau$ -proteinu v mozku. Historie AD začala v roce 1907, kdy německý neuropatofyziolog Alois Alzheimer poprvé popsal tuto nemoc mozku. [3,4]

Při léčbě AD můžeme postup choroby pouze zpomalit a zamezit přechodu do závažnějšího stádia choroby. Protože tato nemoc nelze zcela vyléčit, bylo by vhodné pokračovat ve výzkumu nových léčiv. Přestože je AD problémem na celém světě zůstávají v současné terapii jen memantin, antagonist *N*-methyl-D-aspartátu (NMDA) a donepezil, rivastigmin a galanthamin. Donepezil, rivastigmin a galanthamin jsou látky blokující enzymy cholinesterasy [acetylcholinesterasa (AChE) a butyrylcholinesterasa (BuChE)], které rozkládají acetylcholin (ACh), což vede ke zvýšení hladiny ACh v synaptické štěrbině. Memantin brání nadměrné aktivaci glutamátového receptoru NMDAR a tím i vstupu  $Ca^{2+}$  do buňky a díky tomu nedochází k poklesu kognitivních funkcí a neuronové buňky nepodléhají apoptóze. [1]

Čeleď Apocynaceae je jednou z největších a nejvýznamnějších čeledí krytosemenných rostlin. Několik rostlin této čeledi má léčivé vlastnosti. Do této čeledi řadíme i okrasnou rostlinu rostoucí v ČR, kterou se zabývá i tato diplomová práce, *Vinca minor* L. [5]

*Vinca minor* L., u nás známý jako barvínek menší z rodu *Vinca*, je stálezelená rostlina, pocházející z jižní a střední Evropy. Je zdrojem indolových alkaloidů převážně monoterpenových. *Vinca* alkaloidy se mohou použít nejen pro boj s nádorovými onemocněními. Mezi hlavní *Vinca* alkaloidy, které se klinicky využívají řadíme: vinblastin, vinkamin, vinkristin a jejich polosyntetické deriváty vindesin a vinorelbin.

Za pomoci zjištění biologické aktivity přírodních látek včetně alkaloidů, můžeme určit jejich potenciál při léčbě AD. [6,7]

Inhibiční aktivita rostlin vůči cholinesterasám je dlouhodobě sledována na katedře farmakognozie a farmaceutické botaniky. Během tohoto screeningu byla zjištěna významná inhibiční aktivita *Vinca minor* vůči oběma cholinesterasám – AChE ( $IC_{50} = 7,35 \pm 2,32 \mu M$ ) a BuChE ( $IC_{50} = 80,13 \pm 0,89 \mu M$ ), proto byla vybrána jako zdroj sekundárních metabolitů pro podrobnější studium.

## 2. ZADÁNÍ – CÍL PRÁCE

Cílem této diplomové práce bylo:

- nalezení vhodné frakce pro izolaci
- nalezení vhodných metod pro izolaci alkaloidů a vlastní izolaci
- izolace alkaloidů z frakce alkaloidního extraktu z natě *Vinca minor* L.
- krystalizace a stanovení fyzikálně-chemických vlastností čistých alkaloidů
- příprava vzorků pro měření inhibice acetyl- a butyrylcholinesterasy, případně cytotoxicity a dalších testů biologické aktivity izolovaných alkaloidů
- vyhodnocení výsledků a porovnání s literaturou
- vypracování literární rešerše (přehled potenciálně významných přírodních látek rostliny, uplatnitelných v dalším studiu jako potenciální léčiva)

## 3. TEORETICKÁ ČÁST

### 3.1 Alzheimerova choroba

AD je stále rostoucí celosvětový zdravotní problém, primárně kvůli stárnutí světové populace, s dopady pro jednotlivce i společnost. Tato choroba je pojmenována po německém psychiatrovi Aloisovi Alzheimerovi, jako jeden z prvních popsal tuto nemoc. Jedná se o progresivní neurodegenerativní onemocnění, které se typicky projevuje příznaky ztráty kognitivního výkonu. [4,9-11]

Nemocný může mít prohlubující se problémy s vyjadřováním, rozhodováním, může být zmatenější a nedokončuje své myšlenky. Po dosažení 65 let, se u nemocného pacienta prevalence klinických příznaků nemoci zhruba každých 5 let zdvojnásobuje. V posledních stádiích nemoci není schopen se sám o sebe postarat a je odkázán do péče. [8]

Zdravý životní styl může snižovat riziko rozvoje demence a je tedy doporučováno mít vyrovnanou skladbu jídelníčku, nekouřit, mít kvalitní spánek, pravidelně se věnovat fyzickému cvičení a pravidelně procvičovat paměť. [8]

#### 3.1.1 Příčiny a rizikové faktory Alzheimerovy choroby

##### 3.1.1.1 Vliv genetiky

Dědičnost u AD byla odhadnuta až na 79 %. Mezi faktory, které zvyšují riziko výskytu AD, řadíme APOE  $\epsilon$ 4. Oblast apolipoproteinu E (APOE) byla po více než deset let pouze jediným genetickým rizikovým faktorem. Alela APOE $\epsilon$ 4 je umístěna na chromozomu 19q13. APOE má izofomy kódované třemi alelami, APOE $\epsilon$ 2,  $\epsilon$ 3 a  $\epsilon$ 4. Jediná alela APOE- $\epsilon$ 4 je spojena s dvounásobným až třínásobným zvýšením rizika AD, navíc každá zděděná alela APOE $\epsilon$ 4 snižuje věk při nástupu onemocnění o 6–7 let. APOE je významně asociován s A $\beta$ 11,35,36,40. Předpokládá se, že APOE přispívá k akumulaci  $\beta$ -amyloidu. [14, 17]

Vzácná familiární forma AD je založena na podkladě autozomálně dominantních mutací v amyloidovém prekursorovém proteinu (APP), presenilin 1 (PSEN1) a presenilin 2 (PSEN2) genu. Mají společný patogenní mechanismus zahrnující zvýšenou tvorbu a agregaci amyloidního  $\beta$  proteinu. Autozomálně dominantní mutace představují méně než 1 % případů. U pacientů, u nichž je známo, že jsou nositeli těchto mutací (tj. mutace APP, PSEN1, PSEN2), je pravděpodobné, že se u nich AD v určitém věku rozvine. [14, 16]

### 3.1.1.2 Cholinergní systém

Porucha cholinergního systému se podílí na řadě chorobných stavů. ACh má důležitou roli v kognitivních procesech, proto je cholinergní systém označen za důležitý u mnoha forem demence, včetně AD. Během onemocnění dochází ke snížení produkce ACh, která je způsobena významným úbytkem cholinacetyltransferasy (ChAT). ChAT je enzym, který je odpovědný za syntézu ACh. Tím dochází na neuronových synapsích ke snížení koncentrace ACh. Za pomoci enzymu AChE nebo méně specifického enzymu BuChE je acetylcholin hydrolyzován. [18, 19, 21]

V asymetrických formách (formách A4, A8 a A12) existuje AChE. Tyto asymetrické formy, obsahující katalytické jednotky, jsou připojené k tzv. collagen-like tail. AChE existuje i ve třech globulárních formách (G formy) obsahující jednu, dvě nebo čtyři katalytické podjednotky (monomerní G1, dimerní G2 a tetramerní G4). G1 AChE existuje pouze jako rozpustná entita, zatímco G4 AChE existuje v rozpustné i membránově vázané formě. V lidském mozku je AChE přítomné ve formách G1 a G4, jejichž podíly se liší v různých oblastech mozku. BuChE také existuje v molekulárních formách G1, G2 a G4, ale podobně jako AChE je G4 převládající izoformou v mozku. [22]

V mozku pacientů s AD je hladina G4 AChE snížena o 90 % nebo více v důsledku ztráty presynaptických zakončení v hipokampu a amygdale. Nicméně, hladiny G1 AChE zůstávají do značné míry nezměněny. Nárůst hladin G1 AChE může nastat kolem A $\beta$  plaků. G1 forma BuChE je v mozku u pacientů s AD zvýšena o 30–60 %, pravděpodobně v důsledku zvýšení počtu BuChE-pozitivních glií, zatímco forma G4 klesá, respektive zůstává na stejné úrovni jako v mozku zdravých lidí. [22]

V rámci cholinergní léze procházejí změnami i nikotinové receptory a muskarinové receptory mozkové kůry. U pacientů s AD může docházet k poklesu nikotinových receptorů v mozkové kůře. S ohledem na muskarinové receptory mozkové kůry je zajímavé, že muskarinové ( $M_1$ ) receptory (většinou postsynaptické) nejsou sníženy, zatímco  $M_2$  receptory (většinou presynaptické) jsou sníženy. [20, 23]

### 3.1.1.3 Senilní amyloidní plaky a neurofibrilární klubka

Amyloidní plaky a neurofibrilární klubka (NFT) jsou uznávány jako histopatologické projevy AD. Základní složkou NFT je fosforylovaný  $\tau$ -protein, zatímco plaky jsou složeny ze skládaných vrstev A $\beta$  peptidu. Pro AD je typická kombinace amyloidních plaků a neurofibrilárních klubek, což AD odlišuje od většího počtu neurodegenerativních onemocnění, jako například frontotemporální demence. [14, 24, 26]

A $\beta$  peptidy se skládají z různého počtu aminokyselin a jsou vytvářeny štěpením APP několika enzymovými komplexy známými jako sekretasy. Štěpení  $\alpha$ -sekretasou a následně komplexem  $\gamma$ -sekretasy vede ke vzniku A $\beta$ 40, proteinu, který nezpůsobuje patologické akumulace v mozku. Ke kumulaci nerozpustných A $\beta$  proteinů A $\beta$ 42 dochází tím, že se štěpí APP nejprve za pomoci  $\beta$ -sekretasy a následně komplexem  $\gamma$ -sekretasy. K této alternativní amyloidogenní cestě dochází u pacientů s AD. Za apoptózu buněk, která je způsobena nekontrolovatelným influxem vápníku do buňky, je zodpovědný amyloidogenní protein, který je v mozku hlavní složkou amyloidních plaků. Tím, že se kumulují A $\beta$  dochází ke spuštění neurotoxické kaskády, která vede k tvorbě plaků, fosforylaci  $\tau$ -proteinu, tvorbě neurofibrilárních klubek, zánětu, synaptické ztrátě a nakonec zániku neuronů. Odhalit pacienty s AD můžeme díky tvorbě amyloidních (senilních) plaků, které jsou objeveny mezi prvními změnami onemocnění AD. [14, 16, 25, 26]

### 3.1.1.4 $\tau$ -Protein

$\tau$ -Protein je důležitý pro axonální transport neuronů v mozku. U AD dochází k fosforylaci  $\tau$ -proteinu, to se projevuje několika patologickými modifikacemi  $\tau$ -proteinu. Tyto změny vedou k agregaci  $\tau$ -proteinu a ke vzniku NFT. Akumulace NFT může ovlivňovat axonální transport a růst neuronů, což vede k apoptóze a ztrátě neuronů, to se projevuje jako kognitivní poškození mozku. Patologie  $\tau$ -proteinu je sledována v hipokampu a odtud se poškození rozšiřuje po celém mozku. Hladiny fosforylovaného  $\tau$ -proteinu lze stanovit z mozkomíšního moku, tyto hladiny jsou běžným ukazatelem AD. [27-29]

## 3.1.2 Klinický obraz

Dříve než je pacientovi diagnostikována AD, dochází k strukturálním změnám v mozku, včetně ztráty objemu hipokampu a sníženého metabolismu glukosy. Proces onemocnění může trvat roky, než se projeví na pacientovi, proto je pacienta s demencí těžké rozpoznat. V pozdějších stádiích způsobuje degeneraci buněk v mozku, která se vyznačuje poklesem kvality myšlení a samostatnosti v každodenních činnostech. Postupně se při nemoci může objevit změna chování, zhoršená pohyblivost, halucinace a záchvaty. [8,12, 14]

Průběh choroby je vysoce heterogenní. Tato heterogenita představuje problémy, protože je obtížné předpovídat budoucí symptomy a funkční poruchy. AD může způsobit jak kognitivní, tak i nekognitivní příznaky. Mezi kognitivní příznaky se řadí problémy s pamětí, řečí a s časovou a prostorovou dezorientací. Nekognitivní příznaky zneschopňují pacienta. Mezi ně řadíme behaviorální a psychiatrické symptomy, zahrnující poruchy nálad (deprese, úzkost), podráždění. [13]

Alzheimerovu chorobu můžeme rozdělit na 4 fáze.

1. Presymptomatická fáze je charakterizována mírnou ztrátou paměti a mohou se vyskytovat patologické změny v mozku, bez funkčního poškození v každodenních činnostech a bez klinických známek a symptomů.
2. Mírná fáze AD tzv. mild cognitive impairment fáze (MCI), mírné kognitivní poruchy, kdy se u pacientů začínají objevovat příznaky, jako jsou potíže se ztrátou koncentrace a paměti, dezorientací, změnou nálady a rozvoj deprese.
3. Středně těžká fáze AD, ve kterém postihuje mozek ve větším rozsahu, následkem je zvýšená ztráta paměti a tím i problém s rozpoznáním rodiny a přátel, potíže se čtením, psaním a mluvením.
4. Těžká fáze AD, které zahrnuje rozšíření onemocnění do celé oblasti kůry, což vede k progresivnímu funkčnímu a kognitivnímu poškození, kdy pacienti vůbec nerozpoznají svou rodinu. Pacienti se o sebe neumějí postarat, a proto mohou být upoutáni na lůžko, může docházet k úniku moči, mohou mít potíže s polykáním, a nakonec může tento stav vést k pacientově smrti v důsledku dalších komplikací. [1,8,14,15]

### **3.1.3 Farmakologická terapie**

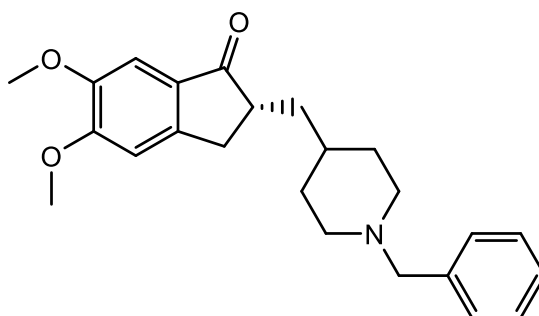
Léčba AD je dnes pouze symptomatická, můžeme postup choroby pouze zpomalit a zamezit zhoršení choroby, protože dodnes nebyly nalezeny žádné látky, u kterých by byl prokázán potenciál kauzálně léčit toto onemocnění. Současná farmakologická léčba se soustředí na zachování mentálních schopností, oddálení progresu a tím zpomalení vzniku příznaků onemocnění. [30]

V léčbě AD a demence je podstatné se zaměřit i na nefarmakologickou léčbu, vzhledem k účinnosti současné farmakologické léčby. Nefarmakologická léčba může zlepšit soběstačnost, kvalitu života a je zaměřena hlavně na nejrůznější aktivity. Vždy by se měla týkat fyzické i psychické stránky pacienta. Farmakologická léčba zahrnuje dva způsoby terapie, terapii kognitivních poruch a terapii tzv. behaviorálních a psychologických příznaků demence (BPSD) spojených s AD. Terapie BPSD zahrnuje terapii podrážděnosti, deprese a úzkosti. K léčbě psychóz, které se vyskytují u některých

pacientů s AD jsou v rámci BPSD terapie běžně používány tzv. atypická antipsychotika. Dlouhodobá terapie antipsychotiky by mohla zhoršovat kognitivní funkce pacienta. Základem léčby kognitivních poruch jsou inhibitory cholinesterasy (donepezil, galanthamin a rivastigmin) a antagonisty NMDAR (memantin). [4, 8, 21, 30-33]

### 3.1.3.1 Donepezil

Donepezil je reverzibilní, selektivní inhibitor AChE se zanedbatelným účinkem na BuChE. Ve své struktuře obsahuje piperidin, základní skelet struktury léčiva, od kterého je odvozen. Donepezil byl v roce 1996 schválen Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (FDA) pro léčbu mírných až středně těžkých případů AD. Později i pro léčbu těžkých případů AD. Je to jediný inhibitor, který byl schválen pro použití ve všech stádiích AD. Donepezil je odpovědný za blokaci centrálně aktivní acetylcholinesterasy, čímž se zabraňuje hydrolýze acetylcholinu a díky tomu dochází ke zvýšení hladin acetylcholinu v mozku. Vyznačuje se poměrně dobrou snášenlivostí pacientů, způsobuje mírné nežádoucí účinky jako jsou svalové křeče, bolest hlavy, závratě a gastrointestinální nežádoucí účinky jako zvracení a průjem. [1, 19, 34-36]

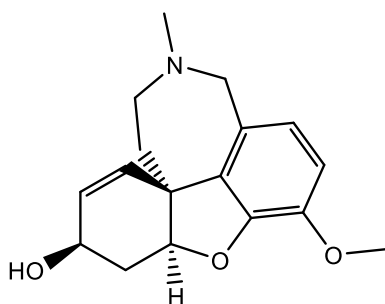


Obrázek č.1: Vzorec donepezilu

### 3.1.3.2 Galanthamin

Galanthamin je selektivní terciární isochinolinový alkaloid, jedná se o kompetitivní a reverzibilní inhibitor acetylcholinesterasy. Má mnohem vyšší selektivitu pro AChE ve srovnání s BuChE. Kromě působení na AChE a BuChE také působí na nikotinové receptory, má tedy aktivizující účinek a díky tomu zlepšuje mikrocirkulaci mozku. Toto léčivo bylo schváleno FDA v roce 2001 a je považováno za standardní lék pro mírné až středně těžké případy AD. Může se syntetizovat organickou syntézou, ale původně se izoloval z rostlin, primárně izolován z narcisu (*Narcissus* spp.), sněženky (*Galanthus* spp.) a bledule letní (*Leucojum aestivum*). I s užíváním galanthaminu se mohou vyskytovat nežádoucí účinky, způsobuje silnou nevolnost, žaludeční křeče a zvracení. Může prodloužit QT interval a tím způsobit arytmie. [1, 34, 35, 37-39]

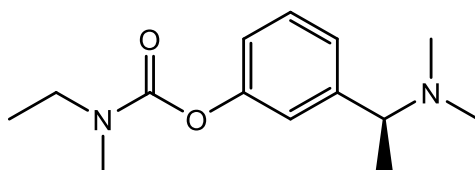




Obrázek č.2: Vzorec galanthaminu

### 3.1.3.3 Rivastigmin

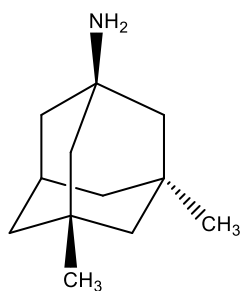
Rivastigmin je pseudoireverzibilní inhibitor AChE a BuChE, pro symptomatickou léčbu mírné až středně těžké AD, byl schválen FDA v roce 2000. Může být užíván ve formě tablet nebo kapek, podává se i v transdermálních náplastech. A právě transdermální náplasti umožňují kontinuální uvolňování do cévního řečiště po dobu 24 hodin, čímž se zabrání gastrointestinálním nežádoucím účinkům, které jsou u rivastigminu typické. Je však nutné střídání aplikačních ploch, protože mohou vyvolat erytém, edém nebo dermatitidu v místě aplikace. [1, 34, 35, 37]



Obrázek č.3: Vzorec rivastigminu

### 3.1.3.4 Memantin

Memantin je nekompetitivní antagonist NMDA- receptorového podtypu glutamátového receptoru, čímž zabraňuje nadměrné aktivaci glutaminových receptorů. Dochází ke snížení vstupu vápníku do neuronů a zabraňuje tak apoptóze neuronů. Je to léčivo schválené FDA v roce 2002 pro symptomatickou léčbu středně těžké až těžké AD a zůstává tak jediným lékem ve své třídě. Memantin je relativně bezpečný a má dobrou snášenlivost. S léčbou mohou vzácně souviset vedlejší účinky jako je zmatenost, závrať, zácpa, bolest hlavy a ospalost. [40-42]



**Obrázek č.4:** Vzorec memantinu

### 3.1.3.5 Další látky

Různé preklinické studie podporují názor, že standardizovaný extrakt *Ginkgo biloba* EGb761 může být účinný při léčbě a prevenci AD, převážně u pacientů s AD v časném stadiu po užívání vysokých dávek a dlouhodobém podávání extraktu. Přes jeho uznávané postavení v léčbě stále panují spory o přesném mechanismu jeho účinku, stejně jako o jeho klinické účinnosti. [43-45]

V roce 2021 se aducanumab, monoklonální protilátka, stal prvním lékem, který cílí na základní patofyziologický prvek AD, schváleným FDA. Rozhodnutí bylo založeno na schopnosti aducanumabu odstraňovat A $\beta$  plaky. Toto rozhodnutí vyvolalo značnou debatu ve vědecké komunitě, zejména proto, že výsledky dvou studií fáze 3, byly rozdílné, a dokonce nebyly údaje dostatečné k prokázání účinnosti aducanumabu. Navzdory kontroverzi se ukázalo, že aducanumab ovlivňuje patologii  $\tau$ -proteinu, což by mohlo být výhodné pro kombinovanou terapii AD. [46]

V roce 2022 začaly studie u humanizované monoklonální protilátky IgG1, lecanemab, která se váže na rozpustné protofibrily A $\beta$ , je testována u osob s časnou AD. Lecanemab snížil markery amyloidu v časně fázi AD a vedl k mírně menšímu poklesu kognice, než tomu bylo u placebo po 18 měsících, ale byl spojen s nežádoucími účinky, které ve studii nebyly blíže specifikovány. Nicméně nejčastější nežádoucí účinky zahrnují zarudnutí, zimnice, horečka, vyrážka a bolesti těla, které souvisejí s infuzním podáním. Pro stanovení účinnosti a bezpečnosti lecanemabu u časně AD jsou plánovány další studie. [47, 94]

## 3.2 *Vinca minor* L.

### 3.2.1 Taxonomické zařazení

Tabulka č.1: Taxonomie *Vinca minor* L. [55]

|        |                       |
|--------|-----------------------|
| Říše:  | Plantae               |
| Řád:   | Gentianales           |
| Čeleď: | Apocynaceae           |
| Rod:   | <i>Vinca</i>          |
| Druh:  | <i>Vinca minor</i> L. |

### 3.2.2 Čeleď Apocynaceae

Čeleď Apocynaceae je jednou z deseti největších čeledí v krytosemenných rostlinách, zahrnujících 378 rodů a kolem 5000 druhů rostlin. Do řádu Gentianales (hořcotvaré) se řadí spolu s čeleděmi Rubiaceae, Loganiaceae, Gentianaceae a Asclepiadaceae. Čeleď Apocynaceae se dělí na 5 podčeledí Apocynoideae, Asclepiadoideae, Periplocoideae, Rauvolfioideae a Secamonoideae. [57]

Zástupci této čeledi zaujímají habitus keře, polokeře, byliny, ale také stromu nebo liány. Vyskytují se převážně v teplých krajinách jako jsou subtropy a tropy. Charakteristickým rysem čeledi je produkce mléčně zbarveného latexu. Některé druhy čeledi poskytují kaučuk. Srůstem čtyř až pěti korunních lístku je tvořena stavba květu. Květy jsou oboupohlavné a pravidelně uspořádané. Listy jsou vstřícné, výjimečně střídavé nebo řidčeji přeslenité. Plodem může být měchýřek různého tvaru, ale také tobolka, bobule, peckovice nebo nažka. [55-57]

Rostliny této čeledi jsou oblíbené jako okrasné (*Vallisneria spiralis*, *Plumeria obtusa*), některé jsou toxické (*Nerium oleander*) a jiné mohou být lékařsky využitelné (*Catharanthus roseus*). Hlavními obsahovými látkami rostlin této čeledi jsou monoterpeny, indolové alkaloidy a kardioaktivní glykosidy. Díky těmto účinným obsahovým látkám našly uplatnění v medicíně. V praxi se využívají k léčbě gastrointestinálních, metabolických, kožních a ektoparazitických onemocnění. [56]

### 3.2.3 Rod *Vinca*

V současnosti je rozlišováno několik konkrétních druhů rodu *Vinca*. Nejnovějšími nalezenými druhy jsou *Vinca soneri* Koyuncu a *Vinca ispartensis* Koyuncu & Eksi. Dále se do tohoto rodu řadí *Vinca difformis* Pourr., *Vinca erecta* Regel & Schmalh., *Vinca herbacea* Waldst. & Kit., *Vinca major* L. Většina rostlin z tohoto rodu byla nalezena v Evropě, výjimkou je *Vinca erecta* Regel & Schmalh. pocházející ze severozápadní Asie. Jeho nalezištěm jsou horská luka v Uzbekistánu. [50, 58, 59, 61, 62].

Uvedený zástupce *Vinca major* L. je svým vzhledem nejvíce podobný *Vinca minor* L. *Vinca major* L. známý jako brčál velký nebo brčál větší se odlišuje vyšším vzrůstem, také chlupatými a brvitými okraji listů. [63, 64]

### 3.2.4 Botanický popis *Vinca minor* L.

*Vinca minor* L., také známý jako barvínek menší, představuje na území ČR jediný původní druh z čeledi Apocynaceae (toješťovité). Areál rozšíření zahrnuje hlavně jižní a střední Evropu. Je často pěstován jako okrasná rostlina, je známý také jako jedovatá rostlina, nicméně má své využití i v medicíně nebo v lidovém léčitelství, kde je používán pro účinky snižující vylučování mateřského mléka, ke snížení krevního tlaku a podpoře mozkového metabolismu. [48, 49]

Jedná se o stálezelený, plazivý polokeř, který dorůstá výšky 5 až 20 cm. Roste ve světlých lesích, křovinách, na zarostlých skalách a na vinicích. Často se pěstuje v zahrádkách nebo na hřbitovech. Rostlina se rozmnožuje vegetativně pomocí oddenků. [48]

Lodyhy jsou poléhavé, snadno koření. Listy podlouhlé, kopinaté až eliptické s krátkými řapíky vyrůstají vstřícně, jsou neopadavé, na líci lesklé, na rubu světlejší s výraznou střední žilkou. Květy rostou terminálně na větvičkách jednotlivě. Pětčetná koruna je velká 2 až 3 cm v průměru, modré až fialově modré barvy. Květ obsahuje 2 svrchní semeníky a 5 volných tyčinek. Plod je souplodí dvou měchýřků. Kvete v březnu až červnu a zároveň má rostlina v tuto dobu nejvyšší obsah alkaloidů. [48, 50-53]



Obrázek č.5: *Vinca minor* L. – porost a květ [54]



Obrázek č.6: *Vinca minor* L. – list [54]

### 3.2.5 Obsahové látky

Hlavními obsahovými látkami *Vinca minor* L. jsou především indolové alkaloidy např. vinkamin a vinblastin, celkový obsah se pohybuje v rozmezí 0,1–3 %. Může obsahovat i další typy látek jako jsou např. saponiny, kyselina ursolová, flavonoidy, třísloviny a hořčiny. [55, 66]

#### 3.2.5.1 Indolové alkaloidy

Rostliny z čeledi Apocynaceae jsou významným zdrojem indolových alkaloidů. Mnohé z nich jsou známé pro svůj farmakologický účinek. Řadíme sem látky s rozličnou chemickou strukturou. Aminokyselina tryptofan slouží jako prekurzor pro široké spektrum indolových alkaloidů. Na jejich biogenezi se kromě aminokyseliny účastní také terpenové jednotky. Podle toho je dále můžeme rozlišovat na jednoduché, složené a dimerní indolové alkaloidy. [67, 68]

#### 3.2.5.2 Vinca alkaloidy

Vinca alkaloidy jsou získané alkaloidy z rostlin z rodu *Vinca*. Tyto alkaloidy byly poprvé získány izolací z rostliny *Catharanthus roseus* (L.) G. Don (dříve používané synonymum *Vinca rosea* L.) v 50. letech

kanadskými vědci Robertem Noblem a Charlesem Beerem. Mnoho Vinca alkaloidů je toxických, zároveň jsou však dlouhodobě zkoumány pro své léčivé účinky, které je činí užitečnými. [7]

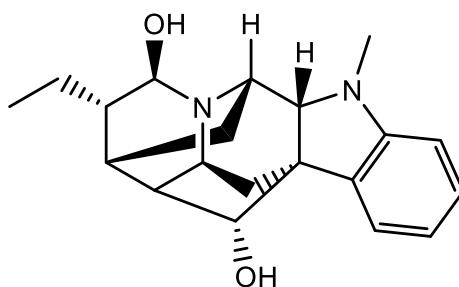
Vinca alkaloidy jsou jedny z nejdéle používaných rostlinných alkaloidů k léčbě rakoviny. Váží se na  $\beta$ -tubulin a následně narušují růst a sestavování mikrotubulů, což může způsobit mitotický blok a apoptózu. [7, 69]

V klinické praxi jsou používány zejména vinblastin, vinkristin a jejich polosyntetické deriváty vindesin a vinorelbin. Tyto látky jsou v USA schváleny pro možnou léčbu karcinomu varlat, prsu, leukémie a plic. V Evropě je schválen pro léčbu nádorů urotelu polosyntetický derivát vinflunin, který byl poprvé syntetizován v roce 2008. Dříve se některé Vinca alkaloidy používaly k léčbě vysokého krevního tlaku a diabetu. [7, 69, 95]

Vinca alkaloidy jsou alkaloidy terpenoidního charakteru. Na základě jejich struktury je můžeme rozdělit na ajmalinový, akuamminový, eburnaminový, oxindolový a sarpaginový typ. [67, 6]

#### 1. AJMALINOVÝ TYP

Alkaloidy ajmalinového typu se vyskytují v čeledi Apocynaceae a vychází ze struktury alkaloidu ajmalinu, který je používán v léčbě arytmií. Poprvé byly alkaloidy tohoto typu izolované z rodu *Rauwolfia* a zároveň se v tomto rodu vyskytují nejčastěji. Vyskytují se i v dalších rodech jako například *Alstonia*, *Aspidospenna*, *Cabucala*, *Melodinus* a *Vinca*. [70-72]



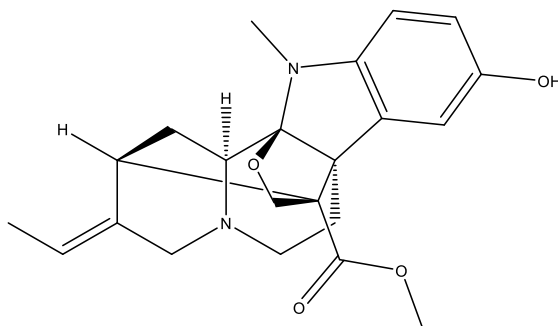
Obrázek č.7: Vzorec ajmalinu

Tabulka č.2: Alkaloidy ajmalinového typu

| Název alkaloidu | Významný výskyt v rostlině                |
|-----------------|---|
| quebrachidin    | <i>Vinca herbacea</i>                     |
| vinkarin        | <i>Vinca herbaceae</i> , <i>V. erecta</i> |
| vinkamajin      | <i>Vinca difformis</i> , <i>V. major</i>  |

## 2. AKUAMMINOVÝ TYP

Z názvu vyplývá, že se jedná o typ odvozený od alkaloidu akuamminu, syn. vinkamajordin, který byl prvně nalezen v semenech stromu *Picralima nitida* rovněž z čeledi Apocynaceae. Později byl objeven a izolován z *Vinca major*. [73, 74]



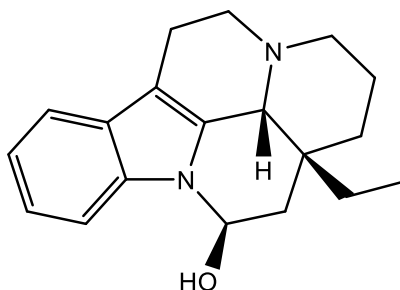
Obrázek č.8: Vzorec akuamminu

Tabulka č.3: Alkaloidy akuamminového typu

| Název alkaloidu | Významný výskyt v rostlině |
|-----------------|----------------------------|
| akuammicin      | <i>Vinca major</i>         |
| akuammilin      | <i>Alstonia scholaris</i>  |
| pikralin        | <i>Alstonia scholaris</i>  |

## 3. EBURNAMINOVÝ TYP

Eburnamin je svou strukturou podobný monoterpenoidním indolovým alkaloidům, obsahuje pentacyklický skelet. V rámci čeledi Apocynaceae byl izolován z rostlin rodu *Hunteria*, *Vinca* a *Kopsia*. Významné alkaloidy eburnaminového typu jsou uvedeny v níže uvedené tabulce. [75-78]



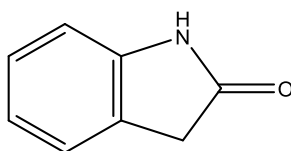
Obrázek č.9: Vzorec eburnaminu

**Tabulka č.4:** Alkaloidy eburnaminového typu

| Název alkaloidu | Významný výskyt v rostlině                   |
|-----------------|--|
| vinkamin        | <i>Vinca minor, V. major, V. difformis</i>   |
| eburnamonin     | <i>Kopsia pauciflora, Hunteria umbellata</i> |

#### 4. OXINDOLOVÝ TYP

Alkaloidy s oxindolovou strukturou v molekule. Oxindol se skládá z šestičlenného benzenového kruhu s pětičlenným pyrrolidinovým kruhem a karbonylu. Poprvé byl tento alkaloid izolován z kořenů rostliny *Gelsemium sempervirens* z čeledi Gelsemiaceae. Alkaloidy tohoto typu byly následně nalezeny a izolovány i z rodů *Rauwolfia* a *Vinca*. [79-82]



**Obrázek č.10:** Vzorec oxindolu

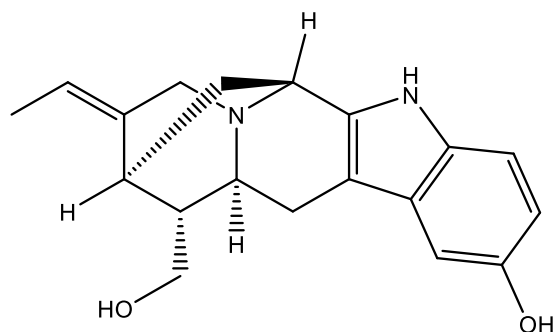
**Tabulka č.5:** Alkaloidy oxindolového typu

| Název alkaloidu | Významný výskyt v rostlině |
|-----------------|----------------------------|
| vineridin       | <i>Vinca erecta</i>        |
| vinerin         |                            |
| majdin          | <i>Vinca major</i>         |
| herbalin        | <i>Vinca herbacea</i>      |

#### 5. SARPAGINOVÝ TYP

Alkaloidy, které řadíme mezi sarpaginové, mají ve své struktuře polycyklický kruhový systém (viz. obrázek č.11). Mnoho sloučenin tohoto typu alkaloidů bylo izolováno především z rodů *Alstonia*, *Rauwolfia* a *Vinca*. Vzhledem ke strukturální podobnosti s ajmalinovými alkaloidy lze alkaloidy sarpaginového typu použít jako prekurzory pro jiné struktury indolových alkaloidů, které byly odvozené od ajmalinu. [72, 83, 84]





Obrázek č.11: Vzorec sarpaginu

Tabulka č.6: Alkaloidy sarpaginového typu

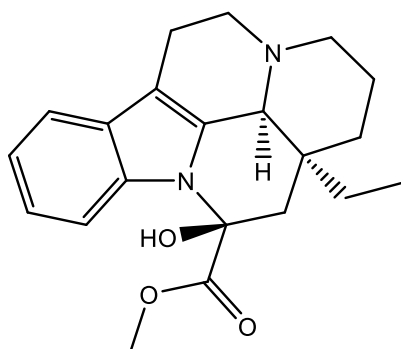
| Název alkaloidu | Významný výskyt v rostlině        |
|-----------------|-----------------------------------|
| reserpin        | <i>Rauwolfia serpentina</i>       |
| reserpinin      |                                   |
| striktamin      | <i>Vinca minor</i>                |
| norvinkorin     |                                   |
| lochvinerin     | <i>Vinca major</i>                |
| rhazin          | <i>Vinca difformis, V. erecta</i> |

Z rostliny *Vinca minor* L. bylo doposud izolováno více než 50 indolových alkaloidů. Nejvýznamnější z nich jsou vinblastin, vinkristin, vinkamin a významné jsou i jejich polosyntetické deriváty vinorelbin, vindesin, vinflunin a vinpocetin. [67, 85, 86]

### Vinkamin

Vinkamin je monoterpenoidní indolový alkaloid izolovaný z listů *Vinca minor* L. Může tvořit 25–65 % indolových alkaloidů. Podle jeho struktury ho řadíme mezi alkaloidy eburnaminového typu. Můžeme ho najít i v jiných rostlinách čeledi Apocynaceae, kde se hojně vyskytuje. [87, 89]

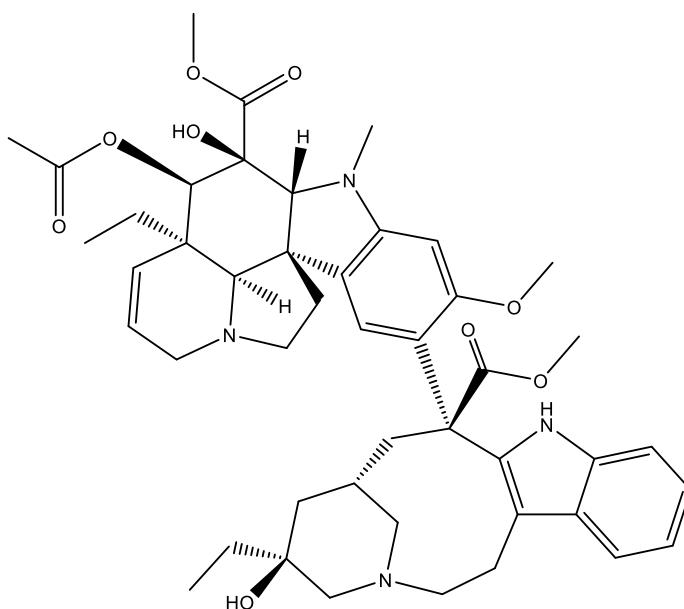
Je prospěšný svými vlastnostmi jako je vasodilatace, díky tomu zvyšuje průtok krve mozkem. Využívá se k prevenci cerebrovaskulárních onemocnění, chronické ischemické cévní mozkové příhody a snížení vaskulární demence nebo poruchy paměti. Než jen použití jako léčivo, je vinkamin také prekurzorovou sloučeninou pro další syntetické deriváty Vinca alkaloidů pro léčebné účely, jako je 11-bromovinkamin, ethylvinkamin a vinpocetin. [88, 89]



**Obrázek č.12:** Vzorec vinkaminu

### Vinblastin

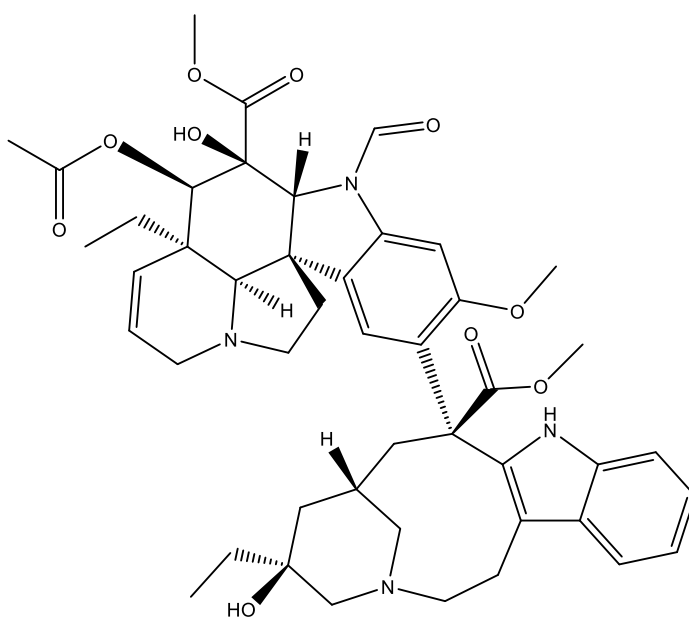
Vinblastin je přírodní alkaloid z rodu *Vinca*, který byl původně izolovaný z rostliny *Catharanthus roseus*. Vykazuje významnou cytotoxickou aktivitu, a proto se používá v protinádorové terapii jako antineoplastikum. Jeho mechanismem účinku je přilnutí k tubulinu, následná inhibice tvorby mikrotubulů, což způsobuje narušení mitotického vřeténka a zastavení mitózy ve fázi metafáze. Používá se také k léčbě Hodgkinových a non-Hodgkinských lymfomů, rakoviny prsu, renálního karcinomu a rakoviny varlat. Může způsobovat typické vedlejší účinky, jako je myelosuprese, mukositida, horečka, anémie a alopecie. [89, 91]



**Obrázek č.13:** Vzorec vinblastinu

## Vinkristin

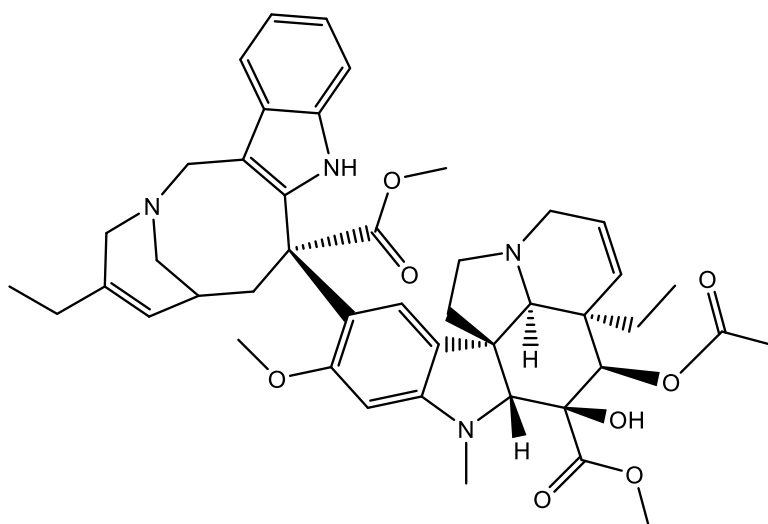
Hlavním zdrojem vinkristinu je *Catharanthus roseus*. Mechanismus účinku je téměř stejný jako u alkaloidu vinblastinu, s tím rozdílem, že dochází k zastavení nádorových buněk jak v syntetické, tak v mitotické fázi buněčného cyklu. Běžně se používá jako chemoterapeutický lék podávaný intravenózně k léčbě leukémie, lymfomu, myelomu, rakoviny prsu. Řadí se mezi nejpoužívanější Vinca alkaloid u dětských pacientů s rakovinou. Neurotoxicita je závažným a častým vedlejším účinkem. Vyvolaná bolestivá periferní neuropatie má nežádoucí účinky na kvalitu života pacienta a také může způsobit zpoždění nebo přerušení léčby. Existuje málo účinných léků, které mohou periferní neurotoxicitě zabránit nebo ji zmírnit. [89, 92, 93]



Obrázek č.14: Vzorec vinkristinu

## Vinorelbin

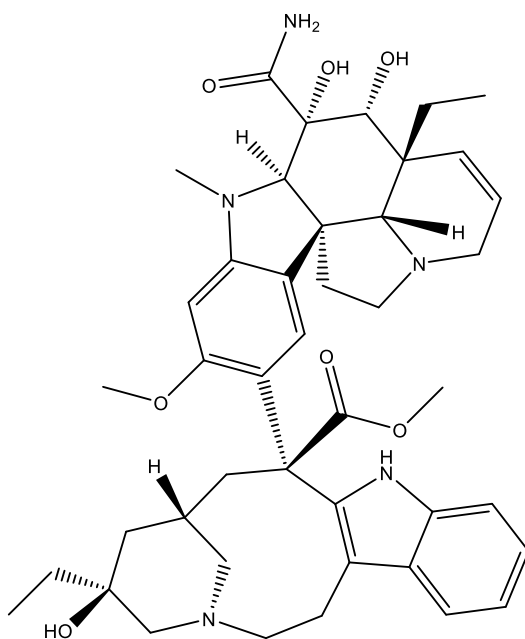
Vinorelbin je semisyntetický derivát alkaloidu Vinca, jeho účinkem je zásah do funkce mitotického vřeténka, který způsobí setrvání buňky ve fázi G2/M během mitózy. Prokázal se významným účinkem u gliových nádorů s nízkou proliferací. Jeho cytotoxicita byla prokázána proti širokému spektru lidských nádorových buněčných linií (tlustého střeva, plíce, myelom, prsa, leukémie, melanom a CNS). Používá se pro léčbu metastaticky se šířícího nemalobuněčného karcinomu plic, která byla schválena v USA. Podává se perorálně nebo intravenózně, samostatně nebo se může také kombinovat s dalšími léčivy (např. *cis*-platinou). Toxicitou vinorelbinu, která omezuje podávání nebo dávkování, je leukopenie. [89, 94]



**Obrázek č.15:** Vzorec vinorelbinu

### Vindesin

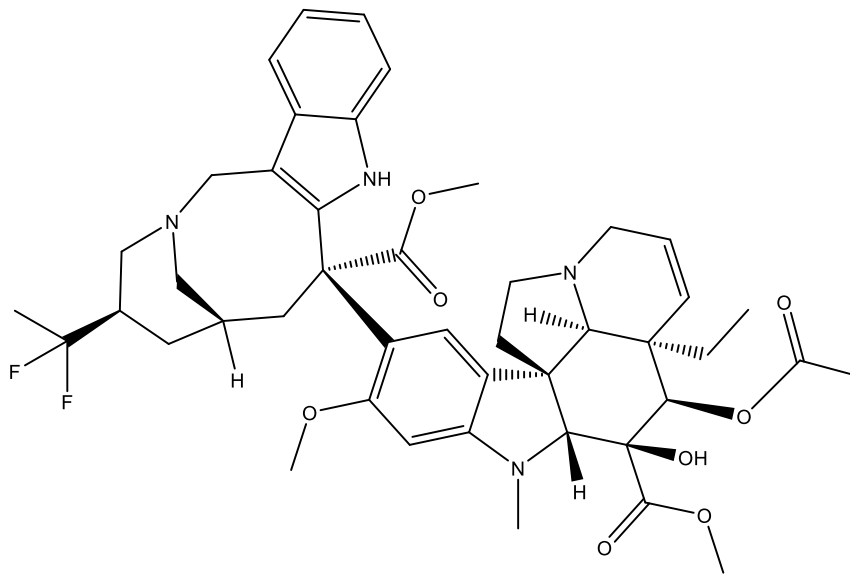
Je semisyntetický derivát, který je syntetizován z vinblastinu. Při podání vindesinu dochází k zamezení vstupu buněk do metafáze mitózy. Na základě tohoto mechanismu se ukázal jako slibný léčivo u pacientů s nemalobuněčným karcinomem plic a chronické lymfocytární leukémie, u kterých došlo k relapsu po podání vinkristinu. Klinickou toxicitou vindesinu jsou nejčastěji neurologické potíže. [89, 97]



**Obrázek č.16:** Vzorec vindesinu

## Vinflunin

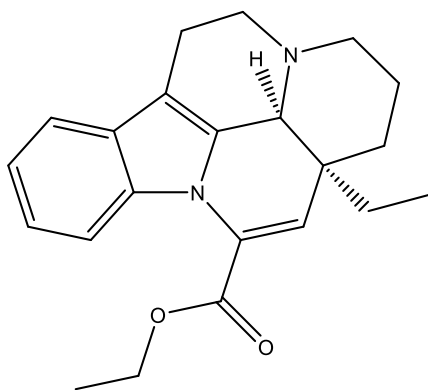
Vinflunin je bifluorovaný semisyntetický derivát vinorelbinu. Jeho hlavní antineoplastické účinky také vyplývají z jeho interakce s tubulinem a následného zastavení buněčného dělení. V roce 2009 byl schválen Evropskou lékovou agenturou u pacientů s metastatickým uroteliálním karcinomem pro léčbu druhé volby, u nichž selhala léčba *cis*-platinou. Podává se intravenózně. Vyskytující se toxicita omezující dávku je myelosuprese (hlavně neutropenie), dále se mohou vyskytovat gastrointestinální symptomy (např. zácpa, nevolnost, zvracení, stomatitida a bolest břicha), reakce v místě vpichu a úbytek hmotnosti. [98-103]



Obrázek č.17: Vzorec vinfluninu

## Vinpocetin

Vinpocetin je syntetický derivát vinkaminu, byl objeven na konci 60. let 20. století. Je charakterizován různými mechanismy působení, inhibuje fosfodiesterasu typu 1, která vede k vazodilataci, dále inhibuje uvolňování prozánětlivých cytokinů, má potenciální neuroprotektivní účinky prostřednictvím inhibice napěťově řízeného sodíkového kanálu, snižuje přísun vápníku do neuronů a také má antioxidační účinek se zvýšením metabolismu dopaminu. Bylo prokázáno, že zlepšuje mozkovou mikrocirkulaci, protože zvyšuje průtok krve mozkem tím, že inhibuje agregaci krevních destiček. Doporučen k léčbě cerebrovaskulárních poruch, kognitivního poklesu a demence. Byl také doporučován pro akutní cévní mozkovou příhodu a pro tuto indikaci se stále používá v několika zemích. Během používání se vyskytly vedlejší účinky, jako je bolest hlavy, úzkost, sucho v ústech, návaly horka, a nevolnost. [104-108]



**Obrázek č.18:** Vzorec vinpocetinu

## **4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST**

### **4.1. Příprava před izolací**

#### **4.1.1 Příprava rozpouštědel**

Používaná rozpouštědla byla před použitím přečištěna destilací. Následně byla uchovávána v nádobách z hnědého skla a tím byla chráněna před světlem.

#### **4.1.2 Příprava litych desek na preparativní TLC**

Čisté desky pro preparativní TLC, o rozměrech 15 × 15 cm s litou vrstvou byly odmaštěny ethanolem, abychom mohli nanést na desku suspenzi tvořenou 6,5 g silikagelu a 19,4 ml vody. Vzniklá suspenze byla rovnoměrně rozprostřena po celé desce a nechala se schnout přibližně 24 hodin při pokojové teplotě.

#### **4.1.3 Odpařování extraktů a frakcí**

Na vakuové rotační odparce při sníženém tlaku a o teplotě 40 °C probíhalo odpařování roztoků frakcí a přečištěných alkaloidů, pokud nedošlo k dostatečnému odpaření, tak byly dosušeny v exsikatoru nad vrstvou silikagelu. Následně byly uskladněny při snížené teplotě 2–8 °C.

## **4.2 Použitá metodika**

### **4.2.1 Tenkovrstvá chromatografie (TLC)**

Pomocí směsi rozpouštědel  $\text{CHCl}_3 + \text{EtOH}$  (1 : 1) nebo za použití MeOH byla rozpuštěna směs alkaloidů a nanesena na chromatografické desky po vyznačené linii startu. Pro vyvíjení byly použity vyvíjejí komory, které byly nasyceny zvolenou mobilní fází. Po nasycení vyvíjejí komor do nich byly vloženy připravované lité skleněné desky nebo komerční hliníkové desky se silikagelem jako adsorbentem, na kterých byly naneseny směsi alkaloidů. Po odpaření rozpouštědel mohly být chromatogramy v případě potřeby opakovaně vyvíjeny. Po dělení proběhla detekce alkaloidů, bylo používáno UV záření a Dragendorffovo činidlo, v případě preparativní TLC bylo použito pouze na část desky, při analytické TLC byla postříkována celá deska. Preparativní jehlou byly označeny zóny vyvinutých TLC desek a jednotlivě vyškrábány. Zóny na různých deskách se stejným retenčním faktorem byly spojeny.

## 4.2.2 Detekce alkaloidů

Pod UV lampou o vlnové délce  $\lambda = 254 \text{ nm}$  nebo  $\lambda = 366 \text{ nm}$  byla provedena detekce alkaloidů, které byly viditelné jako černé skvrny zakrývající fluorescenční látku na deskách nebo jako barevné skvrny. Zda je v konkrétní zóně přítomna látka alkaloidního typu, bylo zjištěno pomocí Dragendorffova činidla. Jde o barevnou reakci s terciárním či kvarterním dusíkem typickou pro většinu alkaloidů.

Detekce alkaloidů byla provedena vždy po odvětrání rozpouštědel použitých jako vyvíjecí směs při TLC.

## 4.2.3 Eluce alkaloidů

Adsorbent získaný separací zón alkaloidů z vyvinutých chromatografických desek byl smíchán v poměru silikagel + křemelina C 535 Celite (1 : 1). Tato směs byla promývána rozpouštědlem  $\text{CHCl}_3 + \text{EtOH}$  (1 : 1).

## 4.3 Používaný materiál při izolaci látek

### 4.3.1 Chemikálie a rozpouštědla

Chemikálie a rozpouštědla, která byla používaná během práce, seřazena abecedně:

- Aceton p. a. ( $\text{CH}_3\text{COCH}_3$ ) Penta, Praha
- Amoniak 25% p. a., vodný roztok ( $\text{NH}_3$ ), Penta, Praha
- Cyklohexan č. (cHx), Lachner, Neratovice
- Diethylamin p. a. (DEA), Penta, Praha
- Ethanol 95% (EtOH), Lihovar Chrudim, Chrudim
- Ethylacetát p. a. (EtOAc), Penta, Praha
- Chloroform p. a. ( $\text{CHCl}_3$ ), Penta, Praha
- Methanol p. a. (MeOH), Penta, Praha
- Toluén č. (To), Penta, Praha
- Voda čištěná ( $\text{H}_2\text{O}$ ), Merck Millipore, Darmstadt



### 4.3.2 Pomocný materiál

- Křemelina C 535 Celite John's Manville (Sigma-Aldrich, Praha)
- Silikagel Kieselgel 60 GF<sub>254</sub> (Merck, Německo)
- Čištěná vata
- Komerční hliníkové TLC desky Silica gel 60 F<sub>254</sub> 20 × 20 cm (Merck, Praha)

### 4.3.3 Činidlo pro detekci alkaloidů

Detekce alkaloidů na chromatografických deskách byla provedena pomocí Dragendorffova činidla. Dragendorffovo činidlo je konkrétně vodný roztok jodidu draselno-bismutitého, který je připraven promísením roztoku 1,7 g Bi(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> a 20,0 g kyseliny vinné v 80,0 ml vody s roztokem 16,0 g KI ve 40 ml H<sub>2</sub>O v poměru 1 : 1. Zásobní roztok byl skladován při snížené teplotě (2–8 °C). Smícháním roztoku 10,0 g kyseliny vinné v 50,0 ml vody s 5,0 ml zásobního roztoku bylo připraveno činidlo pro detekci alkaloidů na chromatografických deskách, v přítomnosti alkaloidů vznikaly po postřiku činidlem oranžové skvrny.

### 4.3.4 Vyvíjející soustavy pro TLC

S1: EtOAc + MeOH + NH<sub>3</sub> (100 : 8 : 3)

S2: To + CHCl<sub>3</sub> + DEA (80 : 15 : 5)

S3: cHx + CHCl<sub>3</sub> + MeOH (5 : 90 : 5)

S4: cHx + EtOAc + DEA (50 : 45 : 5)

S5: To + Aceton + H<sub>2</sub>O + NH<sub>3</sub> (17 : 75 : 8 : 1)

S6: To + Aceton + H<sub>2</sub>O + NH<sub>3</sub> (15 : 75 : 10 : 0,1)

S7: EtOAc + MeOH (95 : 5)

### 4.3.5 Přístroje

CAMAG® UV Cabinet 4 s UV lampou CAMAG® 4 s duální vlnovou délkou 254/366 nm (Muttenez, Švýcarsko)

Ultrazvuková lázeň Sonorex Super 10P (Bandelin, Německo)

Spektrometr EI/MS na GC-MS Agilent 7890A GC 5975 inertní MSD; EI mód 70 eV; kolona DP-5 MS (30 × 25 mm × 0,25 μm) (Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA)

Spektrometr Varian VNMR S500 (Varian, Palo Alto, California, USA)

Polarimetr P3000 (A. Krüs Optronic, Hamburg, Německo)

Vakuová rotační odparka (Laborota 4000, Heidolph, Německo)

## 4.4 Izolace alkaloidů

### 4.4.1 Extrakce rostlinné drogy a sloupcová chromatografie

Nať *Vinca minor* L. o hmotnosti 60 kg byla nejprve 2× extrahována 95% ethanolem 15 minut za varu, jednotlivé extrakty byly spojeny, zfiltrvány, odpařeny a poté extrahovány rozpouštědly vytřepáváním při různém pH. Organická vrstva byla oddělena, vysušena Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, odpařena a zvážena. Z provedené sloupcové chromatografie alkaloidního extraktu *Vinca minor* L. byla získána frakce pojmenována VM 259 o hmotnosti 1,0428 g, která byla v této práci následně zpracovávána.

Příprava extraktu z drogy ani následná sloupcová chromatografie nebyly součástí této diplomové práce. Tyto práce byly provedeny prof. RNDr. Lubomírem Opletalem, CSc. a Ing. Miroslavem Ločárkem na Katedře farmaceutické botaniky.

**Tabulka č.7:** Frakce VM 259

| Název frakce | Hmotnost odparku (g) | Vzhled                  |
|--------------|----------------------|-------------------------|
| VM 259       | 1,0428               | červeno-hnědý; viskózní |

### 4.4.2 Rozdělení na frakce

Za pomoci preparativní TLC byla zpracovávána frakce VM 259. Na předem připravených 27 skleněných litých desek 15 × 15 cm byla nanesena tato frakce. Byla nanesena za pomoci chromatografického pera. V parami mobilní fáze nasycených chromatografických komorách byla 1× vyvinuta. Soustava S1: EtOAc + MeOH + NH<sub>3</sub> (100 : 8 : 3) tvořila optimální mobilní fázi pro vyvíjení. Bylo separováno 6 zón, které byly za pomoci UV lampy označeny, vyškrábány a rozpouštědlem CHCl<sub>3</sub> + EtOH (1 : 1) byly promývány. Vzniklo 6 jednotlivých frakcí (viz. Tab.č.8). Dragendorffovým činidlem byla ověřena správnost provedené eluce. Po promytí bylo rozpouštědlo odpařeno a byla zjištěna hmotnost odparků.

Pro získané frakce byly hledány optimální vyvíjecí směsi pro další separaci. Dále byla pomocí preparativní chromatografie zpracovávána frakce E a frakce F, přičemž u frakce F vzhledem k časové náročnosti izolace alkaloidů nebyly izolační práce dokončeny a frakce pro další zpracování zůstává otevřená.

**Tabulka č.8:** Zpracovávaná frakce VM 259

| Název frakce | Hmotnost odparku (mg) |
|--------------|-----------------------|
| A            | 199,2                 |
| B            | 51,3                  |
| C            | 29,7                  |
| D            | 128,1                 |
| <b>E</b>     | <b>319,2</b>          |
| <b>F</b>     | <b>225,9</b>          |

### 4.4.3 Izolace jednotlivých alkaloidů

#### 4.4.3.1 Zpracování frakce VM 259–E

Za pomoci preparativní tenkovrstvé chromatografie byla dále rozdělena frakce VM 259–E o hmotnosti 319,2 mg. Na 10 komerčních hliníkových TLC desek 20 × 10 cm byla nanášena tato frakce, desky byly vyvíjeny v chromatografických komorách nasycených parami mobilní fáze, složení mobilních fází pro vyvíjení bylo několikrát optimalizováno. Jako optimální mobilní fáze byla zvolena soustava S2: To + CHCl<sub>3</sub> + DEA (80 : 15 : 5). V této soustavě proběhlo vyvíjení 2×. Po detekci pod UV lampou byly označeny získané 4 zóny, vyškrábány a dostatečným množstvím směsi EtOAc + MeOH (1 : 1) promyty. Byly tak získány 4 podfrakce E<sub>1-4</sub>. Po odpaření rozpouštědel byla zjištěna hmotnost odparků.

**Tabulka č.9:** Rozdělení frakce VM 259-E

| Název podfrakce | Hmotnost odparku (mg) |
|-----------------|-----------------------|
| E <sub>1</sub>  | 40,1                  |
| E <sub>2</sub>  | 178,1                 |
| E <sub>3</sub>  | 68,0                  |
| E <sub>4</sub>  | 18,2                  |

Byly vybrány podfrakce E<sub>2</sub> a E<sub>3</sub> pro následující práci, u nich byla provedena různá TLC, dokud nebyla nalezena vhodná mobilní fáze pro vyvíjení.

#### **4.4.3.1.1 Podfrakce E<sub>2</sub>**

Dále byla pomocí preparativní tenkovrstvé chromatografie přečištěna podfrakce E<sub>2</sub> o hmotnosti 178,1 mg. Na 4 komerční hliníkové TLC desky 20 × 10 cm byla nanášena tato frakce, TLC desky byly vyvíjeny v chromatografických komorách nasycených parami mobilní fáze soustavy S5: To + Aceton + H<sub>2</sub>O + NH<sub>3</sub> (17 : 75 : 8 : 1) a S1: EtOAc + MeOH + NH<sub>3</sub> (100 : 8 : 3). Podfrakce byla vyvíjena pomocí S5 do poloviny komerční hliníkové TLC desky. Po odpaření par mobilní fáze S5, byla použita S1 pro nasycení komory, kde byla následně vyvíjena tato podfrakce na celé komerční hliníkové TLC desce. Podfrakce byla pomocí preparativní TLC rozdělena na 5 zón. Jednotlivé zóny byly vyškrábány a dostatečným množstvím směsi EtOAc + MeOH (1 : 1) promyty. Získáno bylo 5 podfrakcí E<sub>2A</sub>, E<sub>2B</sub>, E<sub>2C</sub>, E<sub>2horní1</sub> a E<sub>2horní2</sub>. Po následném odpaření rozpouštědla byly odparky podrobeny další analýze.

Na základě analýzy byla látka E<sub>2A</sub> považována za čistou a dále byla látka porovnána v různých vyvíjecích směsích se standardem odpovídající predikci podle knihovny spekter NIST. Byla získána čistá látka o hmotnosti 33,3 mg.

Na jedné lité desce 15 × 15 cm byla dále přečištěna podfrakce E<sub>2B</sub>, TLC deska byla vyvíjena v chromatografické komoře nasycené parami mobilní fáze. Pro vyvíjení desky byly postupně použity soustavy S6: To + Aceton + H<sub>2</sub>O + NH<sub>3</sub> (15 : 75 : 10 : 0,1) a po odvětrání S7: EtOAc + MeOH (95 : 5). Podfrakce E<sub>2B</sub> byla vyvíjena pomocí S6 do poloviny lité desky. Po odpaření par mobilní fáze S6, byla použita S7 po nasycení komory, kde byla následně vyvíjena tato podfrakce. Směs byla rozdělena na dvě zóny E<sub>2B1</sub> a E<sub>2B2</sub>. Jednotlivé zóny byly vyškrábány a dostatečným množstvím směsi EtOAc + MeOH (1 : 1) promyty. Byly tak získány dvě podfrakce E<sub>2B1</sub> a E<sub>2B2</sub>. Poté byla rozpouštědla odpařena a odparky byly podrobeny další analýze.

Významné výsledky vykazovala podle GC/MS analýzy, podfrakce E<sub>2B1</sub>. Byla získána čistá látka o hmotnosti 4,2 mg.

Na základě výsledků analýzy podfrakcí E<sub>2A</sub> a E<sub>2B1</sub>, bylo zjištěno, že se jedná o totožné látky.

#### **Podfrakce E<sub>3</sub>**

Za pomoci preparativní tenkovrstvé chromatografie byla dále přečištěna podfrakce E<sub>3</sub> o hmotnosti 68 mg. Tato frakce byla nanášena na 3 komerční hliníkové TLC desky 20 × 10 cm, které byly vyvíjeny v chromatografických komorách nasycených parami mobilní fáze. Mobilní fázi tvořila soustava S4: cHx + EtOAc + DEA (50 : 45 : 5). Podfrakce byla rozdělena pomocí preparativní TLC na 4 zóny.

Jednotlivé zóny byly vyškrábány a množstvím směsi EtOAc + MeOH (1 : 1) promyty. Byly tak získány 4 podfrakce E<sub>3A–D</sub>. Poté byla rozpouštědla odpařena a odparky byly podrobeny další analýze.

Byla získána látka E<sub>3C</sub> o hmotnosti 17 mg. Látka byla považována za čistou na základě analýzy a byla odeslána na NMR analýzu.

#### 4.4.3.2 Zpracování frakce VM 259–F

Pomocí preparativní tenkovrstvé chromatografie byla dále rozdělena frakce VM 259–F o hmotnosti 225,9 mg. Na 15 komerčních hliníkových TLC desek 20 × 10 cm byla frakce nanášena a po odvětrání rozpouštědel byly TLC desky vyvíjeny v chromatografických komorách nasycených parami mobilní fáze. Při získávání ideální mobilní fáze se postupovalo stejným způsobem jako při zpracování frakce VM 259-E viz. kap. 4.4.3.1. Mobilní fázi tvořila soustava S6: To + Aceton + H<sub>2</sub>O + NH<sub>3</sub> (15 : 75 : 10 : 0,1). Bylo vyvíjeno dvakrát. Frakce byla separována na 7 zón. Následně byly jednotlivé zóny vyškrábány a dostatečným množstvím směsi EtOAc + MeOH (1 : 1) promyty. Bylo tak získáno 7 podfrakcí F<sub>1–7</sub>. Poté byla rozpouštědla odpařena a zjištěna hmotnost jednotlivých odparků.

**Tabulka č.10:** Rozdělení frakce VM 259-F

| Název podfrakce | Hmotnost odparku (mg) |
|-----------------|-----------------------|
| F <sub>1</sub>  | 18,4                  |
| F <sub>2</sub>  | 17,2                  |
| F <sub>3</sub>  | 17,3                  |
| F <sub>4</sub>  | 8,1                   |
| F <sub>5</sub>  | 8,5                   |
| F <sub>6</sub>  | 9,7                   |
| F <sub>7</sub>  | 9,3                   |

Významné výsledky vykazovaly podfrakce F<sub>3</sub> a F<sub>4</sub>, na základě TLC analýzy, bylo zjištěno, že by mohlo jít o čisté látky, protože však nedošlo ke zplynění či ionizaci těchto látek, nebyly dále zpracovány a zůstávají otevřené pro další zpracování. Zbývající podfrakce byly převedeny do penicilinek a skladovány za snížené teploty.

## 4.5 Analýza struktury

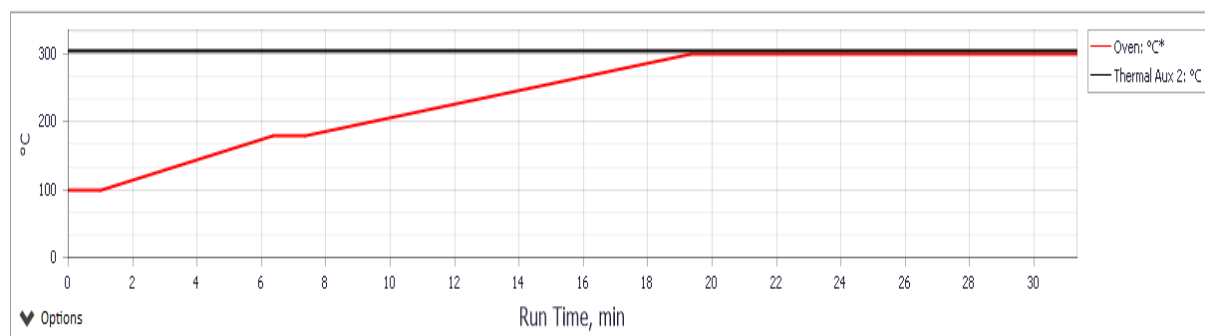
### 4.5.1 GC/MS analýza

Využitím spektrometru Agilent 7890A GC 5975 v módu 70 eV na GC koloně DP-5 proběhla analýza struktury izolovaných alkaloidů, které byly následně porovnány se spektry dostupnými v NIST knihovně (National Institute of Standards and Technology Library), s daty nalezenými v odborné literatuře a s referenčními spektry alkaloidů, které byly získané pracovní skupinou ADINACO.

**Tabulka č.11:** Parametry GC/MS analýzy

|                                |   |
|--------------------------------|---|
| Kolona                         | Agilent Technologies HP-5MS, 30 m × 0,250 mm × 0,250 μm   |
| Nosné médium                   | Helium  |
| Nástřík                        | Dělicí poměr 10:1, při 270 °C   |
| Teplotní program spektrometru  | 15 °C/min z teploty 100 °C na 180 °C, 1 min udržování na teplotě 180 °C<br>10 °C/min z teploty 100 °C na 300 °C, 12 min udržování na teplotě 300 °C |
| Rychlost průtoku nosného plynu | 1 ml/min  |
| Celkový čas analýzy            | 31,3 min  |
| Zkoušený vzorek                | methanolvý roztok alkaloidu v koncentraci 1 mg/ml   |

**Obrázek č.19:** Teplotní režim GC/MS analýzy



## 4.5.2 NMR analýza

NMR analýza byla provedena v roztocích  $\text{CDCl}_3$  (denaturovaný chloroform) nebo v  $\text{CD}_3\text{OD}$  (denaturovaný methanol) na spektrometru VNMR S500 při teplotě 25 °C. Měření probíhalo při frekvenci 499,87 MHz pro jádra  $^1\text{H}$  a při frekvenci 125,70 MHz pro jádra  $^{13}\text{C}$ . Byla použita sonda OneNMR k ozařování a detekci signálu a širokopásmová dvoukanálová gradientní sonda s regulací teploty. Byly změřeny chemické posuny  $\delta$  udávány v jednotkách ppm (*parts per million*) a nepřímo vztaženy ke standardu TMS (tetramethylsilanu). Hodnoty chemického posunu pro  $\text{CDCl}_3$  jsou u atomů  $^1\text{H}$   $\delta = 7,26$  ppm a u atomů  $^{13}\text{C}$   $\delta = 77,0$  ppm, pro  $\text{CD}_3\text{OD}$  jsou u atomů  $^1\text{H}$   $\delta = 3,30$  ppm a u atomů  $^{13}\text{C}$   $\delta = 49,0$  ppm. Měřeními získaná data jsou prezentována v následujícím pořadí: chemický posun ( $\delta$ ), integrovaná intenzita  $^1\text{H}$  NMR spekter, multiplicita (s: singlet, d: dublet, t: triplet, q: kvartet, dd: dublet dubletů, m: multiplet, bs: široký singlet) a interakční konstanta (Hz).

Celou NMR analýzu provedl doc. PharmDr. Jiří Kuneš, CSc. a PharmDr. Jana Křoustková PhD. na Katedře organické a bioorganické chemie.

## 4.5.3 Optická otáčivost

Za pomoci polarimetru P 3000 bylo provedeno měření optické otáčivosti. Před měřením musely být jednotlivé alkaloidy rozpuštěny ve vhodném rozpouštědle v našem případě byl použit. Z výsledků měření byla vypočítána specifická otáčivost.

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

|  |
|--|
| <p>l – délka kyvety [dm]<br/>t – teplota měření [°C]<br/>D – D-linie ze sodíkové výbojky o <math>\lambda = 589,3</math> nm<br/>c – koncentrace měřeného alkaloidu [g/100 ml]<br/><math>\alpha</math> – hodnota naměřené optické otáčivosti [°]</p> |
|--|

## 4.6 Stanovení biologické aktivity

Na měření hodnot inhibiční aktivity izolovaných alkaloidů vůči rekombinantní lidské AChE a BuChE byla použita Ellmanova spektrofotometrická metoda. Aby došlo ke stanovení biologické aktivity enzymů, byla použita 96-jamková mikrotitrační destička z polystyrenu (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA). Bylo připravené médium, které bylo složeno z 10  $\mu\text{l}$  roztoku cholinesterasy o potřebné aktivitě, 20  $\mu\text{l}$  5,5'-dithiobis-2- kyselinou nitrobenzoovou (DTNB) a 40  $\mu\text{l}$  fosfátového pufru. 10  $\mu\text{l}$  roztoky testovaných alkaloidů byly inkubovány 5 min v testovacím médiu při teplotě 37 °C a následně bylo přidáno 20  $\mu\text{l}$  roztoku 10 mM acetylthiocholin jodidu nebo butyrylthiocholin jodidu jako enzymového substrátu, které zahájilo reakci. Měření probíhalo 1 min při vlnové délce světla  $\lambda = 412$  nm na přístroji

Multimode microplate reader Synergy 2 (BioTek Inc., Winooski, VT, USA). Vše bylo dostatečně smíseno v mikrotřepáče. Po protřepání byla směs vložena do přístroje Multimode microplate reader Synergy 2 (BioTek Inc., Winooski, VT, USA), kde probíhalo měření po dobu 1 min při vlnové délce  $\lambda = 412$  nm. V programu GraphPad Prism v. 6.07 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) se provedl výpočet hodnot  $IC_{50}$ . Poté byla výsledná inhibiční aktivita testovaných látek porovnána s referenčními standardy známých inhibitorů (eserin, galanthamin – Tab.č.12).



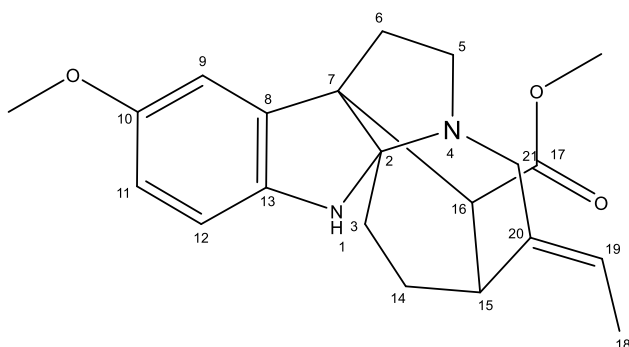
## 5. VÝSLEDKY

### 5.1 Strukturní analýza získaných látek

#### 5.1.1 VM 259 – E<sub>3c</sub>

Izolovaná látka (E<sub>3c</sub>) zjištěna pomocí výsledků ze strukturní analýzy (GC/MS a NMR), byla identifikována jako norvinkorin.

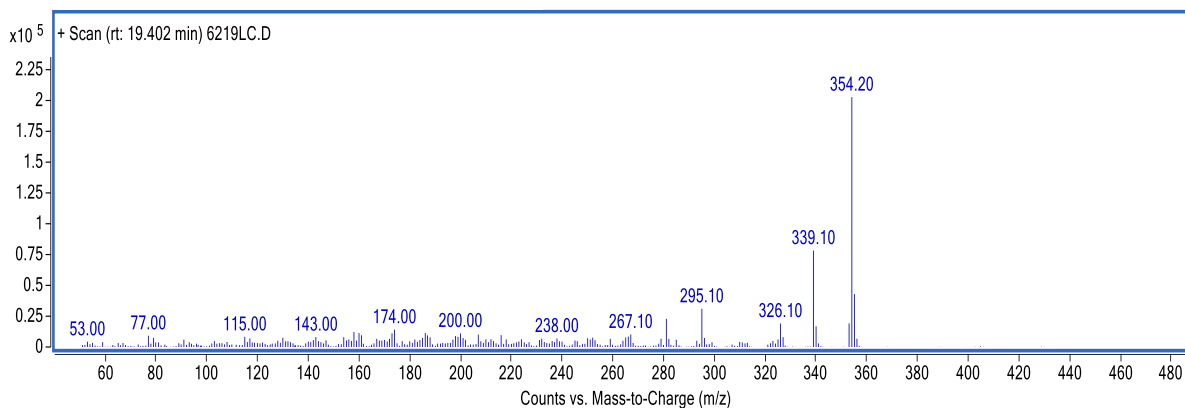
Sumární vzorec této látky: C<sub>21</sub>H<sub>26</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>



Obrázek č.20: Vzorec norvinkorinu

#### 5.1.1.1 GC/MS analýza

Obrázek č.21: GC/MS analýza VM 259 – E<sub>3c</sub>



MS: m/z (%) = 354 (100), 339 (38,6), 295 (15,3), 326 (9,4), 174 (6,9), 200 (5,4), 267 (5,0), 115 (4,1), 143 (3,99), 238 (3,4)

### 5.1.1.2 NMR analýza

Výsledky z NMR analýzy byly porovnány s literaturou, NMR spektra se shodují s referenčními daty. [113]

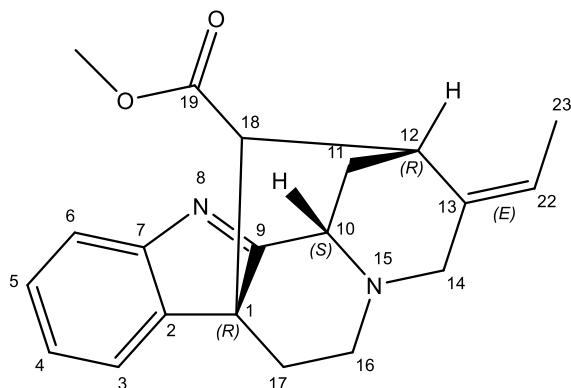
### 5.1.1.3 Optická otáčivost

$[\alpha]_D^{21} = -158,1^\circ$   $[c = 0,172 \text{ (g/100 ml); EtOH, délka kyvety 0,5 dm}]$

### 5.1.2 VM 259 – E<sub>2A</sub> + E<sub>2B1</sub>

Izolovaná látka (E<sub>2A</sub> + E<sub>2B1</sub>) zjištěna pomocí výsledků ze strukturní analýzy GC/MS a na základě TLC se standardem potvrzeným NMR v různých vyvíjecích směsích, byla identifikována jako striktamin.

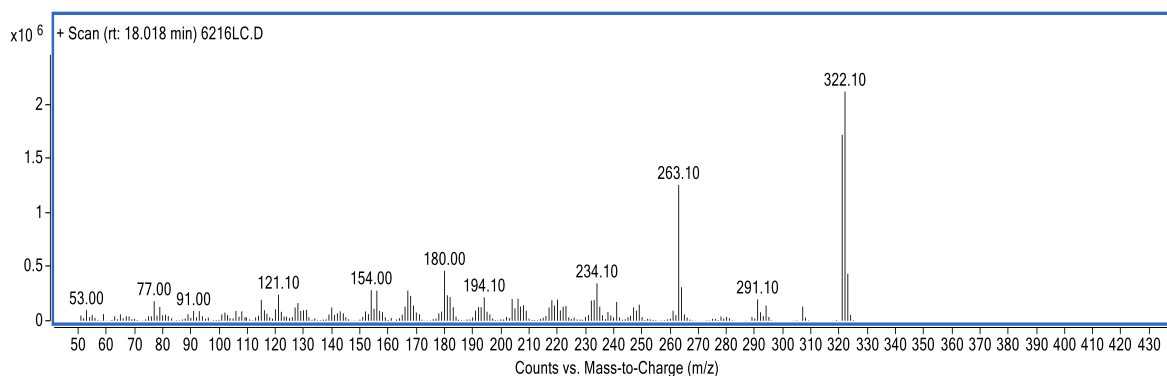
Sumární vzorec striktaminu: C<sub>20</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>



Obrázek č.22: Vzorec striktaminu

### 5.1.2.1 GC/MS analýza

Obrázek č.23: GC/MS analýza VM 259 – E<sub>2A</sub> + E<sub>2B1</sub>



MS: m/z (%) = 322 (100), 263 (59,3), 180 (21,9), 234 (16,4), 154 (13,4), 121 (11,4), 194 (10,2), 291 (9,3), 77 (8,6), 53 (4,6)

### 5.1.2.2 NMR analýza

Frakci VM 259 E<sub>2A</sub> + E<sub>2B1</sub> jsme ztotožnili se stejnou látkou z jiné frakce téhož alkaloidního extraktu, izolovaného PharmDr. Rudolfem Vrabcem, Ph.D., jímž naměřená spektra <sup>1</sup>H i <sup>13</sup>C odpovídají již dříve publikovaným. [112, 114].

### 5.1.2.3 Optická otáčivost

$[\alpha]_D^{21} = +101,0^\circ$  [c = 0,103 (g/100 ml); EtOH, délka kyvety 0,5 dm]

## 5.2 Stanovení inhibiční aktivity (IC<sub>50</sub>) alkaloidů

U izolovaných látek, striktamin a norvinkorin, byla stanovena inhibiční aktivita vůči lidské AChE a BuChE.

Výsledky inhibičních aktivit obou izolovaných alkaloidů jsou uvedeny v následující tabulce (Tabulka č. 12).

**Tabulka č.12:** Inhibiční aktivity izolovaných alkaloidů vůči cholinesterasám

| Název alkaloidu | IC <sub>50</sub> : AChE [μM] | IC <sub>50</sub> : BuChE [μM] |
|-----------------|------------------------------|-------------------------------|
| norvinkorin     | >100                         | 15,52 ± 0,92                  |
| striktamin*     | >100                         | >100                          |
| galanthamin     | 1,720 ± 0,120                | 42,00 ± 1,00                  |
| eserin          | 0,063 ± 0,005                | 0,13 ± 0,01                   |

\*stanovená hodnota inhibiční aktivity pro již izolovaný striktamin PharmDr. Rudolfem Vrabcem, Ph.D. [111]

## 6. DISKUSE

Náplní mé diplomové práce byla izolace alkaloidů z alkaloidní frakce VM 259, která v rámci experimentální práce byla získána již dříve na Katedře farmaceutické botaniky extrakcí natě *Vinca minor* L. a následnou sloupcovou chromatografií. Z dané frakce – VM 259 byly získány dvě čisté látky za použití preparativní tenkovrstvé chromatografie, získané látky byly identifikovány pomocí GC/MS, NMR analýzy a optické otáčivosti. Na základě těchto analýz byla zjištěna struktura jednotlivých alkaloidů a po porovnání těchto struktur s odbornou literaturou byly tyto alkaloidy identifikovány jako norvinkorin ( $E_{3C}$ ) a striktamin ( $E_{2A} + E_{2B1}$ ). U získaných alkaloidů byla dále stanovena inhibiční aktivita vůči AChE, BuChE. Výsledky inhibičních aktivit obou izolovaných alkaloidů byly porovnány se standardy galathaminem – AChE ( $IC_{50} = 1,720 \pm 0,120 \mu M$ ), BuChE ( $IC_{50} = 42,00 \pm 1,00 \mu M$ ) a eserinem – AChE ( $IC_{50} = 0,063 \pm 0,005 \mu M$ ), BuChE ( $IC_{50} = 0,13 \pm 0,01 \mu M$ ).

Striktamin byl získán již dříve, původně z *Rhazya stricta*, později bylo zjištěno, že jeho hmotnostní spektrum je totožné s alkaloidem vinkamidinu izolovaným z *Vinca minor* L. S rostlinou *Vinca minor* L. pracuje tým lidí z Katedry farmakognozie a farmaceutické botaniky. Na základě identifikace pomocí GC/MS, shodného NMR spektra a optické otáčivosti, jsme striktamin ztotožnili se stejnou látkou z jiné frakce téhož alkaloidního extraktu, který byl izolován PharmDr. Rudolfem Vrabcem, Ph.D., tudíž nebylo nutné měřit znovu biologickou aktivitu striktaminu. Inhibiční aktivita vůči AChE ( $IC_{50} = >100 \mu M$ ) a BuChE ( $IC_{50} = >100 \mu M$ ) u striktaminu byla nevýznamná a možnost využití striktaminu v terapii AD je minimální. Optická otáčivost, která byla naměřena PharmDr. Rudolfem Vrabcem, Ph.D.  $[\alpha]_D^{28} = +103,8^\circ$  ( $c = 0,19 \text{ g}/100 \text{ ml}$ ,  $CHCl_3$ ) byla shodná s optickou otáčivostí ve srovnání s literaturou, která uvádí optickou otáčivost v intervalu od  $[\alpha]_D^{20} = +63,8^\circ$  ( $c = 0,10 \text{ g}/100 \text{ ml}$ ,  $CHCl_3$ ) do  $[\alpha]_D^{24} = +103^\circ$  ( $c = 0,72 \text{ g}/100 \text{ ml}$ ,  $CHCl_3$ ), což s malou odchylkou odpovídá i optické aktivitě získané látky  $E_{2A} + E_{2B1}$  ( $[\alpha]_D^{20} = +101,0^\circ$ ), nicméně bylo použito jiné rozpouštědlo pro měření (EtOH), tudíž by bylo vhodné optickou otáčivost změřit za použití chloroformu. [109, 111, 112, 115, 117]

Norvinkorin byl dříve získán z listů z rostliny *Vinca minor* L., jedná se o monoterpenový indolový alkaloid. Dle naměřených hodnot inhibiční aktivity norvinkorin nevykazoval vůči AChE ( $IC_{50} = >100 \mu M$ ) inhibiční aktivitu, ale vykazoval mírnou vůči BuChE ( $IC_{50} = 15,52 \pm 0,92 \mu M$ ). Zatím není dostupná žádná literatura, která by popisovala inhibiční aktivitu vůči AChE a BuChE u norvinkorinu. Optická otáčivost ve srovnání s literaturou  $[\alpha]_D^{25} = -124,7^\circ$  ( $c = 1,05 \text{ g}/100 \text{ ml}$ ,  $CHCl_3$ ) se neshodovala (oproti získané hodnotě  $-158,1^\circ$ ), možná z důvodu použití jiného rozpouštědla a bylo by tedy vhodné změřit optickou otáčivost za použití chloroformu. NMR spektra se shodovaly s literaturou. [110, 113]

Vedle frakce E, měla významné výsledky i frakce F, ze které byly izolované podfrakce F<sub>3</sub> a F<sub>4</sub>. U podfrakcí F<sub>3</sub> a F<sub>4</sub> na základě provedené TLC analýzy bylo zjištěno, že by mohlo jít o čisté látky. Látky nebyly analyzované pomocí GC/MS, protože je buď nebylo možné zplynit, nebo neionizovaly. Je nutné tyto látky analyzovat pomocí hmotnostní spektrometrie s elektrosprejovou ionizací (ESI/MS), nicméně nebylo časově možné je dále analyzovat.

U izolovaných alkaloidů se bude dále potvrzovat již zjištěná cytotoxická aktivita, s možností využití alkaloidu v terapii nádorových onemocnění. [114, 116]

## 7. ZÁVĚR

V rámci diplomové práce byly izolovány 4 látky, přičemž identifikovat se podařilo 2 z nich. Tyto dva alkaloidy již byly izolovány dříve rovněž z *V. minor*. Byly identifikovány pomocí GC/MS, NMR analýzy a změřené optické otáčivosti. Údaje, které byly získány, byly porovnány s literaturou a izolované alkaloidy byly určeny jako striktamin a norvinkorin.

Po izolaci alkaloidů a jejich identifikaci byla změřena inhibiční aktivita vůči lidské acetyl- a butyrylcholinesterasy. Výsledná inhibiční aktivita alkaloidů byla porovnána se standardy eserinem a galanthaminem. Inhibiční aktivita vůči AChE a BuChE u striktaminu byla nevýznamná. Striktamin je tudíž pro terapii AD nevyužitelný. Norvinkorin nevykazoval inhibiční aktivitu vůči AChE, ale vykazoval vůči BuChE mírnou inhibiční aktivitu, ale v porovnání se standardy měl výrazně nižší aktivitu, a proto je inhibiční aktivita vůči BuChE nevýznamná. Tyto dvě izolované látky patrně nejsou zodpovědné za aktivitu vůči cholinesterasám zjištěnou pro frakci VM 259 či alkaloidního extraktu drogy.

## 8. POUŽITÁ LITERATURA

1. Breijyeh, Z., Karaman, R.: Comprehensive Review on Alzheimer's Disease: Causes and Treatment. *Molecules*, 25(24), 5789, (2020), [cit. 2022-12-11].
2. World Health Organization. [online]. Dostupné z: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dementia>, [cit. 2023-03-18].
3. Ferrari, C., Sorbi, S.: The complexity of Alzheimer's disease: an evolving puzzle. *Physiol Rev.*, 101(3):1047-1081, (2021), [cit. 2022-11-10].
4. Høgh, P.: [Alzheimer's disease]. *Ugeskrift for laeger*, 179(12), (2017), [cit. 2022-11-10].
5. Bhadane, B. S., Patil, M. P., Maheshwari, V. L., Patil, R. H.: Ethnopharmacology, phytochemistry, and biotechnological advances of family Apocynaceae: A review. *Phytotherapy research*, 32(7), 1181–1210, (2018), [cit. 2022-12-11].
6. Stander, E. A., Cuello, C., Birer-Williams, C., Kulagina, N., Jansen, H. J., Carqueijeiro, I., Méteignier, L. V., Vergès, V., Oudin, A., Papon, N., Dirks, R. P., Jensen, M. K., O'Connor, S. E., Dugé de Bernonville, T., Besseau, S., & Courdavault, V.: The *Vinca minor* genome highlights conserved evolutionary traits in monoterpene indole alkaloid synthesis. *G3 (Bethesda, Md.)*, 12(12), (2022), [cit. 2022-12-11].
7. Moudi, M., Go, R., Yien, C. Y., Nazre, M.: Vinca alkaloids. *International journal of preventive medicine*, 4(11), 1231–1235, (2013), [cit. 2022-12-11].
8. Lane, C. A., Hardy, J., Schott, J. M.: Alzheimer's disease. *European journal of neurology*, 25(1), 59–70, (2018), [cit. 2023-01-03].
9. Weller, J., Budson, A.: Current understanding of Alzheimer's disease diagnosis and treatment. *F1000Research*, 7, F1000 Faculty Rev-1161, (2018), [cit. 2023-01-03].
10. Asher, S., Priefer, R.: Alzheimer's disease failed clinical trials. *Life sciences*, 306, (2022), [cit. 2023-01-03].
11. Serý, O., Povová, J., Míšek, I., Pešák, L., Janout, V.: Molecular mechanisms of neuropathological changes in Alzheimer's disease: a review. *Folia neuropathologica*, 51(1), 1–9, (2013), [cit. 2023-01-03].
12. Porsteinsson, A. P., Isaacson, R. S., Knox, S., Sabbagh, M. N., Rubino, I.: Diagnosis of Early Alzheimer's Disease: Clinical Practice in 2021. *The journal of prevention of Alzheimer's disease*, 8(3), 371–386, (2021), [cit. 2023-01-03].
13. Gottesman, R. T., Stern, Y.: Behavioral and Psychiatric Symptoms of Dementia and Rate of Decline in Alzheimer's Disease. *Frontiers in pharmacology*, 10, 1062, (2019), [cit. 2023-01-03].
14. DeTure, M. A., Dickson, D. W.: The neuropathological diagnosis of Alzheimer's disease. *Molecular neurodegeneration*, 14(1), 32, (2019), [cit. 2023-01-03].

15. Kim, J., Jeong, M., Stiles, W. R., Choi, H. S.: Neuroimaging Modalities in Alzheimer's Disease: Diagnosis and Clinical Features. *International journal of molecular sciences*, 23(11), 6079, (2022), [cit. 2023-01-03].
16. Reitz, C.: Genetic diagnosis and prognosis of Alzheimer's disease: challenges and opportunities. *Expert review of molecular diagnostics*, 15(3), 339–348, (2015), [cit. 2023-02-04].
17. Stocker, H., Nabers, A., Perna, L., Möllers, T., Rujescu, D., Hartmann, A. M., Holleczer, B., Schöttker, B., Stockmann, J., Gerwert, K., Brenner, H.: Genetic predisposition, A $\beta$  misfolding in blood plasma, and Alzheimer's disease. *Translational psychiatry*, 11(1), 261, (2021), [cit. 2023-02-04].
18. Ferreira-Vieira, T. H., Guimaraes, I. M., Silva, F. R., Ribeiro, F. M. (2016). Alzheimer's disease: Targeting the Cholinergic System. *Current neuropharmacology*, 14(1), 101–115, (2016), [cit. 2023-02-04].
19. Hampel, H., Mesulam, M. M., Cuello, A. C., Farlow, M. R., Giacobini, E., Grossberg, G. T., Khachaturian, A. S., Vergallo, A., Cavado, E., Snyder, P. J., Khachaturian, Z. S.: The cholinergic system in the pathophysiology and treatment of Alzheimer's disease. *Brain: a journal of neurology*, 141(7), 1917–1933, (2018), [cit. 2023-02-04].
20. Douchamps, V., Mathis, C.: A second wind for the cholinergic system in Alzheimer's therapy. *Behavioural pharmacology*, 28(2 and 3-Spec Issue), 112–123, (2017), [cit. 2023-02-04].
21. Stanciu, G. D., Luca, A., Rusu, R. N., Bild, V., Beschea Chiriac, S. I., Solcan, C., Bild, W., Ababei, D. C.: Alzheimer's Disease Pharmacotherapy in Relation to Cholinergic System Involvement. *Biomolecules*, 10(1), 40, (2019), [cit. 2023-02-04].
22. Rakonczay, Z., Horváth, Z., Juhász, A., Kálmán, J.: Peripheral cholinergic disturbances in Alzheimer's disease. *Chemico-biological interactions*, 157-158, 233–238, (2005), [cit. 2023-02-04].
23. Lane, R. M., Potkin, S. G., Enz, A.: Targeting acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in dementia. *The international journal of neuropsychopharmacology*, 9(1), 101–124, (2006), [cit. 2023-02-05].
24. Grøntvedt, G. R., Schröder, T. N., Sando, S. B., White, L., Bråthen, G., Doeller, C. F.: Alzheimer's disease. *Current biology: CB*, 28(11), R645–R649, (2018), [cit. 2023-02-05].
25. Gouras, G. K., Olsson, T. T., Hansson, O.:  $\beta$ -Amyloid peptides and amyloid plaques in Alzheimer's disease. *Neurotherapeutics: the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, 12(1), 3–11, (2015), [cit. 2023-02-05].
26. Rabbito, A., Dulewicz, M., Kulczyńska-Przybik, A., Mroczko, B.: Biochemical Markers in Alzheimer's Disease. *International journal of molecular sciences*, 21(6), 1989, (2020), [cit. 2023-02-05].



27. Wegmann, S., Biernat, J., Mandelkow, E.: A current view on Tau protein phosphorylation in Alzheimer's disease. *Current opinion in neurobiology*, 69, 131–138, (2021), [cit. 2023-02-26].
28. Hamano, T., Enomoto, S., Shirafuji, N., Ikawa, M., Yamamura, O., Yen, S. H., Nakamoto, Y.: Autophagy and Tau Protein. *International journal of molecular sciences*, 22(14), 7475, (2021), [cit. 2023-02-26].
29. Sinsky, J., Pichlerova, K., Hanes, J.: Tau Protein Interaction Partners and Their Roles in Alzheimer's Disease and Other Tauopathies. *International journal of molecular sciences*, 22(17), 9207, (2021), [cit. 2023-02-26].
30. Zucchella, C., Sinforiani, E., Tamburin, S., Federico, A., Mantovani, E., Bernini, S., Casale, R., Bartolo, M.: The Multidisciplinary Approach to Alzheimer's Disease and Dementia. A Narrative Review of Non-Pharmacological Treatment. *Frontiers in neurology*, 9, 1058, (2018), [cit. 2023-02-28].
31. Bucki, A., Marcinkowska, M., Śniecikowska, J., Zagórska, A., Jamrozik, M., Pawłowski, M., Głuch-Lutwin, M., Siwek, A., Jakubczyk, M., Pytka, K., Jastrzębska-Więsek, M., Partyka, A., Wesołowska, A., Mierzejewski, P., Kończkowski, M.: Multifunctional 6-fluoro-3-[3-(pyrrolidin-1-yl)propyl]-1,2-benzoxazoles targeting behavioral and psychological symptoms of dementia (BPSD). *European journal of medicinal chemistry*, 191, 112149, (2020), [cit. 2023-02-28].
32. Cummings, J. L., Tong, G., Ballard, C.: Treatment Combinations for Alzheimer's Disease: Current and Future Pharmacotherapy Options. *Journal of Alzheimer's disease: JAD*, 67(3), 779–794, (2019), [cit. 2023-02-28].
33. Parums, D. V.: Editorial: Targets for Disease-Modifying Therapies in Alzheimer's Disease, Including Amyloid  $\beta$  and Tau Protein. *Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research*, 27, e934077, (2021), [cit. 2023-02-28].
34. Miculas, D. C., Negru, P. A., Bungau, S. G., Behl, T., Hassan, S. S. U., Tit, D. M.: Pharmacotherapy Evolution in Alzheimer's Disease: Current Framework and Relevant Directions. *Cells*, 12(1), 131, (2022), [cit. 2023-03-01].
35. Pardo-Moreno, T., González-Acedo, A., Rivas-Domínguez, A., García-Morales, V., García-Cozar, F. J., Ramos-Rodríguez, J. J., Melguizo-Rodríguez, L.: Therapeutic Approach to Alzheimer's Disease: Current Treatments and New Perspectives. *Pharmaceutics*, 14(6), 1117, (2022), [cit. 2023-03-01].
36. Zhang, F., Zhong, R. J., Cheng, C., Li, S., Le, W. D.: New therapeutics beyond amyloid- $\beta$  and tau for the treatment of Alzheimer's disease. *Acta pharmacologica Sinica*, 42(9), 1382–1389, (2021), [cit. 2023-03-01].
37. Szeto, J. Y., Lewis, S. J.: Current Treatment Options for Alzheimer's Disease and Parkinson's Disease Dementia. *Current neuropharmacology*, 14(4), 326–338, (2016), [cit. 2023-03-01].
38. Kilgore, M. B., Augustin, M. M., Starks, C. M., O'Neil-Johnson, M., May, G. D., Crow, J. A., Kutchan, T. M.: Cloning and characterization of a norbelladine 4'-O-methyltransferase involved

- in the biosynthesis of the Alzheimer's drug galanthamine in *Narcissus sp. aff. pseudonarcissus*. PLoS one, 9(7), (2014), [cit. 2023-03-01].
39. Kalola, U. K., Nguyen, H.: Galantamine. In StatPearls. StatPearls Publishing, 1-22, (2023), [cit. 2023-03-01].
  40. Atri, A.: The Alzheimer's Disease Clinical Spectrum: Diagnosis and Management. The Medical clinics of North America, 103(2), 263–293, (2019), [cit. 2023-04-03].
  41. Marotta, G., Basagni, F., Rosini, M., Minarini, A.: Memantine Derivatives as Multitarget Agents in Alzheimer's Disease. Molecules (Basel, Switzerland), 25(17), 4005, (2020), [cit. 2023-04-03].
  42. Kuns, B., Rosani, A., Varghese, D.: Memantine. In StatPearls. StatPearls Publishing, 1-9, (2022), [cit. 2023-03-01].
  43. Singh, S. K., Srivastav, S., Castellani, R. J., Plascencia-Villa, G., Perry, G.: Neuroprotective and Antioxidant Effect of *Ginkgo biloba* Extract Against AD and Other Neurological Disorders. Neurotherapeutics: the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics, 16(3), 666–674, (2019), [cit. 2023-04-04].
  44. Xie, L., Zhu, Q., Lu, J.: Can We Use *Ginkgo biloba* Extract to Treat Alzheimer's Disease? Lessons from Preclinical and Clinical Studies. Cells, 11(3), 479, (2022), [cit. 2023-04-04].
  45. Nowak, A., Kojder, K., Zielonka-Brzezicka, J., Wróbel, J., Bosiacki, M., Fabiańska, M., Wróbel, M., Sołek-Pastuszka, J., Klimowicz, A.: The Use of *Ginkgo Biloba* L. as a Neuroprotective Agent in the Alzheimer's Disease. Frontiers in pharmacology, 12, (2021), [cit. 2023-04-04].
  46. Vaz, M., Silva, V., Monteiro, C., Silvestre, S.: Role of Aducanumab in the Treatment of Alzheimer's Disease: Challenges and Opportunities. Clinical interventions in aging, 17, 797–810, (2022), [cit. 2023-04-04].
  47. van Dyck, C. H., Swanson, C. J., Aisen, P., Bateman, R. J., Chen, C., Gee, M., Kanekiyo, M., Li, D., Reyderman, L., Cohen, S., Froelich, L., Katayama, S., Sabbagh, M., Vellas, B., Watson, D., Dhadda, S., Irizarry, M., Kramer, L. D., Iwatsubo, T.: Lecanemab in Early Alzheimer's Disease. The New England journal of medicine, 388(1), 9–21, (2023), [cit. 2023-04-04].
  48. Jahodář, L.: Rostliny Způsobující Otravy [online]. ProQuest Ebook Central. Univerzita Karlova: Karolinum Press, (2018), [cit. 2023-04-04]. ISBN 978-80-246-4190-4. Dostupné z: <http://ebookcentral.proquest.com/lib/cuni/detail.action?docID=5649143>
  49. Stander, E. A., Cuello, C., Birer-Williams, C., Kulagina, N., Jansen, H. J., Carqueijeiro, I., Méteignier, L. V., Vergès, V., Oudin, A., Papon, N., Dirks, R. P., Jensen, M. K., O'Connor, S. E., Dugé de Bernonville, T., Besseau, S., Courdavault, V.: The *Vinca minor* genome highlights conserved evolutionary traits in monoterpene indole alkaloid synthesis. G3 (Bethesda, Md.), 12(12), (2022), [cit. 2023-04-05].
  50. Farahanikia, B., Akbarzadeh, T., Jahangirzadeh, A., Yassa, N., Shams Ardekani, M. R., Mirnezami, T., Hadjiakhoondi, A., Khanavi, M.: Phytochemical Investigation of *Vinca minor*

- Cultivated in Iran. Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR, 10(4), 777–785, (2011), [cit. 2023-04-05].
51. Khanavi, M., Pourmoslemi, S., Farahanikia, B., Hadjiakhoondi A., Nasser, S. O.: Cytotoxicity of *Vinca minor*, *Pharmaceutical Biology*, 48:1, 96-100, (2010), [cit. 2023-04-05].
  52. Ciorîță, A., Zăgrean-Tuza, C., Moț, A. C., Carpa, R., Pârvu, M.: The Phytochemical Analysis of *Vinca* L. Species Leaf Extracts Is Correlated with the Antioxidant, Antibacterial, and Antitumor Effects. *Molecules* (Basel, Switzerland), 26(10), 3040, (2021), [cit. 2023-04-05].
  53. Barvínek menší - *Vinca minor*. Květena České republiky - plané rostliny ČR [online]. Dostupné z: <http://www.kvetenacr.cz/detail.asp?IDdetail=140>, staženo 5.4. 2023.
  54. Kořínek, M.: *Vinca minor* L. - barvínek menší. [online]. Dostupné z: <https://www.biolib.cz/cz/taxonimages/id40533/?type=1&uid=1499>, staženo 4.4. 2023.
  55. Jahodář, L.: Farmakobotanika: semenné rostliny. Vyd 3. upravené a doplněné - Nakladatelství Karolinum, Praha 2011, [cit. 2023-04-05]. ISBN 978-80-246-2015-2.
  56. Wong, S.K., Lim, Y., Chan, E.: Botany, uses, phytochemistry and pharmacology of selected Apocynaceae species: A review. *Pharmacognosy Commun*, 3. 2-11, (2013), [cit. 2023-04-05].
  57. Wang, Y., Zhang, C. F., Ochieng Odago, W., Jiang, H., Yang, J. X., Hu, G. W., Wang, Q. F.: Evolution of 101 Apocynaceae plastomes and phylogenetic implications. *Molecular phylogenetics and evolution*, 180, 107688, (2023), [cit. 2023-04-05].
  58. Koyuncu, M.: A new species of *Vinca* (Apocynaceae) from eastern Anatolia, Turkey. *Turkish Journal of Botany*. 36, (2012), [cit. 2023-04-07].
  59. Koyuncu, M., Ekşi Bona, G., Gençler Ozkan, A.: *Vinca ispartensis* (Apocynaceae), a New Species from Turkey. *Annales Botanici Fennici*. 52. 340-344, (2015), [cit. 2023-04-07].
  60. *Vinca difformis* Pourr. Intermediate Periwinkle. NBN Atlas Partnership 2021 [online]. (2021) [cit. 2023-04-7]. Dostupné z: <https://species.nbnatlas.org/species/NHMSYS0000464871>
  61. *Vinca erecta*, Regel & Schamalh. Encyclopedia of Life [online]. Dostupné z: <https://eol.org/pages/47138994/articles>, staženo 5.4.2023
  62. Hosseini, M. J., Mahmoodi, N., Eskandari, J., Bijani, S., Yazdinezhad, A. R., Anoush, M.: Protective effects of *Vinca herbaceous* extract against scopolamine-induced behavioral disturbances and brain oxidative stress in rats. *Heliyon*, 8(4), e09295, (2022), [cit. 2023-04-07].
  63. *Vinca major* L. Greater Periwinkle. NBN Atlas Partnership 2021 [online]. (2021) [cit. 2023-04-07]. Dostupné z: <https://species.nbnatlas.org/species/NBNSYS0000003954>
  64. *Vinca major* L. efloras.org. Flora of China, Vol. 16 Page 157 [online]. Dostupné z: [http://www.efloras.org/florataxon.aspx?flora\\_id=2&taxon\\_id=200018490](http://www.efloras.org/florataxon.aspx?flora_id=2&taxon_id=200018490), staženo 5.4. 2023.

65. Şimşek, S. E. N., Uysal, T.: Volatile and Phenolic Compositions of the Leaves of Two *Vinca* L. Species from Turkey. *Current Perspectives on Medicinal and Aromatic Plants*, 1(2), 103-110, (2018), [cit. 2023-04-06].
66. Spilková, J., Martin, J., Siatka, T., Tůmová, L., Kašparová, M.: *Farmakognozie*. Karolinum, Praha 2016.
67. Cheng, G. G., Zhao, Y. L., Zhang, Y., Lunga P. K., Hu, D. B., Li, Y., Gu, J., Song, C. W., Sun, W. B., Liu, Y. P., Luo, X. D.: Indole alkaloids from cultivated *Vinca major*. *Tetrahedron*, 70(45), 8723-8729, (2014), [cit. 2023-04-06].
68. Alkaloid Derived from Tryptophan. *Epharmacognosy* [online]. (2012) Dostupné z: <http://www.epharmacognosy.com/2012/07/alkaloids-derived-from-tryptophan.html>, staženo 6.4. 2023.
69. van Vuuren, R. J., Visagie, M. H., Theron, A. E., Joubert, A. M.: Antimitotic drugs in the treatment of cancer. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 76(6), 1101–1112, (2015), [cit. 2023-04-06].
70. Lounasmaa, M., Hanhinen, P.: The ajmaline group of indole alkaloids. *The Alkaloids: Chemistry and Biology*, Academic Press, 55, 1-87, (2001), [cit. 2023-04-07].
71. Ilyas, M.: Ajmaline in the management of cardiac arrhythmias. *JPMA. The Journal of the Pakistan Medical Association*, 31(7), 153–155, (1981), [cit. 2023-04-07].
72. Chen, W., Ma, Y., He, W., Wu, Y., Huang, Y., Zhang, Y., Tian, H., Wei, K., Yang, X., Zhang, H.: Structure units oriented approach towards collective synthesis of sarpagine-ajmaline-koumine type alkaloids. *Nature communications*, 13(1), 908, (2022), [cit. 2023-04-07].
73. Creed, S. M., Gutridge, A. M., Argade, M. D., Hennessy, M. R., Friesen, J. B., Pauli, G. F., van Rijn, R. M., Riley, A. P.: Isolation and Pharmacological Characterization of Six Opioidergic *Picralima nitida* Alkaloids. *Journal of natural products*, 84(1), 71–80, (2021), [cit. 2023-04-07].
74. Singh, S., Kanwar S. S.: Antilipase activity guided fractionation of *Vinca major*. *Journal of King Saud University - Science*, 30 (4), 433-439, (2018), [cit. 2023-04-08].
75. Yu, Y., Bao, M. F., Huang, S. Z., Wu, J., Cai, X. H.: Vincan - and eburnan-type alkaloids from *Tabernaemontana bovina* and their hypoglycemic activity, *Phytochemistry*, 190, 112859, (2021), [cit. 2023-04-08].
76. Huang, Y., Xue, F., Liu, H., Xue, F., Liu, X. Y., Song, H., Qin, Y.: Asymmetric Total Synthesis of (+)21-epi-Eburnamonine Via a Photocatalytic Radical Cascade Reaction. *Natural products and bioprospecting*, 11(1), 99–103, (2021), [cit. 2023-04-08].
77. Xue, F., Liu, H., Wang, R., Zhang, D., Song H., Liu X. Y., Qin, Q.: Enantioselective total synthesis of (+)-vincamine. *Chinese Chemical Letters*, 33(4): 2044-2046, (2022), [cit. 2023-04-08].
78. Vas, A., Gulyás, B.: Eburnamine derivatives and the brain. *Medicinal research reviews*, 25(6), 737–757, (2005), [cit. 2023-04-09].

79. Khetmalis, Y. M., Shivani, M., Murugesan, S., Chandra Sekhar, K. V. G.: Oxindole and its derivatives: A review on recent progress in biological activities. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 141, 111842, (2021), [cit. 2023-04-09].
80. Jasjit S. B.: Chapter 2 Oxindole Alkaloids, Editor(s): R.H.F. Manske. *The Alkaloids: Chemistry and Physiology*, Academic Press, 14, 83-121, (1973), [cit. 2023-04-18].
81. Tulyaganov, T., Nigmatullaev, A.: Alkaloids of *Vinca minor*. *Chemistry of Natural Compounds - CHEM NAT COMPD.* 36. 540-540, (2000), [cit. 2023-04-09].
82. Ognyanov, I., Pyuskyulev, B., Shamma, M., Weiss, J. A., Shine, R. J.: The stereochemistry of herbaceine and herbaline. *Chemical Communications*, 12, (1967), [cit. 2023-04-09].
83. Namjoshi, O. A., Cook, J. M.: Sarpagine and Related Alkaloids. *The Alkaloids. Chemistry and biology*, 76, 63–169, (2016), [cit. 2023-04-09].
84. Proksa, B., Uhrín, D., Grossmann, E., Votický, Z.: (-)-1-Norvincorine, a New Alkaloid from *Vinca minor*. *Planta medica*, 53(1), 120, (1987), [cit. 2023-04-09].
85. Arora, R. D., Menezes, R. G.: *Vinca* Alkaloid Toxicity. In *StatPearls*. StatPearls Publishing, (2022), [cit. 2023-04-09].
86. Verma, P., Sharma, A., Khan, S. A., Shanker, K., Mathur, A. K.: Over-expression of *Catharanthus roseus* tryptophan decarboxylase and strictosidine synthase in rol gene integrated transgenic cell suspensions of *Vinca minor*. *Protoplasma*, 252(1), 373–381, (2015), [cit. 2023-04-09].
87. Han, J., Qu, Q., Qiao, J., Zhang, J.: Vincamine Alleviates Amyloid- $\beta$  25-35 Peptides-induced Cytotoxicity in PC12 Cells. *Pharmacognosy magazine*, 13(49), 123–128, (2017), [cit. 2023-03-23].
88. Na, R., Jiajia, L., Dongliang, Y., Yingzi, P., Juan, H., Xiong, L., Nana, Z., Jing, Z., Yitian, L.: Identification of vincamine indole alkaloids producing endophytic fungi isolated from *Nerium indicum*, Apocynaceae. *Microbiological research*, 192, 114–121, (2016), [cit. 2023-03-23].
89. Dhyani, P., Quispe, C., Sharma, E., Bahukhandi, A., Sati, P., Attri, D. C., Szopa, A., Sharifi-Rad, J., Docea, A. O., Mardare, I., Calina, D., Cho, W. C.: Anticancer potential of alkaloids: a key emphasis to colchicine, vinblastine, vincristine, vindesine, vinorelbine and vincamine. *Cancer cell international*, 22(1), 206, (2022), [cit. 2023-03-23].
90. Nemes, A., Szantay, C., Czibula, L., Greiner, I.: ChemInform Abstract: Synthesis of 18-Hydroxyvincamines and Epoxy1,14-secovincamines: A New Proof for the Aspidospermaneburnane Rearrangement. *Cheminform*, 39, (2018), [cit. 2023-03-23].
91. Keglevich, P., Hazai, L., Kalas, G., Szántay, C.: Modifications on the basic skeletons of vinblastine and vincristine. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 17(5), 5893–5914, (2012), [cit. 2023-03-23].
92. Jo, Y. R., Park, H. T., Yu, H. S., Kong, H. H.: *Trichinella* Infection Ameliorated Vincristine-Induced Neuroinflammation in Mice. *The Korean journal of parasitology*, 60(4), 247–254, (2022), [cit. 2023-03-23].

93. Triarico, S., Romano, A., Attinà, G., Capozza, M. A., Maurizi, P., Mastrangelo, S., Ruggiero, A.: Vincristine-Induced Peripheral Neuropathy (VIPN) in Pediatric Tumors: Mechanisms, Risk Factors, Strategies of Prevention and Treatment. *International journal of molecular sciences*, 22(8), 4112, (2021), [cit. 2023-03-24].
94. Gregory, R. K., Smith, I. E.: Vinorelbine--a clinical review. *British journal of cancer*, 82(12), 1907–1913, (2000), [cit. 2023-03-25].
95. Cragg, G. M., Newman, D. J.: Plants as a source of anti-cancer agents. *Journal of ethnopharmacology*, 100(1-2), 72–79, (2005), [cit. 2023-04-18].
96. Macmillan, C.: Lecanemab, the New Alzheimer's Treatment: 3 Things To Know. *YaleMedicine* [online], (2023) [cit. 2023-04-18]. Dostupné z: <https://www.yalemedicine.org/news/lecanemab-legembi-new-alzheimers-drug>
97. Creasey, W. A.: Biochemical effects of vindesine. *British journal of cancer*, 44(6), 921–924, (1981), [cit. 2023-03-25].
98. Retz, M., de Geeter, P., Goebell, P. J., Matz, U., de Schultz, W., Hegele, A.: Vinflunine in routine clinical practice for the treatment of advanced or metastatic urothelial cell carcinoma - data from a prospective, multicenter experience. *BMC cancer*, 15, 455, (2015), [cit. 2023-03-25].
99. Brousell, S. C., Fantony, J. J., Van Noord, M. G., Harrison, M. R., Inman, B. A.: Vinflunine for the treatment of advanced or metastatic transitional cell carcinoma of the urothelial tract: an evidence-based review of safety, efficacy, and place in therapy. *Core evidence*, 13, 1–12, (2018), [cit.2023-03-25].
100. Gerullis, H., Wawroschek, F., Köhne, C. H., Ecke, T. H.: Vinflunine in the treatment of advanced urothelial cancer: clinical evidence and experience. *Therapeutic advances in urology*, 9(1), 28–35, (2017), [cit. 2023-03-25].
101. Schmitt, A., Nguyen, L., Zorza, G., Ferré, P., Pétaïn, A.: Better characterization of vinflunine pharmacokinetics variability and exposure/toxicity relationship to improve its use: Analyses from 18 trials. *British journal of clinical pharmacology*, 84(5), 900–910, (2018), [cit. 2023-03-25].
102. Holmsten, K., Dohn, L., Jensen, N. V., Shah, C. H., Jäderling, F., Pappot, H., Ullén, A.: Vinflunine treatment in patients with metastatic urothelial cancer: A Nordic retrospective multicenter analysis. *Oncology letters*, 12(2), 1293–1300, (2016), [cit. 2023-03-25].
103. Bachner, M., De Santis, M.: Vinflunine in the treatment of bladder cancer. *Therapeutics and clinical risk management*, 4(6), 1243–1253, (2008), [cit. 2023-03-25].
104. Zhang, Y. S., Li, J. D., Yan, C.: An update on vinpocetine: New discoveries and clinical implications. *European journal of pharmacology*, 819, 30–34, (2018), [cit. 2023-03-26].
105. Abdelzaher, W. Y., Ahmed, S. M., Welson, N. N., Marraiki, N., Batiha, G. E., Kamel, M. Y.: Vinpocetine ameliorates L-arginine induced acute pancreatitis via Sirt1/Nrf2/TNF pathway and

- inhibition of oxidative stress, inflammation, and apoptosis. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 133, 110976, (2021), [cit. 2023-03-26].
106. Al-Kuraishy, H. M., Al-Gareeb, A. I., Fageyinbo, M. S., Batiha, G. E.: Vinpocetine is the forthcoming adjuvant agent in the management of COVID-19. *Future science OA*, 8(5), FSO797, (2022), [cit. 2023-03-26].
  107. Al-Kuraishy, H. M., Al-Gareeb, A. I., Naji, M. T., Al-Mamorry, F.: Role of vinpocetine in ischemic stroke and poststroke outcomes: A critical review. *Brain circulation*, 6(1), 1–10, (2020), [cit. 2023-03-26].
  108. Patyar, S., Prakash, A., Modi, M., Medhi, B.: Role of vinpocetine in cerebrovascular diseases. *Pharmacological reports: PR*, 63(3), 618–628, (2011), [cit. 2023-03-26].
  109. Schnoes, H. K., Biemann, K., Mokry, J., Kompis, I., Chatterjee, A., Ganguli, G.: Strictamine. *The Journal of Organic Chemistry*, 31(5), 1641-1642, (1966), [cit. 2023-04-14].
  110. Proksa, B., Uhrín, D., Grossmann, E., Votický, Z.: (-)-1-Norvincorine, a New Alkaloid from *Vinca minor*. *Planta medica*, 53(1), 120, (1987), [cit. 2023-04-14].
  111. Vrabec, R., Maříková, J., Ločárek, M., Korábečný, J., Hulcová, D., Hošťálková, A., Kuneš, J., Chlebek, J., Kučera, T., Hrabínová, M., Jun, D., Soukup, O., Andrisano, V., Jenčo, J., Šafratová, M., Nováková, L., Opletal, L., Cahlíková, L.: Monoterpene indole alkaloids from *Vinca minor* L. (Apocynaceae): Identification of new structural scaffold for treatment of Alzheimer's disease. *Phytochemistry*, 194, 113017, (2022), [cit. 2023-04-14].
  112. Chen, Z. T., Xiao, T., Tang, P., Zhang D., Qin, Y.: Total synthesis of akuammiline alkaloid (+)-strictamine. *Tetrahedron*, 74(11):1129–1134, (2018), [cit. 2023-04-20].
  113. Zi, W., Xie, W., Ma, D.: Total Synthesis of Akuammiline Alkaloid (-)-Vincorine via Intramolecular Oxidative Coupling. *Journal of the American Chemical Society*, 134, 9126-9, (2012), [cit. 2023-04-20].
  114. Vrabec, R.: Doktorská disertační práce: Alkaloidy *Vinca minor* L. a jejich biologická aktivita. Univerzita Karlova, Hradec Králové 2022, [cit. 2023-04-20].
  115. Picazo, E., Morrill, L. A., Susick, R. B., Moreno, J., Smith, M. J., Garg, N. K.: Enantioselective Total Syntheses of Methanoquinolizidine-Containing Akuammiline Alkaloids and Related Studies, *Journal of the American Chemical Society*, 140 (20), 6483-6492, (2018), [cit. 2023-04-27].
  116. Pelletier, S. W.: *Alkaloids: Chemical and Biological Perspectives*, Kidlington, Oxford, U. K.: Elsevier Science, 200-201, (1999), [cit. 2023-04-28]. ISBN 0-08-043403-7.
  117. Mokry, J.: *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*, 32(7), 2523-31, CAplus, (1967), [cit. 2023-05-11].

## 9. ABSTRAKT

Míšek, V.: Izolace alkaloidů *Vinca minor* a jejich biologická aktivita II.

Diplomová práce, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova, Katedra farmakognozie a farmaceutické botaniky, Hradec Králové, 2023

Školitel: PharmDr. Anna Hošťálková, Ph.D.

Klíčová slova: sekundární metabolity, Apocynaceae, *Vinca minor*, cholinesterasy, cytotoxicita, alkaloidy, izolace, biologická aktivita

Alzheimerova choroba (AD) je neurodegenerativní onemocnění, které je charakteristické pozvolným rozvíjením kognitivní dysfunkce, dopadem na běžné denní funkce a neuropsychiatrickými symptomy. Ve farmakoterapii AD je omezené množství použitelných látek, navíc AD nelze léčit kauzálně. Výzkum a objevování nových aktivních látek, včetně přírodních, by mohl být možností, jak potenciálně rozšířit spektrum látek využívaných v léčbě AD.

Původní extrakt byl připraven extrakcí natě *Vinca minor* L. ethanolem a následným vytřepáváním při různém pH. Za pomoci sloupcové a preparativní tenkovrstvé chromatografie byl tento extrakt dále zpracováván pro získání čistých alkaloidů. Spektrometrickými metodami (GC/MS a NMR) byla zjištěna struktura jednotlivých alkaloidů. Po porovnání získaných struktur s odbornou literaturou byly tyto alkaloidy identifikovány jako norvinkorin a striktamin. U těchto látek byla změřena optická otáčivost.

Pomocí modifikované Ellmanovy metody byly izolované alkaloidy testovány na inhibiční aktivitu vůči lidským cholinesterasám, což jsou enzymy, které jsou jedním z patofyziologických celků, které jsou ovlivňovány v rámci farmakoterapie AD. Norvinkorin vykazoval inhibiční aktivitu vůči BuChE ( $IC_{50} = 15,52 \pm 0,92 \mu M$ ), naopak inhibiční aktivita vůči AChE byla nevýznamná ( $IC_{50} > 100 \mu M$ ). Striktamin nebyl vůči AChE ani BuChE aktivní ( $IC_{50} > 100 \mu M$ ).



## 10. ABSTRACT

Míšek, V.: Alkaloid isolation from *Vinca minor* and their biological activity II.

Diploma thesis, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Charles University, Department of Pharmacognosy and Pharmaceutical Botany, Hradec Králové, 2023

Supervisor: PharmDr. Anna Hošťálková, Ph.D.

Key words: secondary metabolites, Apocynaceae, *Vinca minor*, cholinesterases, cytotoxicity, alkaloids, isolation, biological activity

Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disease characterized by the progressive development of cognitive dysfunction, impact on normal daily functions and neuropsychiatric symptoms. There is a limited number of compounds for pharmacotherapy AD, moreover, AD cannot be treated causally. Therefore, research focused on the discovery of new active substances, including natural origin ones, could be one of the possible options for widening the pool of substances used in AD treatment.

An extract was prepared by extracting the aerial parts of *Vinca minor* L. with ethanol and subsequent liquid-liquid extraction at different pH. Using column and preparative thin layer chromatography, this extract was further processed to isolate individual alkaloids. The structure of isolated alkaloids was determined by spectrometric methods (GC/MS and NMR). After comparing the obtained structures with the literature data, these alkaloids were identified as norvincorine and strictamine. The optical rotatability was measured for these substances.

Using a modified Ellman method, the isolated alkaloids were tested for inhibitory activity against human cholinesterases, enzymes, which are one of pharmacotherapy targets within the pathophysiology of AD. Norvincorine inhibiting activity against BuChE ( $IC_{50} = 15,52 \pm 0,92 \mu M$ ), on the other hand, inhibitory activity against AChE was insignificant ( $IC_{50} > 100 \mu M$ ). Strictamine was not active against AChE or BuChE ( $IC_{50} > 100 \mu M$ ).